

**MEDICINSKI  
FAKULTET**

Adresa: Kruševac bb  
81000 PODGORICA  
CRNA GORA  
Tel: +382 20 246 651  
Fax: +382 20 243 842  
url: [www.ucg.ac.me/medf](http://www.ucg.ac.me/medf)  
E-mail: [infomedf@ac.me](mailto:infomedf@ac.me)



**MEDICAL  
FACULTY**

Address: Krusevac bb  
81000 PODGORICA  
MONTENEGRO  
Phone: +382 20 246 651  
Fax: +382 20 243 842  
url: [www.ucg.ac.me/medf](http://www.ucg.ac.me/medf)  
E-mail: [infomedf@ac.me](mailto:infomedf@ac.me)

 CRNA GORA · UNIVERZITET CRNE GORE  
MEDICINSKI FAKULTET  
Brc. 588/10-1  
Podgorica, 28.04. 2019 god.

**Univerzitet Crne Gore  
Odbor za doktorske studije**

Poštovani,

U skladu sa stavom 3 člana 35, i člana 55 Pravila doktorskih studija, i tačkom 3.6 . Vodiča za doktorske studije, dostavljamo Odluku Vijeća Medicinskog fakulteta o usvajanju Izvještaja Komisije za ocjenu podobnosti teme doktorske disertacije (obrazac D1) i inoviranu prijavu teme doktorske disertacije, doktoranda dr pharm Ninoslave Lalatović.

S poštovanjem.

**MEDICINSKI FAKULTET  
DEKAN**

  
**Prof. dr Miodrag Radunović**

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**MEDICINSKI FAKULTET**  
**Broj: 588/10**  
**Podgorica, 28.04.2021. godine**

Na osnovu člana 64 stav 2 tačka 9 Statuta Univerziteta Crne Gore, a u skladu sa članom 35 i 55 Pravila doktorskih studija Vijeće Medicinskog fakulteta na elektronskoj sjednici održanoj dana 27-28.04.2021. godine donijelo je

**ODLUKU**

1. Usvaja se Izvještaj Komisije za ocjenu podobnosti teme doktorske disertacije i kandidatkinje dr pharm Ninoslave Lalatović, broj:577 od 23.04.2021. godine.
2. Predlaže se Senatu UCG da prihvati kao podobnu doktorsku tezu pod nazivom „**Ispitivanje uticaja genskih polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina na efikasnost i pojavu neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije**“ kandidatkinje dr pharm Ninoslave Lalatović.
3. Odluka Vijeća i Izvještaj Komisije iz tačke 1 ove odluke i novi obrazac prijave radnog naziva doktorske teze (obrazac PD), broj: 577/1 od 23.04.2021. godine, dostavlja se Centru za doktorske studije i Senatu Univerziteta Crne Gore, na dalju realizaciju.

**OBRAZLOŽENJE**

Dr pharm Ninoslava Lalatović podnijela je prijavu radnog naziva doktorske teze pod nazivom „**Ispitivanje uticaja genskih polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina na efikasnost i pojavu neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije**“ dana 01.02.2021. godine (Broj prijave: 181).

Senat Univerziteta Crne Gore na sjednici održanoj 10.03.2021. godine imenovao je Komisiju za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidatkinje dr pharm Ninoslave Lalatović u sastavu prof. dr Aneta Bošković, doc. dr Snežana Pantović i prof. dr Marina Kostić, prof.dr Olivera Miljanović i prof.dr Zorica Poštpara.

Kandidatkinja je pred navedenom Komisijom javno obrazložila ciljeve i očekivane rezultate, odnosno izložila istraživački program doktorske teze, dana 05.04.2021. godine. Komisija je podnijela Vijeću Medicinskog fakulteta Izvještaj o ocjeni podobnosti doktorske disertacije broj:577 od 23.04.2021. godine. Shodno stavu 7 tačke 3.6 Vodiča za doktorske studije, kandidatkinja je postupila po primjedbama Komisije i dostavila inoviranu verziju prijave teme doktorske disertacije broj: 577/1 od 23.04.2021. godine.

Vijeće Medicinskog fakulteta na elektronskoj sjednici održanoj dana 27-28.04.2021. godine, nakon razmatranja izvještaja Komisije broj: 577 od 23.04.2021. godine i nove prijave broj: 577/1 od 23.04.2021. godine, odlučilo je kao u dispozitivu ove odluke.

**VIJEĆE MEDICINSKOG FAKULTETA**  
**PREDSJEDAVALAČI,**  
**Prof. dr Miodrag Radunović, dekan**



MEDICINSKI FAKULTET			
23. 04. 2021			
Prilozi	Broj	Prilog	Vrijednost
med	577		

UNIVERZITET CRNE GORE

Obrazac D1: Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

## OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr pharm. Ninoslava Lalatović
Fakultet	Medicinski fakultet
Studijski program	Farmacija
Broj indeksa	9/18
Podaci o magistarskom radu	/
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	„Ispitivanje uticaja genskih polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina na efikasnost i pojavu neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije”
Na engleskom jeziku	„Examination of the influence of gene polymorphisms in the genes for cholesterol and statin metabolism on the efficacy and occurrence of side effects in users of statin therapy”
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	27-28.04.2021.
Naučna oblast doktorske disertacije	Farmakologija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
Javna odbrana polaznih istraživanja doktorske disertacije kandidatkinje dr pharm. Ninoslave Lalatović održana je 05.04.2021. godine, sa početkom u 12h, u Sali za sastanke (dekanat) na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore pred Komisijom u sastavu: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Dr Aneta Bošković – redovni profesor Medicinskog fakulteta UCG, predsjednik</li><li>2. Dr Snežana Pantović, docent Medicinskog fakulteta UCG, mentor – član</li><li>3. Dr Marina Kostić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, komentor – član</li><li>4. Dr Olivera Miljanović – vanredni profesor Medicinskog fakulteta UCG, član</li><li>5. Dr Zorica Potpara - vanredni profesor Medicinskog fakulteta UCG, član</li></ol> <p>U uvodnom dijelu tridesetominutnog izlaganja kandidatkinja je obrazlagala predloženu temu i izložila do sada najvažnije rezultate koji su ostvareni u oblasti istraživanja. Nakon toga, kandidatkinja je Komisiju upoznala sa planiranim pravcima istraživanja u nastavku rada na disertaciji, definisala ciljeve, hipoteze koje će biti provjerene tokom rada na izradi disertacije, izložila metodologiju rada, istraživački program, kao i očekivane rezultate i naučni doprinos.</p> <p>Po završetku izlaganja kandidatkinje, članovi Komisije su postavili pitanja, na koje je kandidatkinja uspješno odgovorila i dali komentare i sugestije za nastavak rada na tezi. Na kraju odbrane, Komisija je jednoglasno donijela odluku da je kandidatkinja uspješno odbranila</p>	

Obrazac D1: Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

podobnost teme doktorske disertacije.

## B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

### B1. Obrazloženje teme

Kardiovaskularne bolesti (KVB) i dalje predstavljaju vodeći uzrok smrti na globalnom nivou. U Crnoj Gori je 57.48% smrtnih ishoda bilo posledica kardiovaskularnih bolesti, prema podacima iz 2017 godine. (1) Jedan od faktora rizika, za čije postojanje se zna da pozitivno korelira sa većim rizikom od obolijevanja ali i smrtnosti od KVB je dislipidemija. Dislipidemija se definiše kao poremećaj lipidnog profila, a u njenoj terapiji koriste se statini, čiji je osnovni farmakološki pristup smanjenje „lošeg holesterola” ili LDL-h. Zahvaljujući svojoj sposobnosti da redukuju LDL u plazmi do 55% oni su široko propisivani lijekovi i lijekovi prvog izbora u liječenju dislipidemija, kako u svijetu, tako i kod nas. (2,3)

Međutim uočeno je da statini ne ispoljavaju jednaku efikasnost kod svakog pojedinca, kao i da se kod značajnog broja pacijenata javljaju neželjena dejstva koja mogu biti razlog loše komplijanse ili čak i prekida terapije statinima. (4) Pregledom literature, zaključeno je da genetski faktor igra značajnu ulogu u tome i da je prepoznat kao jedan od uzroka ovih problema. Stoga je neophodno okretanje personalizovanoj terapiji u cilju rješavanja ovih problema.

Personalizovana terapija ima za cilj da prilagodi terapiju lijekovima genomskom profilu pacijenta i time osigura njegovu maksimalnu efikasnost uz minimalne neželjene efekte. Farmakokinetika i farmakodinamika lijeka je pod kontrolom jedinstvenog seta gena koji utiče na funkciju proteinskih struktura koje organizam koristi u metabolisanju tog lijeka. Jednonukleotidni polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP) u dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) najčešći su oblik varijacija sekvenci u ljudskom genomu i razlog interindividualne varijabilnosti. Stoga je u planu rad na ispitivanju uticaja SNP polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina u cilju predviđanja individualnog odgovora na terapiju, koja će biti efikasna, sigurna za svakog pacijenta i koja će im omogućiti poboljšanje psiho-fizičkog stanja. (2,3,5,6) Pokazano je da produženo izlaganje nižim koncentracijama LDL-h, što se postiže ranim uvođenjem statina u terapiju i brzim postizanjem efekta, je povezano sa trostrukim smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti. (7) Stoga je neophodno je da statini pokažu maksimalnu efikasnost uz što manje neželjenih efekata, zbog čega se u obzir mora uzeti genetski faktor.

S obzirom na to da su statini, pored fibrata i ezetimiba, jedina grupa lijekova registrovana u Crnoj Gori za snižavanje LDL-h, jedan od zadataka istraživanja je i da utvrdi da li postoji potreba za registracijom i nekih drugih grupa lijekova, koje su dostupne u zemljama Evropske Unije, kako bi se zadovoljile potrebe svih pacijenata kojima je terapija potrebna. (1)

Trenutno smo na početku nove ere u personalizovanim terapijama i nema sumnje da će farmakogenetski testovi u bliskoj budućnosti postati vrijedan alat za odabir lijeka i doze i time doprinijeti željenom odnosu između koristi i rizika za lijekove propisane pacijentima, stoga je potrebno upoznati se sa uticajem SNP polimorfizama na efikasnost i pojavu neželjenih efekata, a za početak neka to budu upravo statini.

### B2. Cilj i hipoteze

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi frekvencu alela i genotipova u navedenim genima unutar ispitivane grupe;
2. Ispitati postojanje korelacije polimorfizama u ispitivanim genima sa nedovoljnom efikasnošću statinske terapije u ispitivanoj grupi;
3. Ispitati postojanje korelacije polimorfizama u ispitivanim genima sa pojavom neželjenih

- efekata u ispitivanoj grupi (hepatotoksičnost, miopatija);
4. Procjeniti koje od farmakogenetičkih testova bi trebalo uključiti u rutinskoj kliničkoj praksi;
  5. Procjeniti da li postoji potreba za registracijom novih grupa hipolipemika kako bi se zadovoljile terapijske potrebe pacijenata sa dislipidemijama u Crnoj Gori.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

1. H01: Postoji povezanost između polimorfizama ispitivanih gena zaduženih za metabolisanje holesterola i lijeka, i nedovoljne efikasnosti lijeka, koji se koristi u terapiji dislipidemije.
2. H02: Postoji povezanost između polimorfizama ispitivanih gena zaduženih za metabolisanje holesterola i lijeka, i neželjenih efekata lijeka, koji se koristi u terapiji dislipidemije.

### B3. Metode i plan istraživanja

Istraživanje će se sprovesti na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici. Za sprovođenje istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj: 2050/7 od 10.12.2020.) Istraživanjem je planirano obuhvatiti najmanje 200 ispitanika.

Veličina uzorka u literaturi, prilikom izvođenja sličnih istraživanja, varira, u zavisnosti od toga da li je cilj samog istraživanja genotipizacija populacije ili pak pravljenje korelacije između efikasnosti ili pojave neželjenih efekata sa alelima i genotipovima kod korisnika statinske terapije. U svrhu genotipizacije ABCB1 gena u Finskoj regrutovana su 534, dok je u Srbiji 158 ispitanika. S druge strane, za pravljenje korelacije uzimani su uzorci manje veličine. Tako je, na primjer, sprovedeno istraživanje u Kanadi obuhvatilo 106 ispitanika, Indiji 177, Italiji 183, Španiji 100, Brazilu 136, SAD-u 324 i Kini 542 ispitanika. S obzirom na to da je cilj ovog istraživanja pored utvrđivanja prevalencije alela i genotipova u navedenim genima i utvrđivanje povezanosti prisutnih alela i genotipova sa nedovoljnom efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije, bilo je potrebno naći neki kompromis. Uzimajući u obzir veličinu crnogorske populacije, veličine uzoraka iz literature, kao i finansijsku izvodljivost, odlučeno je da uzorak bude veličine 200 ispitanika. (16,17,18,19,21,24,26,28,32)

Garantovana je anonimnost svim ispitanicima koji se budu uključili u istraživanje, kako u toku studije, tako i nakon nje.

**Kriterijumi za uključivanje u istraživanje** U istraživanje će biti uključeni ispitanici sa dislipidemijom stariji od 18 godina, koji koriste u terapiji atorvastatin, statin sa najvećom potrošnjom u Crnoj Gori, i koji su na terapiji atorvastatinom najmanje 8 nedjelja.

**Kriterijumi isključenja** Iz istraživanja će biti isključeni ispitanici koji piju lijekove koji djeluju kao induktori ili inhibitori OATP1B1 transportera, P glikoproteina ili CYP 3A4 enzima, koji uz statine piju druge hipolipemike, koji imaju nepotpunu medicinsku dokumentaciju, pacijenti sa neurološkim, psihičnim, onkološkim, autoimunim oboljenjima, hipotiroidizmom, pacijenti koji zloupotrebljavaju psihoaktivne supstance u poslednjih godinu dana, pacijenti koji zloupotrebljavaju alkohol i nekomplijantni pacijenti, tj. pacijenti koji imaju manje od 6 poena u

upitniku za komplijansu Morisky Medication Adherence Scale, sa izuzetkom onih kod kojih su razlog ne-komplijanse neželjena dejstva.

