

Повезаност полиморфизама гена за рецепторе фактора раста и протеине који регулишу интегритет ванћелијског матрикса са исходом терапије нинтеданибом код пацијената са прогресивном плућном фиброзом

Прогресивна плућна фиброза (ППФ) је скуп обољења који обухвата идиопатску плућну фиброзу (ИПФ) и друге форме интерстицијских болести плућа (ИБП) које, без обзира на етиологију, имају сличан ток прогресивне фиброзе, погоршање плућне функције, развој респираторне инсуфицијенције што резултира повећаним морталитетом (1,2).

Циљ лечења прогресивне плућне фиброзе јесте успоравање прогресије болести, очување плућне функције, превенција егзацербација и побољшање квалитета живота. Лечење ППФ се значајно променило у последњих 10 година захваљујући увођењу антифибротичне терапије, међу којима нинтеданиб заузима централно место. Клиничке студије (*INBUILD*, *SENSCIS*, *INPULSIS*) показале су да нинтеданиб значајно смањује пад форсираног виталног капацитета (енгл. *forced vital capacity*, FVC), што представља главни параметар за процену прогресије болести и то без обзира на основни узрок фиброзе (3–5). У клиничкој пракси, ефикасност терапије нинтеданибом се процењује најчешће на основу промене форсираног виталног капацитета (FVC), дифузијског капацитета за угљен моноксид (енгл. *Diffusing Capacity of the Lungs for Carbon Monoxide*, DLCO), шестоминутног теста хода, као и броја и тежине акутних егзацербација, параметара јетрене функције и симптома гастроинтестиналног система уз субјективне показатеље попут скала диспнеје и квалитета живота (3–5). Најчешћи нежељени ефекти терапије нинтеданибом су гастроинтестинални, пре свега дијареја, која се јавља код више од 60% пацијената, али је у већини случајева блага и може се контролисати симптоматском терапијом. У ређим случајевима могу се јавити повишене трансаминазе и повећан ризик од крварења (3,4).

Нинтеданиб је орални инхибитор тирозин киназа који успорава прогресију болести тако што делује на више путева укључених у фибропролиферацију, ангиогенезу и инфламацију, укључујући PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) и VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) (6). Овај лек делује тако што инхибира активацију фибробласта и смањује продукцију екстраћелијског матрикса (ЕѠМ), посебно колагена, чиме се успорава ремоделирање плућног паренхима. Поред тога, смањује експресију проинфламаторних цитокина (TGF β , TNF α , IL1 β), чиме доприноси модификацији микроокружења које погодује фибрози (6,7).

Полиморфизми у генима који кодирају циљне рецепторе нинтеданиба, као што су *PDGFRB*, *FGFR* и *VEGFR*, могу утицати на експресију и функцију ових протеина, потенцијално мењајући фармакодинамички одговор на терапију (8,9). Полиморфизам rs1870377 (Q472H) *VEGFR2* гена резултира заменом аминокиселине, док је rs2071559 (-

604T>C) смештен у промоторској регији и потенцијално може утицати на транскрипцију *VEGFR2* гена (10,11). Полиморфизми rs2229562 (Q472H) и rs246395 (Leu867Phe) *PDGFRB* гена доводе до замена аминокиселине и тиме утичу на функцију PDGFR β рецептора. Варијанта rs2302273 овог гена, смештена у 5'UTR, може утицати на стабилност иРНК, ефикасност транслације и потенцијално мењати његову експресију (8,10–12).