Nakon potpisivanja Pristanka informisanog ispitanika od strane pacijenata koji zadovoljavaju kriterijume uključenja u studiju pristupiće se prikupljanju podataka kroz upitnike. Prvo će se sa ispitanicima proći kroz Strukturisani socio-demografski upitnik kojim će se prikupiti socio-demografski podaci i podaci koji se odnose na prisutne komorbiditete, stil života, liječenje pacijenata i samu terapiju statinima. Potom će ispitanici popuniti Upitnik o neželjenim dejstvima koji su možda povezani sa statinskom terapijom. Zatim će se pristupiti mjerenju: visine, težine pacijenta i računati BMI index po formuli težina (kg) / (visina (m))<sup>2</sup>, kao i mjerenju krvnog pritiska. Pregledom medicinske dokumentacije će se uzeti podaci o dijagnozi pacijenta, o tome koliko dugo je pacijent na statinskoj terapiji, da li su vršene promjene u dozi ili vrsti statina, ako jesu zbog čega, pregled laboratorijskih nalaza lipidnog statusa prije uključivanja statinske terapije. Na osnovu rezultata ovih nalaza i prisutnih komorbiditeta odradiće se procjena kardiovaskularnog rizika evropskom (SCORE) skalom za svakog pacijenta pojedinačno. SCORE skala se koristi za procjenu desetogodišnjeg rizika od nastanka KVB, uzimajući u obzir tradicionalne faktore rizika za KVB, kao što su starost, status pušenja, vrijednost krvnog pritiska i lipidni status. Koristiće se SCORE skala sa visokim rizikom, jer Crna Gora pripada zemljama Evrope sa visokim rizikom od smrtnog ishoda, koji je posledica kardiovaskularnih bolesti (≥150 na 100000 stanovnika). Na osnovu procijenjenog kardiovaskularnog rizika odrediće se individualne željene vrijednosti LDL-h koje bi terapijom pacijent trebao da postigne, prema preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine. Prema dobijenim vrijednostima KV rizika, moguća je klasifikacija ispitanika u čak 7 grupa (<1%, 1%, 2%, 3% - 4%, 5% - 9%, 10% - 14%, ≥15%) međutim zbog veličine uzorka i statističke značajnosti, izvršiće se podjela ispitanika u dvije grupe na osnovu dobijenih vrijednosti KV rizika, kao što je navedeno u nastavku. (12)

Pacijente ćemo prvo podijeliti u 2 grupe prema dužini upotrebe statinske terapije i to: na one koji su na terapiji atorvastatinom od najmanje 2 mjeseca do godinu dana, (u tom periodu najčešće se javljaju neželjena dejstva kao miopatija ili hepatotoksičnost), (20, 29) i na one koji su na statinskoj terapiji preko godinu dana. Potom će se pacijenti u okviru te 2 grupe dijeliti na dvije podgrupe u zavisnosti od dobijenih vrijednosti KV rizika SCORE skalom, i to na: grupu sa niskim i umjerenim rizikom od nastanka KV bolesti (<5%) i grupu sa visokim i veoma visokim rizikom (≥5%). Potom će se pristupiti uzimanju uzorka krvi za biohemijske i genetske analize.

Uzorkovanje krvi se radi iz kubitalne vene u epruvetama od 2 ml za biohemijske analize i epruvetama sa EDTA od 2 ml za genetske analize. Venepunkcija se ne razlikuje ni na koji način u odnosu na standardno uzorkovanje krvi za kompletnu krvnu sliku. Krv za biohemijske analize će se odmah po uzorkovanju centrifugirati, alikvotirati i skladištiti na -20 °C, do momenta analize biohemijskih parametara. Od biohemijskih analiza vršiće se mjerenje sledećih parametara: kompletna krvna slika (KKS), hs-CRP, lipidni status (LDL, HDL, TG, ukupni holesterol), aktivnost jetrenih enzima (ALT, AST), zatim kreatinin kinaze (CK), koncentracija glukoze u krvi i glikoziliranog hemoglobina, prema protokolu referentne laboratorijske dijagnostike. (30, 31)

Genetske analize obaviće se Real Time PCR metodom u laboratoriji Medicinskog fakulteta. Analiziraće se sljedećih 7 polimorfizama: rs 3808607 (204A>C) u CYP7A1 genu, rs3846662 (23092A>G) u HMGCR genu, rs2306283 (388A>G) i rs4149056 (521T>C) u SLCO1B1 genu i rs1128503 (1236C>T), rs2032582, (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) u ABCB1 genu. Od svih pacijenata će biti uzorkovano 2ml venske krvi u EDTA epruveti. Krv za molekularnu analizu će

se čuvati u frižideru na +4 stepena do 7 dana i za to vrijeme odraditi izolacija DNK iz uzoraka primjenom komercijalnog kita. Dobijeni ekstrakti DNK, biće zamrznuti na -30 °C. Prije PCR metode radiće se kvantifikacija DNK UV spektrofotometrom, kako bi se osiguralo da svi uzorci imaju potrebnu i ujednačenu koncentraciju DNK, za planiranu PCR analizu. PCR analiza odradiće se upotrebom Taqman genotyping assay-a, komercijalnog kita koji sadrži prajmere i probe specifične za svaki polimorfizam, prema protokolu proizvođača.

Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program), nakon čega će se ispitivati postojanje korelacije prisutnih genotipova sa efikasnošću i podnošljivošću statinske terapije. U cilju ispitivanja korelacije između polomorfizama u ispitivanim genima i efikasnosti i podnošljivosti terapije, poređenje će se vršiti između prethodno navedenih grupa i podgrupa studijske grupe. Poređenje će se praviti između ispitanika kojima je terapija bila efikasna i onih kojima nije, a poređenje podnošljivosti će se vršiti između onih ispitanika koji su imali neželjena dejstva, ili pak povišene biohemijske parametre koji na njih ukazuju, sa onima koji to nijesu.

**Kriterijumi za efikasnost terapije** Za terapiju atorvastatinom možemo reći da je efikasna ukoliko su dostignute prethodno izračunate ciljane vrijednosti LDL-h ili ukoliko su spuštene bazalne vrijednosti LDL-h za 50%. Takođe, u obzir se mora uzeti i to da li je pacijentu, kom terapija nije efikasna po prethodno navedenim kriterijumima, dozirana maksimalna tolerišuća doza atorvastatina. Ukoliko nije, potrebno je prikupiti informacije o tome da li je pacijentu bila dozirana maksimalna tolerišuća doza, ali je zbog pojave neželjenih efekata vraćena na nižu, ili pak uopšte nije ni uvedena veća doza. U tom slučaju, daće se preporuka njegovom ljekaru za povećanjem doze i ispratiti lipidni status tog pacijenta nakon 6 nedjelja. Podaci o maksimalnoj tolerišućoj dozi statina, kao i podaci o efikasnosti različitih doza i vrsta statina mogu se pronaći u preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine.

**Kriterijumi za podnošljivost terapije** Procjena podnošljivosti statina vršiće se na osnovu Upitnika o neželjenim efektima statina, kao i praćenjem biohemijskih parametara ALT, AST i CK. Značajnim će se smatrati povećanje serumskih koncentracija ovih enzima koje je  $\geq 3$  puta u odnosu na normalne vrijednosti.

### Statistička obrada

Pristupiće se statističkoj obradi i analizi dobijenih podataka i utvrđivanju statističke značajnosti povezanosti polimorfizama i njihovih kombinacija u prethodno navedenim genima sa efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije. Statistička analiza obuhvataće: deskriptivnu analizu karakteristika ispitanika, analizu različitih kategorija varijabla preko svojih apsolutnih i relativnih frekvencija izračunavanjem numeričke srednje i standardne devijacije ili medijanom i percentilima 25 i 27. Planirano je primijeniti jednovarijantnu analizu varijanse (ANOVA) za svaki alel i genotip, kao i multivarijantnu analizu varijanse (MANOVA) za sve alele. Nakon toga je planirano uraditi za svaku ANOVA analizu post hoc testiranje statističke značajnosti uočenih razlika koristeći se Fisher LSD testom. Za upoređivanje frekvencije alela i genotipova koristiće se Hi-kvadrat statistički test.

U svrhu komparacije grupa po varijablama koje su uključene u analizu, koristiće se Studentov t-test za nezavisne uzorke. U slučaju da distribucije podataka i rezultata budu statistički značajno odstupale od normalne krive, kao alternativna tehnika koristiće se Mann-Whitney U test. Za usporedbe tipa pretest-posttest koristiće se t-test za ponovljena mjerenja (zavisne uzorke) ili njegov neparametrijski pandan Wilcoxonov test.

U svrhu procjene asocijacije među ispitivanim varijablama, koristiće se Pearsonov (produkt-

moment) koeficijent korelacije ( $r$ ). Alternativno, ukoliko raspodjela podataka/rezultata bude statistički značajno odstupala od normalne, korišće se Spearmanov koeficijent rang korelacije ( $r$ ).

Podaci će biti prikazani tekstualno, tabelarno i grafički, uz korišćenje MS Excel, a statističke analize biće sprovedene uz pomoć SPSS softvera verzija 18.

**Istraživanje će biti sprovedeno kroz sljedeće aktivnosti:**

1. S obzirom na to da je dobijena saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj 2050/7 od 10.12.2020.) pristupiće se prikupljanju uzorka pacijenata starijih od 18 godina sa dislipidemijom, koji su na terapiji atorvastatinom. To će biti ispitanici koji dolaze na kontrolu u privatne i javne zdravstvene institucije: Klinički centar Crne Gore, Codru, Ordinaciju Boljević. KCCG je jedan od partnera na projektu CEBIMER, stoga postoji saglasnost za regrutovanje ispitanika u toj zdravstvenoj ustanovi. U slučaju da se u KCCG ne prikupi definisani broj ispitanika, pristupiće se regrutovanju iz preostalih navedenih zdravstvenih ustanova, od kojih će se prethodno tražiti saglasnost za regrutovanje ispitanika.
2. Prvo će ispitanici popunjavati Upitnik za isključenje ispitanika iz studije i Upitnik za komplijansu Morisky Medication Adherence Scale.
3. Pacijentima, koji odgovaraju kriterijumima za uključivanje u istraživanje, biće predložen na jasan način, u usmenoj i pismenoj formi, cilj i svrha istraživanja, kao i prava koja su im zagarantovana. Pacijenti koji pristanu da se uključe u istraživanje potpisuće Pristanak informisanog ispitanika.
4. Takvi ispitanici pristupiće popunjavanju Strukturisanog socio-demografskog upitnika. Potom će popuniti i Upitnik o neželjenim dejstvima, pristupiće se antropometrijskom mjerenju i mjerenju krvnog pritiska, pregledu medicinske dokumentacije i uzorkovanju venske krvi iz kubitalne vene, po principima Dobre laboratorijske prakse, koja će služiti za genetske i biohemijske analize
5. Potom će se za svakog pacijenta ponaosob računati 10-godišnji kardiovaskularni rizik SCORE skalom, uzimajući u obzir podatke sa početka terapije, i na osnovu dobijenih rezultata preračunati koje vrijednost LDL-h treba postići statinom kod tih pacijenata, vodeći se preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine.
6. Svi podaci o pacijentima dobijeni iz upitnika, kao i prethodno pomenuti proračuni, biće uneseni u bazu podataka (Excel), a ispitivani učesnici će po završetku intervjua biti podijeljeni u 2 grupe prema dužini upotrebe statinske terapije i to na one koji su na terapiji od 2 mjeseca do godinu dana, i na one koji su na terapiji preko godinu dana, a potom i u dvije podgrupe u zavisnosti od dobijene vrijednosti KV rizika SCORE skalom na one sa niskim i umjerenim rizikom od nastanka KV bolesti (<5%) i na one sa visokim i veoma visokim rizikom od nastanka KV bolesti ( $\geq 5\%$ ).
7. Potom će se raditi biohemijske i molekularno-genetičke analize prema prethodno navedenom protokolu.
8. Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program), nakon čega će se ispitivati postojanje korelacije prisutnih genotipova sa efikasnošću i podnošljivošću statinske terapije.



9. Promocija rezultata doktorske disertacije predviđena je kroz objavljivanje radova u časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i prezentaciju rukovodiocima institucija od značaja (Kliničkog centra Crne Gore, Republičkog Fonda za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja, Instituta za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore) u cilju uvođenja individualnog pristupa u liječenju ovih pacijenata, ali i u cilju planiranja stručnog kadra, pokrivanja troškova liječenja i registracije novih grupa hipolipemika.

#### **B4. Naučni doprinos**

Klasična medicina daje jedan lijek svim osobama koje imaju određenu bolest. Međutim, samo dvije trećine pacijenata ima korist od svoje terapije. Prema najnovijim istraživanjima jedan od tri lijeka koje pacijent trenutno primjenjuje ne postuže željeni rezultat. Postavlja se pitanje zašto je to tako kad su lijekovi isti? Ljekovi jesu isti, ali pacijenti nijesu. Stoga, budućnost leži upravo u personalizovanoj terapiji, tj. individualizaciji terapije zahvaljujući DNK informacijama. Primjena tehnika molekularne genetike u medicinskoj praksi jedan je od najmodernijih pristupa današnjice. Primjenom ovih tehnika kod pacijenata sa dislipidemijom steći će se saznanja o prevalenciji navedenih polimorfizama u crnogorskoj populaciji, a zatim i napraviti korelacija između uočenih alela i genotipova sa efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije. Istraživanje ovog tipa će se prvi put raditi u našoj zemlji. Rezultati koji će proisteći iz ove studije omogućiće početak primjene farmakogenetike u kliničkoj praksi, tj. dati smjernice na osnovu kojih će moći da se odabere pravi lijek u optimalnoj dozi, tj. terapija sa manjim rizikom a boljim efektom, po mjeri svakog pacijenta. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata procjeniće se da li postoji potreba za registracijom novih grupa hipolipemika kako bi se zadovoljile terapijske potrebe pacijenata sa dislipidemijama u Crnoj Gori. U Holandiji možete ući u svaku apoteku sa svojim DNK informacijama i svaki farmaceut vam može na osnovu tih podataka reći koju dozu i lijek možete koristiti. I druge zemlje pokušavaju da naprave svoje baze podataka iz kojih bi dijelili informacije sa drugim zemljama u cilju praćenja reakcija pacijenta i djelotvornosti lijeka. Stoga, težiće se, na osnovu dobijenih rezultata, kreiranju jedne takve baze i u Crnoj Gori, pri čemu će zdravstveni sistem Crne Gore iste moći da dijeli i komparira sa zemljama koje su uspostavile personalizovanu terapiju. Zatim je predviđena i promocija rezultata doktorske disertacije kroz objavljivanje radova u naučnim časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i rukovodiocima institucija od značaja (Klinički centar Crne Gore, Republički Fond za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja, Institut za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore) i pružanje uvida društvenoj zajednici o najnovijim dostignućima u kliničkoj implementaciji ove oblasti u Crnoj Gori. I na kraju, nadam se da će rezultati ovog istraživanja dati podstrek drugim mladim istraživačima da nastave sa istraživanjima ovog tipa i u drugim oblastima medicine i doprinesu razvoju i primjeni „savremene” personalizovane terapije u Crnoj Gori na dobrobit zdravlja njenih stanovnika.

#### **B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja**

Navedeno istraživanje je planirano da se realizuje u okviru projektnih aktivnosti Centra izvrsnosti za biomedicinska istraživanja - CEBIMER, čiji je nosilac Institut za fizikalnu medicinu, rehabilitaciju i reumatologiju „Dr Simo Milošević” AD Igalo, a u kojem je Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore partner na projektu i zadužen je za realizaciju određenog broja projektnih aktivnosti, među kojima je i ovo istraživanje. Stoga su sredstva za realizaciju predložene doktorske disertacije obezbijedena iz budžeta ovog naučno-istraživačkog projekta finansiranog od strane Ministarstva nauke Crne Gore, te je istraživanje finansijski i organizaciono

predložene doktorske disertacije obezbijedena iz budžeta ovog naučno-istraživačkog projekta finansiranog od strane Ministarstva nauke Crne Gore, te je istraživanje finansijski i organizaciono izvodljivo.

**Mišljenje i prijedlog komisije**

Nakon uvida u predloženu dokumentaciju, izlaganja kandidatkinje, diskusije i implementacije predloženih sugestija, Komisija je zaključila da:

- je predložena tema aktuelna, naučno opravdana i zadovoljava nivo doktorske disertacije;
- su ciljevi i hipoteze jasno definisani;
- su metodologija i plan istraživanja detaljno opisani;
- su ispunjene sve etičke norme istraživanja.

Imajući u vidu sve navedeno, Komisija je dala pozitivnu ocjenu o podobnosti teme doktorske disertacije kandidatkinje Ninoslave Lalatović.

Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta i Senatu Univerziteta Crne Gore da prihvate ovaj izvještaj i odobre nastavak rada na doktorskoj disertaciji.

**Prijedlog izmjene naslova**

Nije bilo prijedloga izmjene naslova

**Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora**

Nije bilo prijedloga promjene mentora i/ili imenovanja drugog mentora

**Planirana odbrana doktorske disertacije**

Prvi kvartal 2023. godine

**Izdvojeno mišljenje**

Nije bilo izdvojenih mišljenja od strane prisutnih na odbrani.

Ime i prezime

**Napomena**

Nema napomena.

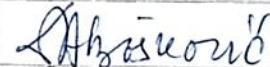
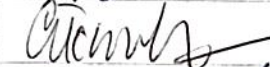


**ZAKLJUČAK**

Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija	DA	NE
--	----	----

Tema je originalan naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije	DA	NE
---	----	----

Kandidat može na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze	DA	NE
--	----	----


**Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata**

Prof. dr Aneta Bošković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	
Doc. dr Snežana Pantović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	
Prof. dr Marina Kostić, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Srbija	
Prof. dr Olivera Miljanović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	



UNIVERZITET CRNE GORE

ObrazacD1:Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

Prof. dr Zorica Potpara, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	Z Potpara
U Podgorici, 23.04.2021.	DEKAN 



### PRILOG

<b>PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA</b>	
Prof. dr Aneta Bošković	/
Doc. dr Snežana Pantović	S obzirom na to da se planira analiza biohemijskih parametara u cilju procjene efikasnosti i predviđanja kratkoročnih i dugoročnih neželjenih efekata statinske terapije, da li mi možete reći nešto o značaju Lp(a), uticaju statina na vrijednosti ovog lipoproteina, kao i da li postoji korelacija u literaturi između navedenih polimorfizama i ovog biohemijskog markera?
Prof. dr Marina Kostić	Kakav je farmakoeкономski značaj primene rezultata farmakogenetskih istraživanja? Poseban osvrt na Vaše istraživanje, u kom smislu može doći do redukcije ukupnih troškova lečenja hiperlipidemija primenom farmakogenetskih testova?
Prof. dr Olivera Miljanović	/
Prof. dr Zorica Potpara	Naveli ste kao jedan od ciljeva istraživanja potencijalnu potrebu za registracijom novih grupa hipolipemika, pa me zanima koje su to grupe hipolipemika registrovane u zemljama EU koje bi mogle naći put i do nas?
<b>PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI</b>	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
<b>ZNAČAJNI KOMENTARI</b>	



**UNIVERZITET CRNE GORE**  
ObrazacD1:Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

---




23.04.2021			
Prijemnica			
Org. jed.	Prij.	Prilog	Vijećnici
med	577		

UNIVERZITET CRNE GORE

ObrazacD1:Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

## OCJENA PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr pharm. Ninoslava Lalatović
Fakultet	Medicinski fakultet
Studijski program	Farmacija
Broj indeksa	9/18
Podaci o magistarskom radu	/
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	„Ispitivanje uticaja genskih polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina na efikasnost i pojavu neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije”
Na engleskom jeziku	„Examination of the influence of gene polymorphisms in the genes for cholesterol and statin metabolism on the efficacy and occurrence of side effects in users of statin therapy”
Datum prihvatanja teme i kandidata na sjednici Vijeća organizacione jedinice	
Naučna oblast doktorske disertacije	Farmakologija
Za navedenu oblast matični su sljedeći fakulteti	
Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore	
A. IZVJEŠTAJ SA JAVNE ODBRANE POLAZNIH ISTRAŽIVANJA DOKTORSKE DISERTACIJE	
Javna odbrana polaznih istraživanja doktorske disertacije kandidatkinje dr pharm. Ninoslave Lalatović održana je 05.04.2021. godine, sa početkom u 12h, u Sali za sastanke (dekanat) na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore pred Komisijom u sastavu:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Dr Aneta Bošković – redovni profesor Medicinskog fakulteta UCG, predsjednik</li><li>2. Dr Snežana Pantović, docent Medicinskog fakulteta UCG, mentor – član</li><li>3. Dr Marina Kostić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, komentor – član</li><li>4. Dr Olivera Miljanović – vanredni profesor Medicinskog fakulteta UCG, član</li><li>5. Dr Zorica Potpara - vanredni profesor Medicinskog fakulteta UCG, član</li></ol>	
U uvodnom dijelu tridesetominutnog izlaganja kandidatkinja je obrazlagala predloženu temu i izložila do sada najvažnije rezultate koji su ostvareni u oblasti istraživanja. Nakon toga, kandidatkinja je Komisiju upoznala sa planiranim pravcima istraživanja u nastavku rada na disertaciji, definisala ciljeve, hipoteze koje će biti provjerene tokom rada na izradi disertacije, izložila metodologiju rada, istraživački program, kao i očekivane rezultate i naučni doprinos.	
Po završetku izlaganja kandidatkinje, članovi Komisije su postavili pitanja, na koje je kandidatkinja uspješno odgovorila i dali komentare i sugestije za nastavak rada na tezi. Na kraju odbrane, Komisija je jednoglasno donijela odluku da je kandidatkinja uspješno odbranila	

ObrazacD1:Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

podobnost teme doktorske disertacije.

## B. OCJENA PODOBNOSTI TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

### B1. Obrazloženje teme

Kardiovaskularne bolesti (KVB) i dalje predstavljaju vodeći uzrok smrti na globalnom nivou. U Crnoj Gori je 57.48% smrtnih ishoda bilo posledica kardiovaskularnih bolesti, prema podacima iz 2017 godine. (1) Jedan od faktora rizika, za čije postojanje se zna da pozitivno korelira sa većim rizikom od obolijevanja ali i smrtnosti od KVB je dislipidemija. Dislipidemija se definiše kao poremećaj lipidnog profila, a u njenoj terapiji koriste se statini, čiji je osnovni farmakološki pristup smanjenje „lošeg holesterola” ili LDL-h. Zahvaljujući svojoj sposobnosti da redukuju LDL u plazmi do 55% oni su široko propisivani lijekovi i lijekovi prvog izbora u liječenju dislipidemija, kako u svijetu, tako i kod nas. (2,3)

Međutim uočeno je da statini ne ispoljavaju jednaku efikasnost kod svakog pojedinca, kao i da se kod značajnog broja pacijenata javljaju neželjena dejstva koja mogu biti razlog loše komplijanse ili čak i prekida terapije statinima. (4) Pregledom literature, zaključeno je da genetski faktor igra značajnu ulogu u tome i da je prepoznat kao jedan od uzroka ovih problema. Stoga je neophodno okretanje personalizovanoj terapiji u cilju rješavanja ovih problema.

Personalizovana terapija ima za cilj da prilagodi terapiju lijekovima genomskom profilu pacijenta i time osigura njegovu maksimalnu efikasnost uz minimalne neželjene efekte. Farmakokinetika i farmakodinamika lijeka je pod kontrolom jedinstvenog seta gena koji utiče na funkciju proteinskih struktura koje organizam koristi u metabolisanju tog lijeka. Jednonukleotidni polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP) u dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) najčešći su oblik varijacija sekvenci u ljudskom genomu i razlog interindividualne varijabilnosti. Stoga je u planu rad na ispitivanju uticaja SNP polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina u cilju predviđanja individualnog odgovora na terapiju, koja će biti efikasna, sigurna za svakog pacijenta i koja će im omogućiti poboljšanje psiho-fizičkog stanja. (2,3,5,6) Pokazano je da produženo izlaganje nižim koncentracijama LDL-h, što se postiže ranim uvođenjem statina u terapiju i brzim postizanjem efekta, je povezano sa trostrukim smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti. (7) Stoga je neophodno je da statini pokažu maksimalnu efikasnost uz što manje neželjenih efekata, zbog čega se u obzir mora uzeti genetski faktor.

S obzirom na to da su statini, pored fibrata i ezetimiba, jedina grupa lijekova registrovana u Crnoj Gori za snižavanje LDL-h, jedan od zadataka istraživanja je i da utvrdi da li postoji potreba za registracijom i nekih drugih grupa lijekova, koje su dostupne u zemljama Evropske Unije, kako bi se zadovoljile potrebe svih pacijenata kojima je terapija potrebna. (1)

Trenutno smo na početku nove ere u personalizovanim terapijama i nema sumnje da će farmakogenetski testovi u bliskoj budućnosti postati vrijedan alat za odabir lijeka i doze i time doprinijeti željenom odnosu između koristi i rizika za lijekove propisane pacijentima, stoga je potrebno upoznati se sa uticajem SNP polimorfizama na efikasnost i pojavu neželjenih efekata, a za početak neka to budu upravo statini.

### B2. Cilj i hipoteze

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi frekvencu alela i genotipova u navedenim genima unutar ispitivane grupe;
2. Ispitati postojanje korelacije polimorfizama u ispitivanim genima sa nedovoljnom efikasnošću statinske terapije u ispitivanoj grupi;
3. Ispitati postojanje korelacije polimorfizama u ispitivanim genima sa pojavom neželjenih

- efekata u ispitivanoj grupi (hepatotoksičnost, miopatija);
4. Procjeniti koje od farmakogenetičkih testova bi trebalo uključiti u rutinskoj kliničkoj praksi;
  5. Procjeniti da li postoji potreba za registracijom novih grupa hipolipemika kako bi se zadovoljile terapijske potrebe pacijenata sa dislipidemijama u Crnoj Gori.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

1. H01: Postoji povezanost između polimorfizama ispitivanih gena zaduženih za metabolisanje holesterola i lijeka, i nedovoljne efikasnosti lijeka, koji se koristi u terapiji dislipidemije.
2. H02: Postoji povezanost između polimorfizama ispitivanih gena zaduženih za metabolisanje holesterola i lijeka, i neželjenih efekata lijeka, koji se koristi u terapiji dislipidemije.

### B3. Metode i plan istraživanja

Istraživanje će se sprovesti na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici. Za sprovođenje istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj: 2050/7 od 10.12.2020.) Istraživanjem je planirano obuhvatiti najmanje 200 ispitanika.

Veličina uzorka u literaturi, prilikom izvođenja sličnih istraživanja, varira, u zavisnosti od toga da li je cilj samog istraživanja genotipizacija populacije ili pak pravljenje korelacije između efikasnosti ili pojave neželjenih efekata sa alelima i genotipovima kod korisnika statinske terapije. U svrhu genotipizacije ABCB1 gena u Finskoj regrutovana su 534, dok je u Srbiji 158 ispitanika. S druge strane, za pravljenje korelacije uzimani su uzorci manje veličine. Tako je, na primjer, sprovedeno istraživanje u Kanadi obuhvatilo 106 ispitanika, Indiji 177, Italiji 183, Španiji 100, Brazilu 136, SAD-u 324 i Kini 542 ispitanika. S obzirom na to da je cilj ovog istraživanja pored utvrđivanja prevalencije alela i genotipova u navedenim genima i utvrđivanje povezanosti prisutnih alela i genotipova sa nedovoljnom efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije, bilo je potrebno naći neki kompromis. Uzimajući u obzir veličinu crnogorske populacije, veličine uzoraka iz literature, kao i finansijsku izvodljivost, odlučeno je da uzorak bude veličine 200 ispitanika. (16,17,18,19,21,24,26,28,32)

Garantovana je anonimnost svim ispitanicima koji se budu uključili u istraživanje, kako u toku studije, tako i nakon nje.