Како нинтеданиб инхибира пролиферацију фибробласта и смањује продукцију екстрацелуларног матрикса (посебно колагена), ефекат терапије може бити модулисан полиморфизмима у генима који кодирају колагенске подјединице и ензиме за ремоделирање матрикса, попут матрикс металопротеиназа (MMP) (8). Иако смештене у некодирајућим регионима, rs3918241 и rs3918249 варијанте *MMP9* гена могле би утицати на транскрипцију *MMP9* гена, чиме би се мењала експресија ензима и потенцијално доприносило инфламаторним и ремоделирајућим процесима (10,11). Варијанта rs11225395 је влоцирана око 2kb узводно од *MMP8* гена и функционалне анализе су показале да мења функцију његовог промотора, док мисенс варијанта овога гена, rs1940475, утиче на превођње проензима у његову активну форму (13). Такође, варијације у генима који регулишу експресију TGF- β и других профибротичних цитокина могу додатно утицати на терапијски одговор, посредством промена у ћелијском микроокружењу које погодује прогресији фиброзе (6,7). Мисенс варијанта rs1800470 (Pro10Leu) *TGFBI* гена може изменити активност овог сигналног молекула (10,11). Варијанта rs1800012 је лоцирана у *Sp1* везујућем месту промотора и доводи до повећања експресије *COL1A1* гена (10,11,14). Полиморфизам rs12722 који подразумева C/T измену у оквиру 3'UTR региона *COL5A1* гена утиче на стабилност његове mRNA и код носилаца варијанте смањује експресију протеина (10,11,15).

РАДНА ХИПОТЕЗА:

Полиморфизми у генима који кодирају рецепторе фактора раста и генима који кодирају протеине који регулишу интегритет ванћелијског матрикса утичу на ефикасност и нежељена дејства нинтеданиба код пацијената са прогресивном плућном фиброзом.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА:

1. Утврди учесталост генотипова и алела полиморфизама rs2071559 и rs1870377 *VEGFR2* гена, rs2302273, rs2229562 и rs246395 *PDGFRB* гена, rs1800470 *TGFBI* гена, rs3918241 и rs3918249 *MMP9* гена, rs11225395 и rs1940475 *MMP8* гена, rs1800012 *COL1A1* гена, rs12722 *COL5A1* гена).

2. Анализирати повезаност испитиваних полиморфних генских варијанти са ефикасношћу нинтеданиба, која ће се процењивати коришћењем промена *FVC*, дифузијског капацитета за СО и 6-минутног теста хода током редовног праћења оболелих током редовног праћења оболелих од прогресивне плућне фиброзе.
3. Анализирати повезаност испитиваних полиморфних генских варијанти са нежељеним дејствима нинтеданиба код пацијената са прогресивном плућном фиброзом, укључујући: нежељене ефекте гастроинтестиналног система (дијареја, анорексија, мучнина и повраћање), хепатотоксичност (повишене вредности АЛТ и АСТ), токсичне ефекте на коштану срж (тромбоцитопенија, леукопенија и панцитопенија), продужена крварења, тромбоемболијске догађаје, нефротоксичност (повишени нивои урее и креатинина и присуство протеинурије).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

ДИЗАЈН СТУДИЈЕ:

Проспективна студија

МЕСТО И ПЕРИОД:

Клиника за плућне болести, Универзитетски клинички центар Србије; Институт за хуману генетику, Медицински факултет у Београду, у периоду од 2025. до 2026. године.

ИСПИТАНИЦИ:

У ову студију биће укључено најмање 50 оболелих од прогресивне плућне фиброзе којима је дијагноза постављена према *ATS/ERS/JRS/ALAT* критеријумима (16). Сви пацијенти су лечени нинтеданибом дуже од 6 месеци на Клиници за плућне болести Универзитетског клиничког центра Србије. Сви пацијенти укључени у студију биће старости изнад 18 година. Испитаници ће бити детаљно обавештени о циљу студије и потписаће добровољни пристанак за учествовање у истој. Студија је одобрена од стране Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Србије (1088/2), као и од стране управника Института за хуману генетику Медицинског факултета Универзитета у Београду. Критеријум за искључивање је доказана малигна болест плућа.