**Kriterijumi za uključanje u istraživanje** U istraživanje će biti uključeni ispitanici sa dislipidemijom stariji od 18 godina, koji koriste u terapiji atorvastatin, statin sa najvećom potrošnjom u Crnoj Gori, i koji su na terapiji atorvastatinom najmanje 8 nedjelja.

**Kriterijumi isključenja** Iz istraživanja će biti isključeni ispitanici koji piju lijekove koji djeluju kao induktori ili inhibitori OATP1B1 transportera, P glikoproteina ili CYP 3A4 enzima, koji uz statine piju druge hipolipemike, koji imaju nepotpunu medicinsku dokumentaciju, pacijenti sa neurološkim, psihotičnim, onkološkim, autoimunim oboljenjima, hipotiroidizmom, pacijenti koji zloupotrebljavaju psihoaktivne supstance u poslednjih godinu dana, pacijenti koji zloupotrebljavaju alkohol i nekomplijantni pacijenti, tj. pacijenti koji imaju manje od 6 poena u



upitniku za komplijansu Morisky Medication Adherence Scale, sa izuzetkom onih kod kojih su razlog ne-komplijanse neželjena dejstva.

Nakon potpisivanja Pristanka informisanog ispitanika od strane pacijenata koji zadovoljavaju kriterijume uključenja u studiju pristupiće se prikupljanju podataka kroz upitnike. Prvo će se sa ispitanicima proći kroz Strukturisani socio-demografski upitnik kojim će se prikupiti socio-demografski podaci i podaci koji se odnose na prisutne komorbiditete, stil života, liječenje pacijenata i samu terapiju statinima. Potom će ispitanici popuniti Upitnik o neželjenim dejstvima koji su možda povezani sa statinskom terapijom. Zatim će se pristupiti mjerenju: visine, težine pacijenta i računati BMI index po formuli težina (kg) / (visina (m))<sup>2</sup>, kao i mjerenju krvnog pritiska. Pregledom medicinske dokumentacije će se uzeti podaci o dijagnozi pacijenta, o tome koliko dugo je pacijent na statinskoj terapiji, da li su vršene promjene u dozi ili vrsti statina, ako jesu zbog čega, pregled laboratorijskih nalaza lipidnog statusa prije uključivanja statinske terapije. Na osnovu rezultata ovih nalaza i prisutnih komorbiditeta odradiće se procjena kardiovaskularnog rizika evropskom (SCORE) skalom za svakog pacijenta pojedinačno. SCORE skala se koristi za procjenu desetogodišnjeg rizika od nastanka KVB, uzimajući u obzir tradicionalne faktore rizika za KVB, kao što su starost, status pušenja, vrijednost krvnog pritiska i lipidni status. Koristiće se SCORE skala sa visokim rizikom, jer Crna Gora pripada zemljama Evrope sa visokim rizikom od smrtnog ishoda, koji je posledica kardiovaskularnih bolesti ( $\geq 150$  na 100000 stanovnika). Na osnovu procijenjenog kardiovaskularnog rizika odrediće se individualne željene vrijednosti LDL-h koje bi terapijom pacijent trebao da postigne, prema preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine. Prema dobijenim vrijednostima KV rizika, moguća je klasifikacija ispitanika u čak 7 grupa (<1%, 1%, 2%, 3% - 4%, 5% - 9%, 10% - 14%,  $\geq 15\%$ ) međutim zbog veličine uzorka i statističke značajnosti, izvršiće se podjela ispitanika u dvije grupe na osnovu dobijenih vrijednosti KV rizika, kao što je navedeno u nastavku. (12)

Pacijente ćemo prvo podijeliti u 2 grupe prema dužini upotrebe statinske terapije i to: na one koji su na terapiji atorvastatinom od najmanje 2 mjeseca do godinu dana, (u tom periodu najčešće se javljaju neželjena dejstva kao miopatija ili hepatotoksičnost), (20, 29) i na one koji su na statinskoj terapiji preko godinu dana. Potom će se pacijenti u okviru te 2 grupe dijeliti na dvije podgrupe u zavisnosti od dobijenih vrijednosti KV rizika SCORE skalom, i to na: grupu sa niskim i umjerenim rizikom od nastanka KV bolesti (<5%) i grupu sa visokim i veoma visokim rizikom ( $\geq 5\%$ ). Potom će se pristupiti uzimanju uzorka krvi za biohemijske i genetske analize.

Uzorkovanje krvi se radi iz kubitalne vene u epruvetama od 2 ml za biohemijske analize i epruvetama sa EDTA od 2 ml za genetske analize. Venepunkcija se ne razlikuje ni na koji način u odnosu na standardno uzorkovanje krvi za kompletnu krvnu sliku. Krv za biohemijske analize će se odmah po uzorkovanju centrifugirati, alikvotirati i skladištiti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , do momenta analize biohemijskih parametara. Od biohemijskih analiza vršiće se mjerenje sledećih parametara: kompletna krvna slika (KKS), hs-CRP, lipidni status (LDL, HDL, TG, ukupni holesterol), aktivnost jetrenih enzima (ALT, AST), zatim kreatinin kinaze (CK), koncentracija glukoze u krvi i glikoziliranog hemoglobina, prema protokolu referentne laboratorijske dijagnostike. (30, 31)

Genetske analize obaviće se Real Time PCR metodom u laboratoriji Medicinskog fakulteta. Analiziraće se sljedećih 7 polimorfizama: rs 3808607 (204A>C) u CYP7A1 genu, rs3846662 (23092A>G) u HMGCR genu, rs2306283 (388A>G) i rs4149056 (521T>C) u SLCO1B1 genu i rs1128503 (1236C>T), rs2032582, (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) u ABCB1 genu. Od svih pacijenata će biti uzorkovano 2ml venske krvi u EDTA epruveti. Krv za molekularnu analizu će

se čuvati u frižideru na +4 stepena do 7 dana i za to vrijeme odraditi izolacija DNK iz uzoraka primjenom komercijalnog kita. Dobijeni ekstrakti DNK, biće zamrznuti na -30 °C. Prije PCR metode radiće se kvantifikacija DNK UV spektrofotometrom, kako bi se osiguralo da svi uzorci imaju potrebnu i ujednačenu koncentraciju DNK, za planiranu PCR analizu. PCR analiza odradiće se upotrebom Taqman genotyping assay-a, komercijalnog kita koji sadrži prajmere i probe specifične za svaki polimorfizam, prema protokolu proizvođača.

Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program), nakon čega će se ispitivati postojanje korelacije prisutnih genotipova sa efikasnošću i podnošljivošću statinske terapije. U cilju ispitivanja korelacije između polimorfizama u ispitivanim genima i efikasnosti i podnošljivosti terapije, poređenje će se vršiti između prethodno navedenih grupa i podgrupa studijske grupe. Poređenje će se praviti između ispitanika kojima je terapija bila efikasna i onih kojima nije, a poređenje podnošljivosti će se vršiti između onih ispitanika koji su imali neželjena dejstva, ili pak povišene biohemijske parametre koji na njih ukazuju, sa onima koji to nijesu.

**Kriterijumi za efikasnost terapije** Za terapiju atorvastatinom možemo reći da je efikasna ukoliko su dostignute prethodno izračunate ciljane vrijednosti LDL-h ili ukoliko su spuštene bazalne vrijednosti LDL-h za 50%. Takođe, u obzir se mora uzeti i to da li je pacijentu, kom terapija nije efikasna po prethodno navedenim kriterijumima, dozirana maksimalna tolerišuća doza atorvastatina. Ukoliko nije, potrebno je prikupiti informacije o tome da li je pacijentu bila dozirana maksimalna tolerišuća doza, ali je zbog pojave neželjenih efekata vraćena na nižu, ili pak uopšte nije ni uvedena veća doza. U tom slučaju, daće se preporuka njegovom ljekaru za povećanjem doze i ispratiti lipidni status tog pacijenta nakon 6 nedjelja. Podaci o maksimalnoj tolerišućoj dozi statina, kao i podaci o efikasnosti različitih doza i vrsta statina mogu se pronaći u preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine.

**Kriterijumi za podnošljivost terapije** Procjena podnošljivosti statina vršiće se na osnovu Upitnika o neželjenim efektima statina, kao i praćenjem biohemijskih parametara ALT, AST i CK. Značajnim će se smatrati povećanje serumskih koncentracija ovih enzima koje je  $\geq 3$  puta u odnosu na normalne vrijednosti.

#### Statistička obrada

Pristupiće se statističkoj obradi i analizi dobijenih podataka i utvrđivanju statističke značajnosti povezanosti polimorfizama i njihovih kombinacija u prethodno navedenim genima sa efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije. Statistička analiza obuhvataće: deskriptivnu analizu karakteristika ispitanika, analizu različitih kategorija varijabla preko svojih apsolutnih i relativnih frekvencija izračunavanjem numeričke srednje i standardne devijacije ili medijanom i percentilima 25 i 27. Planirano je primijeniti jednovarijantnu analizu varijanse (ANOVA) za svaki alel i genotip, kao i multivarijantnu analizu varijanse (MANOVA) za sve alele. Nakon toga je planirano uraditi za svaku ANOVA analizu post hoc testiranje statističke značajnosti uočenih razlika koristeći se Fisher LSD testom. Za upoređivanje frekvencije alela i genotipova koristiće se Hi-kvadrat statistički test.

U svrhu komparacije grupa po varijablama koje su uključene u analizu, koristiće se Studentov t-test za nezavisne uzorke. U slučaju da distribucije podataka i rezultata budu statistički značajno odstupale od normalne krive, kao alternativna tehnika koristiće se Mann-Whitney U test. Za usporedbe tipa pretest-posttest koristiće se t-test za ponovljena mjerenja (zavisne uzorke) ili njegov neparametrijski pandan Wilcoxonov test.

U svrhu procjene asocijacije među ispitivanim varijablama, koristiće se Pearsonov (produkt-

moment) koeficijent korelacije ( $r$ ). Alternativno, ukoliko raspodjela podataka/rezultata bude statistički značajno odstupala od normalne, korišće se Spearmanov koeficijent rang korelacije ( $r_s$ ).

Podaci će biti prikazani tekstualno, tabelarno i grafički, uz korišćenje MS Excel, a statističke analize biće sprovedene uz pomoć SPSS softvera verzija 18.

**Istraživanje će biti sprovedeno kroz sljedeće aktivnosti:**

1. S obzirom na to da je dobijena saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj 2050/7 od 10.12.2020.) pristupiće se prikupljanju uzorka pacijenata starijih od 18 godina sa dislipidemijom, koji su na terapiji atorvastatinom. To će biti ispitanici koji dolaze na kontrolu u privatne i javne zdravstvene institucije: Klinički centar Crne Gore, Codru, Ordinaciju Boljević. KCCG je jedan od partnera na projektu CEBIMER, stoga postoji saglasnost za regrutovanje ispitanika u toj zdravstvenoj ustanovi. U slučaju da se u KCCG ne prikupi definisani broj ispitanika, pristupiće se regrutovanju iz preostalih navedenih zdravstvenih ustanova, od kojih će se prethodno tražiti saglasnost za regrutovanje ispitanika.
2. Prvo će ispitanici popunjavati Upitnik za isključenje ispitanika iz studije i Upitnik za komplijansu Morisky Medication Adherence Scale.
3. Pacijentima, koji odgovaraju kriterijumima za uključenje u istraživanje, biće predložen na jasan način, u usmenoj i pismenoj formi, cilj i svrha istraživanja, kao i prava koja su im zagarantovana. Pacijenti koji pristanu da se uključe u istraživanje potpisuće Pristanak informisanog ispitanika.
4. Takvi ispitanici pristupiće popunjavanju Strukturisanog socio-demografskog upitnika. Potom će popuniti i Upitnik o neželjenim dejstvima, pristupiće se antropometrijskom mjerenju i mjerenju krvnog pritiska, pregledu medicinske dokumentacije i uzorkovanju venske krvi iz kubitalne vene, po principima Dobre laboratorijske prakse, koja će služiti za genetske i biohemijske analize
5. Potom će se za svakog pacijenta ponaosob računati 10-godišnji kardiovaskularni rizik SCORE skalom, uzimajući u obzir podatke sa početka terapije, i na osnovu dobijenih rezultata preračunati koje vrijednost LDL-h treba postići statinom kod tih pacijenata, vodeći se preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine.
6. Svi podaci o pacijentima dobijeni iz upitnika, kao i prethodno pomenuti proračuni, biće unošeni u bazu podataka (Excel), a ispitivani učesnici će po završetku intervjua biti podijeljeni u 2 grupe prema dužini upotrebe statinske terapije i to na one koji su na terapiji od 2 mjeseca do godinu dana, i na one koji su na terapiji preko godinu dana, a potom i u dvije podgrupe u zavisnosti od dobijene vrijednosti KV rizika SCORE skalom na one sa niskim i umjerenim rizikom od nastanka KV bolesti (<5%) i na one sa visokim i veoma visokim rizikom od nastanka KV bolesti ( $\geq 5\%$ ).
7. Potom će se raditi biohemijske i molekularno-genetičke analize prema prethodno navedenom protokolu.
8. Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program), nakon čega će se ispitivati postojanje korelacije prisutnih genotipova sa efikasnošću i podnošljivošću statinske terapije.

9. Promocija rezultata doktorske disertacije predviđena je kroz objavljivanje radova u časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i prezentaciju rukovodiocima institucija od značaja (Kliničkog centra Crne Gore, Republičkog Fonda za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja, Instituta za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore) u cilju uvođenja individualnog pristupa u liječenju ovih pacijenata, ali i u cilju planiranja stručnog kadra, pokrivanja troškova liječenja i registracije novih grupa hipolipemika.

#### **B4. Naučni doprinos**

Klasična medicina daje jedan lijek svim osobama koje imaju određenu bolest. Međutim, samo dvije trećine pacijenata ima korist od svoje terapije. Prema najnovijim istraživanjima jedan od tri lijeka koje pacijent trenutno primjenjuje ne postiže željeni rezultat. Postavlja se pitanje zašto je to tako kad su lijekovi isti? Ljekovi jesu isti, ali pacijenti nijesu. Stoga, budućnost leži upravo u personalizovanoj terapiji, tj. individualizaciji terapije zahvaljujući DNK informacijama. Primjena tehnika molekularne genetike u medicinskoj praksi jedan je od najmodernijih pristupa današnjice. Primjenom ovih tehnika kod pacijenata sa dislipidemijom steći će se saznanja o prevalenciji navedenih polimorfizama u crnogorskoj populaciji, a zatim i napraviti korelacija između uočenih alela i genotipova sa efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije. Istraživanje ovog tipa će se prvi put raditi u našoj zemlji. Rezultati koji će proisteći iz ove studije omogućiće početak primjene farmakogenetike u kliničkoj praksi, tj. dati smjernice na osnovu kojih će moći da se odabere pravi lijek u optimalnoj dozi, tj. terapija sa manjim rizikom a boljim efektom, po mjeri svakog pacijenta. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata procjenit će se da li postoji potreba za registracijom novih grupa hipolipemika kako bi se zadovoljile terapijske potrebe pacijenata sa dislipidemijama u Crnoj Gori. U Holandiji možete ući u svaku apoteku sa svojim DNK informacijama i svaki farmaceut vam može na osnovu tih podataka reći koju dozu i lijek možete koristiti. I druge zemlje pokušavaju da naprave svoje baze podataka iz kojih bi dijelili informacije sa drugim zemljama u cilju praćenja reakcija pacijenta i djelotvornosti lijeka. Stoga, težiće se, na osnovu dobijenih rezultata, kreiranju jedne takve baze i u Crnoj Gori, pri čemu će zdravstveni sistem Crne Gore iste moći da dijeli i komparira sa zemljama koje su uspostavile personalizovanu terapiju. Zatim je predviđena i promocija rezultata doktorske disertacije kroz objavljivanje radova u naučnim časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i rukovodiocima institucija od značaja (Klinički centar Crne Gore, Republički Fond za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja, Institut za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore) i pružanje uvida društvenoj zajednici o najnovijim dostignućima u kliničkoj implementaciji ove oblasti u Crnoj Gori. I na kraju, nadam se da će rezultati ovog istraživanja dati podstrek drugim mladim istraživačima da nastave sa istraživanjima ovog tipa i u drugim oblastima medicine i doprinesu razvoju i primjeni „savremene” personalizovane terapije u Crnoj Gori na dobrobit zdravlja njenih stanovnika.

#### **B5. Finansijska i organizaciona izvodljivost istraživanja**

Navedeno istraživanje je planirano da se realizuje u okviru projektnih aktivnosti Centra izvrsnosti za biomedicinska istraživanja - CEBIMER, čiji je nosilac Institut za fizikalnu medicinu, rehabilitaciju i reumatologiju „Dr Simo Milošević” AD Igalo, a u kojem je Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore partner na projektu i zadužen je za realizaciju određenog broja projektnih aktivnosti, među kojima je i ovo istraživanje. Stoga su sredstva za realizaciju predložene doktorske disertacije obezbijedena iz budžeta ovog naučno-istraživačkog projekta finansiranog od strane Ministarstva nauke Crne Gore, te je istraživanje finansijski i organizaciono

predložene doktorske disertacije obezbijedena iz budžeta ovog naučno-istraživačkog projekta finansiranog od strane Ministarstva nauke Crne Gore, te je istraživanje finansijski i organizaciono izvodljivo.

**Mišljenje i prijedlog komisije**

Nakon uvida u predloženu dokumentaciju, izlaganja kandidatkinje, diskusije i implementacije predloženih sugestija, Komisija je zaključila da:

- je predložena tema aktuelna, naučno opravdana i zadovoljava nivo doktorske disertacije;
- su ciljevi i hipoteze jasno definisani;
- su metodologija i plan istraživanja detaljno opisani;
- su ispunjene sve etičke norme istraživanja.

Imajući u vidu sve navedeno, Komisija je dala pozitivnu ocjenu o podobnosti teme doktorske disertacije kandidatkinje Ninoslave Lalatović.

Komisija predlaže Vijeću Medicinskog fakulteta i Senatu Univerziteta Crne Gore da prihvate ovaj izvještaj i odobre nastavak rada na doktorskoj disertaciji.

**Prijedlog izmjene naslova**

Nije bilo prijedloga izmjene naslova

**Prijedlog promjene mentora i/ili imenovanje drugog mentora**

Nije bilo prijedloga promjene mentora i/ili imenovanja drugog mentora

**Planirana odbrana doktorske disertacije**

Prvi kvartal 2023. godine

**Izdvojeno mišljenje**

Nije bilo izdvojenih mišljenja od strane prisutnih na odbrani.

Ime i prezime \_\_\_\_\_

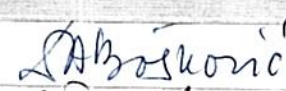
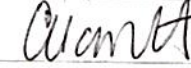


**Napomena**

Nema napomena.

**ZAKLJUČAK**

Predložena tema po svom sadržaju odgovara nivou doktorskih studija	DA	NE
Tema je <b>originalan</b> naučno-istraživački rad koji odgovara međunarodnim kriterijumima kvaliteta disertacije	DA	NE
Kandidat <b>može</b> na osnovu sopstvenog akademskog kvaliteta i stečenog znanja da uz adekvatno mentorsko vođenje realizuje postavljeni cilj i dokaže hipoteze	DA	NE


**Komisija za ocjenu podobnosti teme i kandidata**


Prof. dr Aneta Bošković, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	
Doc. dr Snežana Pantović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	
Prof. dr Marina Kostić, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Srbija	
Prof. dr Olivera Miljanović, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	



UNIVERZITET CRNE GORE

ObrazacD1: Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

Prof. dr Zorica Potpara, Medicinski fakultet Univerziteta Crne Gore, Crna Gora	Z Potpara
U Podgorici, 23.04.2021.	DEKAN 



### PRILOG

PITANJA KOMISIJE ZA OCJENU PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA	
Prof. dr Aneta Bošković	/
Doc. dr Snežana Pantović	S obzirom na to da se planira analiza biohemijskih parametara u cilju procjene efikasnosti i predviđanja kratkoročnih i dugoročnih neželjenih efekata statinske terapije, da li mi možete reći nešto o značaju Lp(a), uticaju statina na vrijednosti ovog lipoproteina, kao i da li postoji korelacija u literaturi između navedenih polimorfizama i ovog biohemijskog markera?
Prof. dr Marina Kostić	Kakav je farmakoeonomski značaj primene rezultata farmakogenetskih istraživanja? Poseban osvrt na Vaše istraživanje, u kom smislu može doći do redukcije ukupnih troškova lečenja hiperlipidemija primenom farmakogenetskih testova?
Prof. dr Olivera Miljanović	/
Prof. dr Zorica Potpara	Naveli ste kao jedan od ciljeva istraživanja potencijalnu potrebu za registracijom novih grupa hipolipemika, pa me zanima koje su to grupe hipolipemika registrovane u zemljama EU koje bi mogle naći put i do nas?
PITANJA PUBLIKE DATA U PISANOJ FORMI	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
(Ime i prezime)	
ZNAČAJNI KOMENTARI	



**UNIVERZITET CRNE GORE**  
ObrazacD1:Ocjena podobnosti doktorske teze i kandidata

---






MEDICINSKI FAKULTET			
Prijava	Broj	Prijava	Vrijednost
med	577/1		

UNIVERZITET CRNE GORE

Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

## PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Dr pharm. Ninoslava Lalatović
Fakultet	Medicinski fakultet
Studijski program	Farmacija
Broj indeksa	9/18
Ime i prezime roditelja	Nebojša Lalatović
Datum i mjesto rođenja	07.08.1993. Nikšić
Adresa prebivališta	Ozrinići bb Nikšić
Telefon	067/668-873
E-mail	nina.lalatovic32@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	2018. – i dalje: student doktorskih studija Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, studijski program Farmacija 2012-2017: Medicinski fakultet, Univerzitet Crne Gore, studijski program Farmacija; dobila zvanje Doktor farmacije, prosječna ocjena 10.00 2008-2012: Gimnazija Stojan Cerović; diploma Luča 1
Radno iskustvo	2020 – i dalje: istraživač na projektu Ministarstva nauke CEBIMER na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore 2017 – i dalje: saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore, studijski program Farmacija 2017-2020: farmaceut u apoteci Tea Medica
Popis radova	Lalatović N., Duborija Kovačević N. Interakcije lijekova kao posljedica polifarmacije u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Rad prihvaćen za Treći kongres farmaceuta u Crnoj Gori sa međunarodnim učešćem., 2019.godine.
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	„Ispitivanje uticaja genskih polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina na efikasnost i pojavu neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije”
Na engleskom jeziku	„Examination of the influence of gene polymorphisms in the genes for cholesterol and statin metabolism on the efficacy and occurrence of side effects in users of statin therapy”
Obrazloženje teme	
<p>Kardiovaskularne bolesti (KVB) i dalje predstavljaju vodeći uzrok smrti na globalnom nivou. U Crnoj Gori je 57.48% smrtnih ishoda bilo posledica kardiovaskularnih bolesti, prema podacima iz 2017 godine. (1) Jedan od faktora rizika, za čije postojanje se zna da pozitivno korelira sa većim rizikom od obolijevanja ali i smrtnosti od KVB je dislipidemija. Dislipidemija se definiše kao poremećaj lipidnog profila, a u njenoj terapiji koriste se statini, čiji je osnovni farmakološki pristup smanjenje „lošeg holesterola” ili LDL-h. Zahvaljujući svojoj sposobnosti da redukuju LDL u plazmi do 55% oni su široko propisivani lijekovi i lijekovi prvog izbora u</p>	

Obrazac PD: Prijava teme doktorske disertacije

liječenju dislipidemija, kako u svijetu, tako i kod nas. (2,3)

Međutim uočeno je da statini ne ispoljavaju jednaku efikasnost kod svakog pojedinca, kao i da se kod značajnog broja pacijenata javljaju neželjena dejstva koja mogu biti razlog loše komplijanse ili čak i prekida terapije statinima. (4) Pregledom literature, zaključeno je da genetski faktor igra značajnu ulogu u tome i da je prepoznat kao jedan od uzroka ovih problema. Stoga je neophodno okretanje personalizovanoj terapiji u cilju rješavanja ovih problema.

Personalizovana terapija ima za cilj da prilagodi terapiju lijekovima genomskom profilu pacijenta i time osigura njegovu maksimalnu efikasnost uz minimalne neželjene efekte. Farmakokinetika i farmakodinamika lijeka je pod kontrolom jedinstvenog seta gena koji utiče na funkciju proteinskih struktura koje organizam koristi u metabolisanju tog lijeka. Jednonukleotidni polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP) u dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) najčešći su oblik varijacija sekvenci u ljudskom genomu i razlog interindividualne varijabilnosti. Stoga je u planu rad na ispitivanju uticaja SNP polimorfizama u genima za metabolizam holesterola i statina u cilju predviđanja individualnog odgovora na terapiju, koja će biti efikasna, sigurna za svakog pacijenta i koja će im omogućiti poboljšanje psiho-fizičkog stanja. (2,3,5,6) Pokazano je da produženo izlaganje nižim koncentracijama LDL-h, što se postiže ranim uvođenjem statina u terapiju i brzim postizanjem efekta, je povezano sa trostrukim smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti. (7) Stoga je neophodno je da statini pokažu maksimalnu efikasnost uz što manje neželjenih efekata, zbog čega se u obzir mora uzeti genetski faktor.

S obzirom na to da su statini, pored fibrata i ezetimiba, jedina grupa lijekova registrovana u Crnoj Gori za snižavanje LDL-h, jedan od zadataka istraživanja je i da utvrdi da li postoji potreba za registracijom i nekih drugih grupa lijekova, koje su dostupne u zemljama Evropske Unije, kako bi se zadovoljile potrebe svih pacijenata kojima je terapija potrebna. (1)

Trenutno smo na početku nove ere u personalizovanim terapijama i nema sumnje da će farmakogenetski testovi u bliskoj budućnosti postati vrijedan alat za odabir lijeka i doze i time doprinijeti željenom odnosu između koristi i rizika za lijekove propisane pacijentima, stoga je potrebno upoznati se sa uticajem SNP polimorfizama na efikasnost i pojavu neželjenih efekata, a za početak neka to budu upravo statini.

### Pregled istraživanja

Dislipidemija se definiše kao poremećaj lipidnog profila, koji je praćen povišenim vrijednostima LDL-h i triglicerida, a sniženim vrijednostima HDL-h. Ona predstavlja značajan faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. (2,4) SZO procjenjuje da je dislipidemija povezana sa 4 miliona smrti godišnje. (8) Stoga je kontrola dislipidemije esencijalna u redukciji kardiovaskularnih komplikacija. Primarni cilj terapije, u cilju smanjenja rizika za KVB, je smanjenje vrijednosti LDL-h, a u tu svrhu se koriste statini.