ТЕСТОВИ ДИСАЈНЕ ФУНКЦИЈЕ

Свим пацијентима ће бити урађени тестови дисајне функције пре увођења нинтеданиба у терапију, као и након три месеца на контролним прегледима током трајања болести и терапије, што је планирано редовним праћењем оболелих од ППФ. Спирометрија ће бити спроведена код свих болесника укључених у студију. Спирометријски параметри који ће се користити у студији су функционални витални капацитет (*FVC*), форсирани експираторни волумен у првој секунди (*FEV1*) и однос функционалног виталног капацитета и форсираног експираторног волумена у првој секунди (*FEV1/FVC*). Дифузијски тест ће бити спроведен код свих оболелих као показатељ функције алвеолокапиларне мембране. Параметри дифузије који ће бити коришћени у студији су дифузијски капацитет (*DLCO*) и коефицијент дифузије (*KCO*). Шестоминутни тест ходања ће бити извођен у затвореном простору на правој путањи дужине 30 метара, мерењем дистанце коју болесник пређе у току шест минута, тако да тест обавља брзином која му одговара, са потребним паузама. Мултислајс скенером грудног коша (МСЦТ) биће одређен алвеоларни и интерстицијски скор.

Подаци о нежељеним ефектима лека ће бити прикупљани и евалуирани током трајања терапије на основу пријављених података од стране пацијената, запажања током лекарских прегледа, као и на основу урађених биохемијских анализа. Нежељени ефекти који ће се пратити су гастроинтестиналног порекла (дијареја, анорексија, повраћање, мучнина), хепатотоксичност (повишене вредности АЛТ и АСТ), токсични ефекти на коштану срж (тромбоцитопенија, леукопенија, панцитопенија), продужена крварења, тромбоемболијски догађаји, нефротоксичност (нивои урее и креатинина, присуство протеина у урину), као и утицај на кардиоваскуларни систем (промене на ЕКГ-у).

МОЛЕКУЛАРНО ГЕНЕТИЧКЕ АНАЛИЗЕ

Тотална геномска ДНК биће изолована методом исољавања из 5 ml крви учесника студије. Концентрација и квалитет изоловане ДНК биће проверени спектрофотометријски. Генотипизација за одабране варијанте (rs2071559 и rs1870377 *VEGFR2* гена, rs2302273, rs2229562 и rs246395 *PDGFRB* гена, rs1800470 *TGFB1* гена, rs3918241 и rs3918249 *MMP9* гена, rs11225395 и rs1940475 *MMP8* гена, rs1800012 *COL1A1* гена, rs12722 *COL5A1* гена) биће вршена коришћењем *TaqMan* есеја. *Real-Time PCR* реакција биће вршена у оптичким плочама са 96 бунарића, у *Real-Time PCR* систему (7500 *Real-Time PCR System*, *Applied Biosystems*).

СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА:

Након генотипизације биће утврђене апсолутне учесталости алела и генотипова, а статистичка обрада биће извршена преко одговарајућих програмских пакета. У описивању података биће коришћене методе дескриптивне статистике (мере централне тенденције и

мере варијабилитета), табелирање и графичко приказивање. У статистичкој анализи података користиће се параметарске и непараметарске статистичке аналитичке методе.

Од метода аналитичке статистике биће коришћене: тестирање нормалности расподеле, једнострука линеарна корелација, методе идентификације емпиријских расподела, методе за процену значајности разлике (Studentов t тест, тест суме рангова и хи-квадрат (χ^2) тест), Spearmanов коефицијент корелације ранга, анализа варијансе и мултипла регресиона анализа.

Величина узорка израчуната је на основу статистичког израчунавања довољног броја јединица посматрања, уз грешку од 0,05 и очекивану прецизност од 3%. На основу тога утврђено је да је потребан број болесника 50 да би студија имала 80% моћи да детектује параметре који имају прогностички значај.

Анализа хаплотипова биће спроведена коришћењем Haploview софтвера (верзија 4.2).