Statini su kompetitivni inhibitori enzima HMG-CoA reduktaze, enzima koji vrši konverziju 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzima A u mevalonat, koji je prekursor u sintezi holesterola. Smanjena koncentracija holesterola u hepatocitima dovodi do pojačane sinteze i ekspresije receptora za LDL na površini hepatocita, usljed čega dolazi do pojačanog preuzimanja LDL-h iz cirkulacije i njegovog katabolizma u ćelijama jetre. Pošto se sinteza holesterola uglavnom odigrava noću, statine treba koristiti uveče kako bi se maksimizirao njihov efekat. (9) Meta-analize naglašavaju prednosti redukcije LDL-h, gdje se sa svakim smanjenjem od 1 mmol / L (38.7 mg/dl) postiže smanjenje relativnog rizika od 22% u koronarnim događajima. (10) Zahvaljujući svojoj sposobnosti da redukuju LDL u plazmi do 55% oni su široko propisivani lijekovi kako u svijetu, tako i kod nas, koristi ih preko milijardu ljudi i primjenjuju se u kliničkoj praksi, kako u liječenju hiperholesterolemije, tako i u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih oboljenja i srčanog udara. (2) Noviji statistički podaci pokazuju porast upotrebe statina kod odraslih  $\geq 40$  godina i kod pacijenata sa povišenim rizikom od KVB. Prema podacima Crnogorske agencije za lijekove i medicinska sredstva za statine je utrošeno oko million

cura u 2018. godini. Potrošnja statina se povećala za 6.05% u 2018. godini, u poređenju sa 2017. Najveću potrošnju u ovoj grupi lijekova ima atorvastatin čija se potrošnja u proteklih pet godina (2013. - 2017.) uvećala za 275%. (1) Pored visoke efikasnosti u snižavanju LDL-h, statini ispoljavaju još neke povoljne efekte koje pokazuju rezultati studije ASTEROID. (11)

Međutim pored prethodno navedenih dobrih strana, statini imaju i neke loše. Na prvom mjestu treba istaći neželjena dejstva, među kojima su najčešća hepatotoksičnost i miopatija, kao i stupanje u interakcije sa velikim brojem lijekova, s obzirom na činjenicu da se statini dominantno metaboliziraju preko enzima iz grupe CYP P450, što često bude razlog loše komplikacije od strane pacijenata. (9,12) Takođe, česta je i suboptimalna kontrola dislipidemije. Jedna francuska studija sprovedena u periodu 2012-2014 je prijavila da dvije trećine pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom koji su na terapiji lijekovima za snižavanje holesterola, nijesu dostigli ciljane željene vrijednosti LDL-h. Slično je zabilježeno i u njemačkoj studiji iz 2013. godine. Studija u Alberti je takođe pokazala da 36.6% pacijenata na terapiji statinima nije dostiglo ciljane vrijednosti LDL-h. (8) Studija u Hrvatskoj je pokazala da gotovo dva od tri pacijenta na liječenju statinima nijesu dostigla ciljane vrijednosti LDL-h preporučene od strane Evropskog vodiča za prevenciju kardiovaskularnih bolesti. (4) Postavlja se pitanje: "Zbog čega postoji značajan jaz između očekivanih i stvarnih benefita statinske terapije?" Pregledom literature uočeno je da je genetski faktor prepoznat kao jedan od uzroka ovih problema. (2,3,6) Stoga je u planu ispitivanje sledećih polimorfizama: rs 3808607 (204A>C) u CYP7A1 genu, rs3846662 (23092A>G) u HMGCR genu, rs2306283 (388A>G) i rs4149056 (521T>C) u SLCO1B1 genu i rs1128503 (1236C>T), rs2032582, (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) u ABCB1 genu, za koje u literaturi postoje podaci da su povezani sa nedovoljnom efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije.

CYP7A1 gen se nalazi na 8q12.1 hromozomu. Ovaj gen kodira enzim istog naziva koji je uključen u metabolizam holesterola i vrši njegovu konverziju do žučnih kiselina. CC genotip kod polimorfizma rs 3808607 (204A>C) je prepoznat kao mogući uzročnik hiperholesterolemije, kao i smanjene efikasnosti statinske terapije. Nosioci CC genotipa imaju veći nivo LDL-h zbog smanjene aktivnosti ovog enzima u odnosu na nosioce AA genotip. Stoga, ovakvi pacijenti imaju konstantno povećan nivo LDL-h u plazmi što je povezano sa većim rizikom od infarkta miokarda. Kod 324 pacijenta sa hiperholesterolemijom, koji su liječeni atorvastatinom (10 mg), Kajinami i saradnici opisali su značajnu povezanost između nosioca CC genotipa i smanjene efikasnosti atorvastatina u kavkaskoj populaciji. Studija u Indiji je takođe pokazala da su svi ispitanici sa lošim odgovorom na atorvastatin pokazali prisustvo CC genotipa. Postoje studije da bi kod ovakvih pacijenata bila efikasnija primjena žučnih smola u terapiji, jer povećavaju aktivnost ovog enzima. Prema podacima PharmGKB frekvencija C alela kod Evropljana je 39.85%, stoga želim da utvrdim kakva je prevalencija u našoj populaciji i da li postoji potreba za registracijom grupe lijekova koja će riješiti problem povišenog LDL-h kod ovakvih pacijenata. (13,14,15,16,17)

HMGCR gen nalazi se na 5q13.3 hromozomu. On kodira enzim istog naziva koji je ciljno mjesto djelovanja statina. Njegovom inhibicijom statini sprječavaju konverziju mevalonata u holesterol i na taj način smanjuju nivo LDL-h u krvi. U literaturi postoje podaci da su nosioci GG genotipa kod rs3846662 (23092A>G) polimorfizma povezani sa smanjenom efikasnošću statinske terapije kao i to da je ovaj genotip široko rasprostranjen u grupi hiperholesterolemičnih pacijenata. Uočeno je da homozigoti za G alel imaju veću koncentraciju LDL-h i ukupnog holesterola. Jedna studija je pokazala da postoji povezanost između ovog genotipa i lošijeg odgovora na statinsku terapiju. Naime, kod nosioca GG genotipa je zabilježeno značajno manje smanjenje ukupnog holesterola u poređenju sa nosiocima AA genotipa. To se može objasniti činjenicom da ovaj polimorfizam uzrokuje sintezu RNK bez egzona 13, što kasnije rezultuje sintezom enzima sa neaktivnim katalitičkim mjestom i vjerovatno gubitkom osjetljivosti za

vezivanje statina. S druge strane druga studija navodi da je procentualno smanjenje LDL-h statinima značajno smanjeno kod žena nosioca AA genotipa ovog polimorfizma u poređenju sa muškarcima. Stoga se zaključuje da su rezultati kontraverzni, kao i da postoji razlika u odnosu na pol u odgovoru na statine. Prema podacima PharmGKB frekvencija G alela kod Evropljana je 43.17%, stoga želim da utvrdim kakva je prevalenca ovog polimorfizma u našoj populaciji, da li statini pokazuju željenu efikasnost i da li postoji potreba za registracijom nove grupe lijekova koja će biti efikasna kod pacijenata, nosioca ovog polimorfizma. (18,19,20,21)

SLCO1B1 gen nalazi se na 12p12.2 hromozomu. Ovaj gen kodira protein transporter OATP1B1 koji se nalazi na bazalnoj strani hepatocita i zadužen je za unos statina u ćeliju jetre.

Nosioци CC genotipa kod rs4149056 (521T>C) polimorfizma su povezani sa smanjenom aktivnošću ovog transportera, stoga ti pacijenti imaju veću koncentraciju statina u plazmi i samim tim veći rizik od neželjenog dejstva, miopatije. Brojne studije su pokazale da osobe sa CC genotipom pokazuju veću u sistemsku izloženost aktivnoj simvastatinskoj kiselini od ispitanika sa TT genotipom, sugerišući da prisustvo ovog polimorfizma može povećati rizik od neželjenih reakcija tokom liječenja simvastatinom, dok se s druge strane smanjuje efikasnost lijeka. Jedna studija navodi da pacijenti nosioци CC genotipa imaju 8.86 veću šansu ( $p < 0.01$ ) da razviju miopatiju uzrokovanu statinima, i kod ovih pacijenata zabilježena je povećana aktivnost enzima kreatinin kinaze (CK). Dosadašnja istraživanja su pokazala da postoji povezanost ovog polimorfizma sa miopatijom indukovanom statinima sa relativnim rizikom od 2.6% po alelu C. Takođe, sugerise se da do 60% pacijenata koji pate od miopatije izazvane statinima mogu taj problem pripisati prisustvu ovog genskog polimorfizma. Stoga je sa ciljem smanjenja miopatije i optimizacije komplijanse, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) je objavio smjernice o upotrebi simvastatina u zavisnosti od genotipa SLCO1B1 gena, jer upravo za njega u literaturi postoje najjači dokazi. Nekoliko zdravstvenih sistema i jurisdikcija uspostavilo je programe farmakogenetičke primjene koji uključuju preventivnu genotipizaciju SLCO1B1. Tu spadaju program PREDICT u Vanderbilu (SAD), PG4KDS u dječjoj istraživačkoj bolnici St. Jude (SAD), program (U-PGk) na nekoliko lokacija u Evropi, program CLIPMERGE PGk na planini Sinaj, INGENIOUS program na Medicinskom fakultetu Univerziteta Indijana, i RIGHT program na klinici Mayo. Prema podacima PharmGKB frekvencija C alela kod Evropljana je 15.9%, stoga želim da utvrdim kakva je prevalenca ovog polimorfizma u našoj populaciji, da li postoji potreba za uvođenjem preventivnog farmakogenetičkog skrininga i kod nas, kao i potreba za registracijom novih grupa hipolipemika. (2,13,20,22,25)

Nosioци rs2306283 (388A>G) polimorfizma karakteriše pojačana aktivnost OATP1B1 transportera zbog čega posleđično imamo pojačanu izloženost jetre statinima. Jedna studija je pokazala da ispitanici koji su koristili simvastatin, a bili nosioци AA genotipa bili povezani sa povećanom aktivnošću jetrenih enzima ALT, AST. S druge strane, studija navodi da je kod nosioca GG genotipa značajno pojačan odgovor na simvastatin. Takođe, druga studija potvrđuje povezanost GG genotipa i pojačane efikasnosti atorvastatina, što sugerise da bi poznavanje ovog polimorfizma, mogao biti važan marker u predviđanju efikasnosti terapije za snižavanje lipida, i da bi se kod ovakvih pacijenata isti efekat mogao postići nižom dozom statina. Prema podacima PharmGKB frekvencija G alela kod Evropljana je 40.17%, stoga želim da utvrdim kakvo je stanje u našoj populaciji, da li postoji potreba za uvođenjem preventivnog farmakogenetičkog testa, nakon koga bi korigovali dozu ili mijenjali terapiju nekim drugim hipolipemikom. (24,26)

ABCB1 gen nalazi se na 7q21.1 hromozomu. Ovaj gen kodira transporter P glikoprotein, koji funkcioniše kao eflux pumpa, tj izbacuje lijek iz ćelije. Na taj način P glikoprotein omogućava ekskreciju statina putem bubrega ili jetre s jedne strane, odnosno apsorpciju lijeka sa druge strane. SNP rs1128503 (1236C>T), rs2032582, (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) su najviše proučavani polimorfizmi, te i najviše zastupljeni u literaturi. Prethodno navedeni polimorfizmi su povezani sa smanjenom funkcijom P glikoproteina, što za

posljedicu može da ima povišenu koncentraciju lijeka u krvi i veći rizik od miopatije kao neželjenog efekta ili pak nedovoljnu efikasnost zbog loše apsorpcije. Rađen je veliki broj studija na ovu temu, međutim dobijeni rezultati su kontradiktorni. Ferrari i saradnici prijavili su značajno ( $P = 0.013$ ) veću učestalost alela 1236T i 3435T u grupi slučajeva u poređenju sa kontrolnom grupom (grupu slučajeva činila su 23 pacijenta sa povišenom koncentracijom CK u krvi, koja je bila na terapiji simvastatinom). Hoenig i saradnici takođe su prijavili znatno veću učestalost 3435T alela kod pacijenata sa miopatijom indukovanom atorvastatinom u poređenju sa kontrolnom grupom koja je takođe koristila atorvastatin, ali bez miopatije. Sa druge strane, Hermann i saradnici nijesu potvrdili rezultate o razlici u učestalosti alela ABCB1 3435T kod miopatije uzrokovane atorvastatinom u studiji slučajeva i kontrola. Takođe, DeGorter i saradnici nijesu potvrdili povezanost između 2677T alela i koncentracije atorvastatina u studiji slučajeva i kontrola, dok s druge strane druga studija navodi da oni pacijenti sa haplotipom TTT (aleli 1236T, 2677T i 3435T) imaju AUC koja je gotovo 60% veća za simvastatinsku kiselinu i 55% veća za atorvastatinsku kiselinu u poređenju sa onima sa CGT haplotipom ( $p = 0.039$  i  $p < 0.025$ ). Takođe su oprečni i podaci o povezanosti ovih polimorfizama sa efikasnošću statinske terapije. Naime, jedna studija je pokazala da je polimorfizam rs1045642 (C3435T) povezan sa efikasnošću statina, tj. da se kod pacijenata sa 3435TT genotipom bilježi smanjena efikasnost atorvastatina u pogledu smanjenja LDL-h. S druge strane, druga studija navodi da su nosioci TT genotipa kod polimorfizama 2677G>T i 3435C>T bili značajno povezani sa većim smanjenjem LDL-h, tj. većom efikasnošću statinske terapije. Stoga, zadatak ovog istraživanja je da utvrdi zastupljenost ovih polimorfizama u našoj populaciji i da donese zaključke o uticaju ovih polimorfizama na efikasnost i pojavu neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije, čime će se dati doprinos naučnoj zajednici. (2,13,17, 20,22,27,28)

#### **Cilj i hipoteze**

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi frekvencu alela i genotipova u navedenim genima unutar ispitivane grupe;
2. Ispitati postojanje korelacije polimorfizama u ispitivanim genima sa nedovoljnom efikasnošću statinske terapije u ispitivanoj grupi;
3. Ispitati postojanje korelacije polimorfizama u ispitivanim genima sa pojavom neželjenih efekata u ispitivanoj grupi (hepatotoksičnost, miopatija);
4. Procjeniti koje od farmakogenetičkih testova bi trebalo uključiti u rutinskoj kliničkoj praksi;
5. Procjeniti da li postoji potreba za registracijom novih grupa hipolipemika kako bi se zadovoljile terapijske potrebe pacijenata sa dislipidemijama u Crnoj Gori.

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljene su sledeće hipoteze:

1. H01: Postoji povezanost između polimorfizama ispitivanih gena zaduženih za metabolisanje holesterola i lijeka, i nedovoljne efikasnosti lijeka, koji se koristi u terapiji dislipidemije.
2. H02: Postoji povezanost između polimorfizama ispitivanih gena zaduženih za metabolisanje holesterola i lijeka, i neželjenih efekata lijeka, koji se koristi u terapiji dislipidemije.