ПРОЦЕНА НАУЧНОГ ДОПРИНОСА

Нинтеданиб заузима значајно место у савременом лечењу прогресивне плућне фиброзе и других интерстицијалних плућних болести, али упркос доказаној ефикасности, клинички одговор на терапију овим леком показује значајну интериндивидуалну варијабилност. Ова хетерогеност у ефикасности и појави нежељених дејстава указује на могући утицај генетичких фактора на ефикасности и безбедности лека. Имајући у виду механизам дејства нинтеданиба и сложену патофизиологију плућне фиброзе, генске варијанте могу утицати на терапијски одговор путем измена сигналних путева, ремоделовања екстрацелуларног матрикса и регулације профибротичних цитокина. Ови ефекти могу бити директни или посредовани променама у ћелијском микроокружењу.

Ова студија има за циљ да, кроз систематску фармакогенетичку анализу, допринесе бољем разумевању молекуларно генетичких механизма који условљавају варијабилност одговора на терапију нинтеданибом код пацијената са прогресивном плућном фиброзом. Очекује се да резултати истраживања помогну у идентификацији генских биомаркера који могу предвидети терапијски одговор и ризик од нежељених дејстава, што би представљало значајан корак ка персонализованом приступу у лечењу оболелих. На тај начин ово истраживање може допринети оптимизацији терапијских стратегија, побољшању клиничких исхода и рационалнијој примени нинтеданиба у свакодневној клиничкој пракси.

ЛИТЕРАТУРА

1. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(5):e44–68.
2. Cottin V, Hirani NA, Hotchkin DL, Nambiar AM, Ogura T, Otaola M, et al. Presentation, diagnosis and clinical course of the spectrum of progressive-fibrosing interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev*. 2018;27(150).
3. Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, Devaraj A, Walsh SLF, Inoue Y, et al. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med*. 2019;381(18):1718–27.
4. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2071–82.
5. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis–Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med*. 2019;380(26):2518–28.
6. Wind S, Schmid U, Freiwald M, Marzin K, Lotz R, Ebner T, Stopfer P, Dallinger C. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of nintedanib. *Clinical pharmacokinetics*. 2019;58(9):1131-47.
7. Ruaro B, Gandin I, Pozzan R, Tavano S, Bozzi C, Hughes M, et al. Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Tolerability and Safety in a Real Life Experience in a Single Centre in Patients also Treated with Oral Anticoagulant Therapy. *Pharmaceuticals*. 2023;16(2):307.
8. Oldham JM, Noth I, Martinez FJ. Pharmacogenetics and interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2016;22(5):456-65.
9. Zhang Z, Miteva MA, Wang L, Alexov E. Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Comput Math Methods Med*. 2012;2012(1):805827.
10. Dyer SC, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barba M, Barnes I, Barrera-Enriquez VP, Becker A, Bennett R, Beracochea M, Berry A, Bhai J. Ensembl 2025. *Nucleic Acids Res*. 2025;53(D1):D948–57.
11. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: The NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308–11.
12. Steri M, Idda ML, Whalen MB, Orru V. Genetic Variants in mRNA untranslated regions. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9(4):e1474.

13. Du J, Jin T, Cao Y, Chen J, Guo Y, Sun M, Li J, Zhang X, Wang G, Wang J. Association between genetic polymorphisms of MMP8 and the risk of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in the population of northern China. *Medicine*. 2016;95(37):e4794.
14. Jin H, van't Hof RJ, Albagha OM, Ralston SH. Promoter and intron 1 polymorphisms of COL1A1 interact to regulate transcription and susceptibility to osteoporosis. *Human molecular genetics*. 2009;18(15):2729-38.
15. Bertuzzi R, Pasqua LA, Bueno S, Lima-Silva AE, Matsuda M, Marquezini M, Saldiva PH. Is the COL5A1 rs12722 gene polymorphism associated with running economy?. *PLoS One*. 2014;9(9):e106581.
16. Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Antoniou KM, Bissell BD, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022;205(9):E18–47.