#### **Materijali, metode i plan istraživanja**

Istraživanje će se sprovesti na Medicinskom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici. Za

sprovedenje istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj: 2050/7 od 10.12.2020.) Istraživanjem je planirano obuhvatiti najmanje 200 ispitanika.

Veličina uzorka u literaturi, prilikom izvođenja sličnih istraživanja, varira, u zavisnosti od toga da li je cilj samog istraživanja genotipizacija populacije ili pak pravljenje korelacije između efikasnosti ili pojave neželjenih efekata sa alelima i genotipovima kod korisnika statinske terapije. U svrhu genotipizacije ABCB1 gena u Finskoj regrutovana su 534, dok je u Srbiji 158 ispitanika. S druge strane, za pravljenje korelacije uzimani su uzorci manje veličine. Tako je, na primjer, sprovedeno istraživanje u Kanadi obuhvatilo 106 ispitanika, Indiji 177, Italiji 183, Španiji 100, Brazilu 136, SAD-u 324 i Kini 542 ispitanika. S obzirom na to da je cilj ovog istraživanja pored utvrđivanja prevalencije alela i genotipova u navedenim genima i utvrđivanje povezanosti prisutnih alela i genotipova sa nedovoljnom efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije, bilo je potrebno naći neki kompromis. Uzimajući u obzir veličinu crnogorske populacije, veličine uzoraka iz literature, kao i finansijsku izvodljivost, odlučeno je da uzorak bude veličine 200 ispitanika. (16,17,18,19,21,24,26,28,32)

Garantovana je anonimnost svim ispitanicima koji se budu uključili u istraživanje, kako u toku studije, tako i nakon nje.

**Kriterijumi za uključivanje u istraživanje** U istraživanje će biti uključeni ispitanici sa dislipidemijom stariji od 18 godina, koji koriste u terapiji atorvastatin, statin sa najvećom potrošnjom u Crnoj Gori, i koji su na terapiji atorvastatinom najmanje 8 nedjelja.

**Kriterijumi isključenja** Iz istraživanja će biti isključeni ispitanici koji piju lijekove koji djeluju kao induktori ili inhibitori OATP1B1 transportera, P glikoproteina ili CYP 3A4 enzima, koji uz statine piju druge hipolipemike, koji imaju nepotpunu medicinsku dokumentaciju, pacijenti sa neurološkim, psihotičnim, onkološkim, autoimunim oboljenjima, hipotiroidizmom, pacijenti koji zloupotrebljavaju psihoaktivne supstance u poslednjih godinu dana, pacijenti koji zloupotrebljavaju alkohol i nekomplijantni pacijenti, tj. pacijenti koji imaju manje od 6 poena u upitniku za komplijansu Morisky Medication Adherence Scale, sa izuzetkom onih kod kojih su razlog ne-komplijanse neželjena dejstva.

Nakon potpisivanja Pristanka informisanog ispitanika od strane pacijenata koji zadovoljavaju kriterijume uključivanja u studiju pristupiće se prikupljanju podataka kroz upitnike. Prvo će se sa ispitanicima proći kroz Strukturisani socio-demografski upitnik kojim će se prikupiti socio-demografski podaci i podaci koji se odnose na prisutne komorbiditete, stil života, liječenje pacijenata i samu terapiju statinima. Potom će ispitanici popuniti Upitnik o neželjenim dejstvima koji su možda povezani sa statinskom terapijom. Zatim će se pristupiti mjerenju: visine, težine pacijenta i računati BMI index po formuli težina (kg) / (visina (m))<sup>2</sup>, kao i mjerenju krvnog pritiska. Pregledom medicinske dokumentacije će se uzeti podaci o dijagnozi pacijenta, o tome koliko dugo je pacijent na statinskoj terapiji, da li su vršene promjene u dozi ili vrsti statina, ako jesu zbog čega, pregled laboratorijskih nalaza lipidnog statusa prije uključivanja statinske terapije. Na osnovu rezultata ovih nalaza i prisutnih komorbiditeta odradiće se procjena kardiovaskularnog rizika evropskom (SCORE) skalom za svakog pacijenta pojedinačno. SCORE skala se koristi za procjenu desetogodišnjeg rizika od nastanka KVB, uzimajući u obzir tradicionalne faktore rizika za KVB, kao što su starost, status pušenja, vrijednost krvnog pritiska i lipidni status. Koristiće se SCORE skala sa visokim rizikom, jer Crna Gora pripada zemljama Evrope sa visokim rizikom od smrtnog ishoda, koji je posledica kardiovaskularnih bolesti (≥150 na 100000 stanovnika). Na osnovu procijenjenog kardiovaskularnog rizika odrediće se

individualne željene vrijednosti LDL-h koje bi terapijom pacijent trebao da postigne, prema preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine. Prema dobijenim vrijednostima KV rizika, moguća je klasifikacija ispitanika u čak 7 grupa (<1%, 1%, 2%, 3% - 4%, 5% - 9%, 10% - 14%,  $\geq 15\%$ ) međutim zbog veličine uzorka i statističke značajnosti, izvršice se podjela ispitanika u dvije grupe na osnovu dobijenih vrijednosti KV rizika, kao što je navedeno u nastavku. (12)

Pacijente ćemo prvo podijeliti u 2 grupe prema dužini upotrebe statinske terapije i to: na one koji su na terapiji atorvastatinom od najmanje 2 mjeseca do godinu dana, (u tom periodu najčešće se javljaju neželjena dejstva kao miopatija ili hepatotoksičnost), (20, 29) i na one koji su na statinskoj terapiji preko godinu dana. Potom će se pacijenti u okviru te 2 grupe dijeliti na dvije podgrupe u zavisnosti od dobijenih vrijednosti KV rizika SCORE skalom, i to na: grupu sa niskim i umjerenim rizikom od nastanka KV bolesti (<5%) i grupu sa visokim i veoma visokim rizikom ( $\geq 5\%$ ). Potom će se pristupiti uzimanju uzorka krvi za biohemijske i genetske analize.

Uzorkovanje krvi se radi iz kubitalne vene u epruvetama od 2 ml za biohemijske analize i epruvetama sa EDTA od 2 ml za genetske analize. Venepunkcija se ne razlikuje ni na koji način u odnosu na standardno uzorkovanje krvi za kompletnu krvnu sliku. Krv za biohemijske analize će se odmah po uzorkovanju centrifugirati, alikvotirati i skladištiti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , do momenta analize biohemijskih parametara. Od biohemijskih analiza vršice se mjerenje sledećih parametara: kompletna krvna slika (KKS), hs-CRP, lipidni status (LDL, HDL, TG, ukupni holesterol), aktivnost jetrenih enzima (ALT, AST), zatim kreatinin kinaze (CK), koncentracija glukoze u krvi i glikoziliranog hemoglobina, prema protokolu referentne laboratorijske dijagnostike. (30, 31)

Genetske analize obaviće se Real Time PCR metodom u laboratoriji Medicinskog fakulteta. Analiziraće se sljedećih 7 polimorfizama: rs 3808607 (204A>C) u CYP7A1 genu, rs3846662 (23092A>G) u HMGCR genu, rs2306283 (388A>G) i rs4149056 (521T>C) u SLCO1B1 genu i rs1128503 (1236C>T), rs2032582, (G2677T/A) i rs1045642 (C3435T) u ABCB1 genu. Od svih pacijenata će biti uzorkovano 2ml venske krvi u EDTA epruveti. Krv za molekularnu analizu će se čuvati u frižideru na  $+4$  stepena do 7 dana i za to vrijeme odraditi izolacija DNK iz uzoraka primjenom komercijalnog kita. Dobijeni ekstrakti DNK, biće zamrznuti na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Prije PCR metode radiće se kvantifikacija DNK UV spektrofotometrom, kako bi se osiguralo da svi uzorci imaju potrebnu i ujednačenu koncentraciju DNK, za planiranu PCR analizu. PCR analiza odradiće se upotrebom Taqman genotyping assay-a, komercijalnog kita koji sadrži prajmere i probe specifične za svaki polimorfizam, prema protokolu proizvođača.

Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program), nakon čega će se ispitivati postojanje korelacije prisutnih genotipova sa efikasnošću i podnošljivošću statinske terapije. U cilju ispitivanja korelacije između polimorfizama u ispitivanim genima i efikasnosti i podnošljivosti terapije, poređenje će se vršiti između prethodno navedenih grupa i podgrupa studijske grupe. Poređenje će se praviti između ispitanika kojima je terapija bila efikasna i onih kojima nije, a poređenje podnošljivosti će se vršiti između onih ispitanika koji su imali neželjena dejstva, ili pak povišene biohemijske parametre koji na njih ukazuju, sa onima koji to nijesu.

**Kriterijumi za efikasnost terapije** Za terapiju atorvastatinom možemo reći da je efikasna ukoliko su dostignute prethodno izračunate ciljane vrijednosti LDL-h ili ukoliko su spuštene bazalne vrijednosti LDL-h za 50%. Takođe, u obzir se mora uzeti i to da li je pacijentu, kom terapija nije efikasna po prethodno navedenim kriterijumima, dozirana maksimalna tolerišuća

doza atorvastatina. Ukoliko nije, potrebno je prikupiti informacije o tome da li je pacijentu bila dozirana maksimalna tolerišuća doza, ali je zbog pojave neželjenih efekata vraćena na nižu, ili pak uopšte nije ni uvedena veća doza. U tom slučaju, daće se preporuka njegovom ljekaru za povećanjem doze i ispratiti lipidni status tog pacijenta nakon 6 nedjelja. Podaci o maksimalnoj tolerišućoj dozi statina, kao i podaci o efikasnosti različitih doza i vrsta statina mogu se pronaći u preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine.

**Kriterijumi za podnošljivost terapije** Procjena podnošljivosti statina vršiće se na osnovu Upitnika o neželjenim efektima statina, kao i praćenjem biohemijskih parametara ALT, AST i CK. Značajnim će se smatrati povećanje serumskih koncentracija ovih enzima koje je  $\geq 3$  puta u odnosu na normalne vrijednosti.

#### Statistička obrada

Pristupiće se statističkoj obradi i analizi dobijenih podataka i utvrđivanju statističke značajnosti povezanosti polimorfizama i njihovih kombinacija u prethodno navedenim genima sa efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije. Statistička analiza obuhvataće: deskriptivnu analizu karakteristika ispitanika, analizu različitih kategorija varijabla preko svojih apsolutnih i relativnih frekvencija izračunavanjem numeričke srednje i standardne devijacije ili medijanom i percentilima 25 i 27. Planirano je primijeniti jednovarijantnu analizu varijanse (ANOVA) za svaki alel i genotip, kao i multivarijantnu analizu varijanse (MANOVA) za sve alele. Nakon toga je planirano uraditi za svaku ANOVA analizu post hoc testiranje statističke značajnosti uočenih razlika koristeći se Fisher LSD testom. Za upoređivanje frekvencije alela i genotipova koristiće se Hi-kvadrat statistički test.

U svrhu komparacije grupa po varijablama koje su uključene u analizu, koristiće se Studentov t-test za nezavisne uzorke. U slučaju da distribucije podataka i rezultata budu statistički značajno odstupale od normalne krive, kao alternativna tehnika koristiće se Mann-Whitney U test. Za usporedbe tipa pretest-posttest koristiće se t-test za ponovljena mjerenja (zavisne uzorke) ili njegov neparametrijski pandan Wilcoxonov test.

U svrhu procjene asocijacije među ispitivanim varijablama, koristiće se Pearsonov (produkt-moment) koeficijent korelacije ( $r$ ). Alternativno, ukoliko raspodjela podataka/rezultata bude statistički značajno odstupala od normalne, koristiće se Spearmanov koeficijent rang korelacije ( $r_s$ ).

Podaci će biti prikazani tekstualno, tabelarno i grafički, uz korišćenje MS Excel, a statističke analize biće sprovedene uz pomoć SPSS softvera verzija 18.

#### Istraživanje će biti sprovedeno kroz sljedeće aktivnosti:

1. S obzirom na to da je dobijena saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore (broj 2050/7 od 10.12.2020.) pristupiće se prikupljanju uzorka pacijenata starijih od 18 godina sa dislipidemijom, koji su na terapiji atorvastatinom. To će biti ispitanici koji dolaze na kontrolu u privatne i javne zdravstvene institucije: Klinički centar Crne Gore, Codru, Ordinaciju Boljević. KCCG je jedan od partnera na projektu CEBIMER, stoga postoji saglasnost za regrutovanje ispitanika u toj zdravstvenoj ustanovi. U slučaju da se u KCCG ne prikupi definisani broj ispitanika, pristupiće se regrutovanju iz preostalih navedenih zdravstvenih ustanova, od kojih će se prethodno tražiti saglasnost za regrutovanje ispitanika.

2. Prvo će ispitanici popunjavati Upitnik za isključenje ispitanika iz studije i Upitnik za komplijansu Morisky Medication Adherence Scale.



3. Pacijentima, koji odgovaraju kriterijumima za uključanje u istraživanje, biće predočen na jasan način, u usmenoj i pismenoj formi, cilj i svrha istraživanja, kao i prava koja su im zagantovana. Pacijenti koji pristanu da se uključe u istraživanje potpišaće Pristanak informisanog ispitanika.

4. Takvi ispitanici pristupiće popunjavanju Strukturisanog socio-demografskog upitnika. Potom će popuniti i Upitnik o neželjenim dejstvima, pristupiće se antropometrijskom mjerenju i mjerenju krvnog pritiska, pregledu medicinske dokumentacije i uzorkovanju venske krvi iz kubitalne vene, po principima Dobre laboratorijske prakse, koja će služiti za genetske i biohemijske analize

5. Potom će se za svakog pacijenta ponaosob računati 10-godišnji kardiovaskularni rizik SCORE skalom, uzimajući u obzir podatke sa početka terapije, i na osnovu dobijenih rezultata preračunati koje vrijednost LDL-h treba postići statinom kod tih pacijenata, vodeći se preporukama Evropskog udruženja kardiologa za dislipidemije iz 2019. godine.

6. Svi podaci o pacijentima dobijeni iz upitnika, kao i prethodno pomenuti proračuni, biće unošeni u bazu podataka (Excel), a ispitivani učesnici će po završetku intervjua biti podijeljeni u 2 grupe prema dužini upotrebe statinske terapije i to na one koji su na terapiji od 2 mjeseca do godinu dana, i na one koji su na terapiji preko godinu dana, a potom i u dvije podgrupe u zavisnosti od dobijene vrijednosti KV rizika SCORE skalom na one sa niskim i umjerenim rizikom od nastanka KV bolesti (<5%) i na one sa visokim i veoma visokim rizikom od nastanka KV bolesti (≥5%).

7. Potom će se raditi biohemijske i molekularno-genetičke analize prema prethodno navedenom protokolu.

8. Statističkim metodama biće obrađeni dobijeni rezultati istraživanja (SPSS program), nakon čega će se ispitivati postojanje korelacije prisutnih genotipova sa efikasnošću i podnošljivošću statinske terapije.

9. Promocija rezultata doktorske disertacije predviđena je kroz objavljivanje radova u časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i prezentaciju rukovodiocima institucija od značaja (Kliničkog centra Crne Gore, Republičkog Fonda za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja, Instituta za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore) u cilju uvođenja individualnog pristupa u liječenju ovih pacijenata, ali i u cilju planiranja stručnog kadra, pokrivanja troškova liječenja i registracije novih grupa hipolipemika.

#### **Očekivani naučni doprinos**

Klasična medicina daje jedan lijek svim osobama koje imaju određenu bolest. Međutim, samo dvije trećine pacijenata ima korist od svoje terapije. Prema najnovijim istraživanjima jedan od tri lijeka koje pacijent trenutno primjenjuje ne postiže željeni rezultat. Postavlja se pitanje zašto je to tako kad su lijekovi isti? Lijekovi jesu isti, ali pacijenti nijesu. Stoga, budućnost leži upravo u personalizovanoj terapiji, tj. individualizaciji terapije zahvaljujući DNK informacijama. Primjena tehnika molekularne genetike u medicinskoj praksi jedan je od najmodernijih pristupa današnjice. Primjenom ovih tehnika kod pacijenata sa dislipidemijom steći će se saznanja o prevalenciji navedenih polimorfizama u crnogorskoj populaciji, a zatim i napraviti korelacija između uočenih alela i genotipova sa efikasnošću i pojavom neželjenih efekata kod korisnika statinske terapije. Istraživanje ovog tipa će se prvi put raditi u našoj zemlji. Rezultati koji će proisteći iz ove studije

omogućiće početak primjene farmakogenetike u kliničkoj praksi, tj. dati smjernice na osnovu kojih će moći da se odabere pravi lijek u optimalnoj dozi, tj. terapija sa manjim rizikom a boljim efektom, po mjeri svakog pacijenta. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata procjeniće se da li postoji potreba za registracijom novih grupa hipolipemika kako bi se zadovoljile terapijske potrebe pacijenata sa dislipidemijama u Crnoj Gori. U Holandiji možete ući u svaku apoteku sa svojim DNK informacijama i svaki farmaceut vam može na osnovu tih podataka reći koju dozu i lijek možete koristiti. I druge zemlje pokušavaju da naprave svoje baze podataka iz kojih bi dijelili informacije sa drugim zemljama u cilju praćenja reakcija pacijenta i djelotvornosti lijeka. Stoga, težiće se, na osnovu dobijenih rezultata, kreiranju jedne takve baze i u Crnoj Gori, pri čemu će zdravstveni sistem Crne Gore iste moći da dijeli i komparira sa zemljama koje su uspostavile personalizovanu terapiju. Zatim je predviđena i promocija rezultata doktorske disertacije kroz objavljivanje radova u naučnim časopisima, prezentaciju dobijenih rezultata na naučnim i stručnim skupovima, kao i rukovodiocima institucija od značaja (Klinički centar Crne Gore, Republički Fond za zdravstveno osiguranje Crne Gore, Ministarstva zdravlja, Institut za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore) i pružanje uvida društvenoj zajednici o najnovijim dostignućima u kliničkoj implementaciji ove oblasti u Crnoj Gori. I na kraju, nadam se da će rezultati ovog istraživanja dati podstrek drugim mladim istraživačima da nastave sa istraživanjima ovog tipa i u drugim oblastima medicine i doprinesu razvoju i primjeni „savremene” personalizovane terapije u Crnoj Gori na dobrobit zdravlja njenih stanovnika.

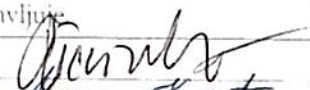
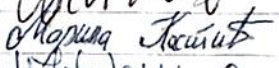
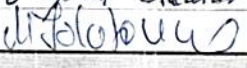

**Spisak objavljenih radova kandidata**

Lalatović N., Duborija Kovačević N. Interakcije lijekova kao posljedica polifarmacije u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Rad prihvaćen za Treći kongres farmaceuta u Crnoj Gori sa međunarodnim učešćem., 2019.godine.

**Popis literature**

1. [www.calims.mc](http://www.calims.mc)
2. Arrigoni E, Del Re M, Fidilio L, Fogli S, Danesi R, Di Paolo A. Pharmacogenetic Foundations of Therapeutic Efficacy and Adverse Events of Statins. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 104.
3. Reiner Ž. Resistance and intolerance to statins. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2014; 24(10): 1057–1066.
4. Reiner Ž, Tedeschi-Reiner E. Prevalence and types of persistent dyslipidemia in patients treated with statins. *Croat Med J* 2013; 54: 339-345.
5. Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril* 2018; 109: 952–963.
6. Zhang G, Nebert DW. Personalized medicine: Genetic risk prediction of drug response. *Pharmacol Ther* 2017; 175: 75–90.
7. Ference, B. A., Yoo, W., Alesh, I., Mahajan, N., Mirowska, K. K., Mewada, A., Flack, J. M. et al (2012). Effect of Long-Term Exposure to Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Beginning Early in Life on the Risk of Coronary Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(25), 2631–2639
8. Tran DT, Palfrey D, Lo TKT, Welsh R. Outcome and Cost of Optimal Control of Dyslipidemia in Adults with High Risk for Cardiovascular Disease. *Can J Cardiol* 2020; S0828-282X: 30277-4.
9. Anebo ZG, Abacioglu N. Non-adherence to statins therapy and its impact on cardiac morbidity and mortality: A meta-analysis. *Afr J Pharm Pharmacol* 2019; 13: 338-358.
10. Ward NC, Watts GF, Eckel RH. Statin Toxicity. *Circ Res* 2019; 124: 328–350.
11. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, Libby P, Raichlen JS, Ballantyne CM. Effect of Very High-Intensity Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis. *JAMA* 2006; 295: 1556-1565.
12. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk, 2019.
13. Maggo SDS, Kennedy MA, Clark DWJ. Clinical Implications of Pharmacogenetic Variation on the Effects of Statins. *Drug Safety*, 2011; 34(1): 1–19.
14. Qayyum F, Lauridsen B, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard B, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variants in CYP7A1 and risk of myocardial infarction and symptomatic gallstone disease. *Atherosclerosis*, 2017; 263: e21.

15. Demikova N, Chernatska O, Lidiya C, Mazur T. The relationship between lipid metabolism and the level of albuminuria with single nucleotide polymorphism 204A>C (rs3808607) CYP7A1 gene in patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis* 2019; 26(3): 253-260
16. Kajinami K, Brousseau M, Ordovas J, Schaefer E. A promoter polymorphism in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase interacts with apolipoprotein E genotype in the LDL lowering response to atorvastatin. *Atherosclerosis* 2005; 180: 407–415.
17. Kadam P, Ashavaid TF, Ponde CK, Rajani RM. Genetic determinants of lipid-lowering response to atorvastatin therapy in an Indian population. *J Clin Pharm Ther* 2016; 41: 329–333.
18. Leduc V, Bourque L, Poirier J, Dufour R. Role of rs3846662 and HMGCR alternative splicing in statin efficacy and baseline lipid levels in familial hypercholesterolemia. *Pharmacogenet Genom.* 2016; 26(1): 1–11.
19. Angelini S, Rosticci M, Massimo G, Musti M, Ravegnini G, Consolini N, et al. Relationship between Lipid Phenotypes, Overweight, Lipid Lowering Drug Response and KIF6 and HMG-CoA Genotypes in a Subset of the Brisighella Heart Study Population. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017; 19(1): 49.
20. Kitzmiller J, Mikulik E, Dauki A, Mukherjee C, Luzum J. Pharmacogenomics of statins: understanding susceptibility to adverse effects. *Pharmacogenomics Pers Med* 2016; 9: 97–106.
21. Cano-Corres R, Candás-Estébanez B, Padró-Miquel A, Fanlo-Maresma M, Pintó X, Alía-Ramos P. Influence of 6 genetic variants on the efficacy of statins in patients with dyslipidemia. *J Clin Lab Anal* 2018; 32: e22566.
22. 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. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2014; 70(5): 539–547.
23. Peters BJ, Rodin A S, Klungel OH, van Duijn CM, Stricker BH C, Slot R, et al. Pharmacogenetic interactions between ABCB1 and SLCO1B1 tagging SNPs and the effectiveness of statins in the prevention of myocardial infarction. *Pharmacogenomics*, 2010; 11(8): 1065–1076.
24. Wu X, Gong C, Weinstock J, Cheng J, Hu S, Venners SA, et al. Associations of the SLCO1B1 Polymorphisms With Hepatic Function, Baseline Lipid Levels, and Lipid-lowering Response to Simvastatin in Patients With Hyperlipidemia. *Clin Appl Thromb Hemost* 2018; 24: 240-247.
25. Kansu B, Lang D. Genetic polymorphisms as predictive markers for statin therapy: a route to improved cardiovascular patient outcomes? *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 2017; 10: hzx010
26. Rodrigues AC, Perin PM, Purim SG, Silbiger VN, Genvigir FD, Willrich MA, et al. Pharmacogenetics of OATP transporters reveals that SLCO1B1 c.388A>G variant is determinant of increased atorvastatin response. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 5815-5827.
27. Hoenig MR, Walker PJ, Gurnsey C, Beadle K, Johnson L. The C3435T polymorphism in ABCB1 influences atorvastatin efficacy and muscle symptoms in a high risk vascular cohort. *J Clin Lipidol* 2011; 5: 91–96.
28. Keskitalo J, Kurkinen K, Neuvonen P, Niemi M. ABCB1 Haplotypes Differentially Affect the Pharmacokinetics of the Acid and Lactone Forms of Simvastatin and Atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 457–461
29. Karahalil B, Hare E, Koc G, Uslu I. Hepatotoxicity is associated with statins. *Arh Hig Rada Toksicol* 2017; 68: 254-260.
30. Chaipichit N, Krska J, Pratipanawat T, Jarernsiriornkul N. Statin adverse effects: patients' experiences and laboratory monitoring of muscle and liver injuries. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 2015; 37(2): 355–364.
31. Xian-Yu J, Feng J, Chen Y, Yang Y. Effects of simvastatin and atorvastatin on biochemical and hematological markers in patients with risk of cardiovascular diseases. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015; 8(8): 13983–13989.
32. Milojkovic M, Stojnev S, Jovanovic I, Ljubisavljevic S, Stefanovic V, Sunder-Plassman R. Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacological Reports*, 2011; 63(3): 808–814.

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM		
Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje:		
Prvi mentor	Doc. dr Snežana Pantović	
Drugi mentor	Prof. dr Marina Kostić	
Doktorand	Dr pharm. Ninoslava Lalatović	
IZJAVA		
Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.		
U Podgorici, 19.04.2021.		
Ime i prezime doktoranda 		

Na osnovu člana 165 stava 1 Zakona o opštem upravnom postupku ("Službeni list RCG", broj 60/03.), člana 115 stava 2 Zakona o visokom obrazovanju ("Službeni list CG", broj 44/14.) i službene evidencije, a po zahtjevu studenta Lalatović Nebojša Ninoslava, izdaje se

## UVJERENJE O POLOŽENIM ISPITIMA

Student **Lalatović Nebojša Ninoslava**, rođena **07-08-1993** godine u mjestu **Nikšić**, opština **Nikšić**, Republika **Crna Gora**, upisana je studijske **2018/2019** godine, u **I** godinu studija, kao student koji se **samofinansira** na **doktorske akademske studije**, studijski program **FARMACIJA**, koji realizuje **MEDICINSKI FAKULTET - Podgorica** Univerziteta Crne Gore u trajanju od **3 (tri)** godine sa obimom **180 ECTS** kredita.

Student je položio ispite iz sljedećih predmeta:

Redni broj	Semestar	Naziv predmeta	Ocjena	Uspjeh	Broj ECTS kredita
1.	1	BIOSTATISTIKA	"A"	(odličan)	10.00
2.	1	MEDICINSKA INFORMATIKA	"B"	(vrlodobar)	10.00
3.	1	METODOLOGIJA NAUČNOG ISTRAŽIVANJA	"A"	(odličan)	10.00
4.	2	METODOLOGIJA U ISTRAŽIVANJU SOCIJALNE FARMACIJE	"A"	(odličan)	10.00
5.	2	PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE		(položio)	5.00

Zaključno sa rednim brojem **5**.

Ostvareni uspjeh u toku dosadašnjih studija je:

- srednja ocjena položenih ispita "A" (9.75)
- ukupan broj osvojenih ECTS kredita **45.00** ili **75.00%**
- indeks uspjeha **7.31**.

*Uvjerjenje se izdaje na osnovu službene evidencije, a u svrhu ostvarivanja prava na: (dječji dodatak, porodičnu penziju, invalidski dodatak, zdravstvenu legitimaciju, povlašćenu vožnju za gradski saobraćaj, studentski dom, studentski kredit, stipendiju, regulisanje vojne obaveze i slično).*

Broj:  
Podgorica, 28.04.2021 godine



SEKRETAR  
*[Signature]*