

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.03.2018. godine, broj 5940/15, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Kliničko genetska analiza pacijenata sa familijarnom amiotrofičkom lateralnom sklerozom u populaciji Srbije“

kandidata dr Ivana V. Marjanovića.

Mentor je prof. dr Zorica Stević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. prof. dr Dragana Lavrnić, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu;
2. prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu;
3. prof. dr Ranko Raičević, redovni profesor, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Ivana V. Marjanovića napisana je na ukupno 137 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 23 tabele i 4 grafikona, od čega su rezultati prikazani kroz 14 tabela i 4 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

Uvod-u ovom poglavlju dat je kompletan uvid u karakteristike amiotrofične lateralne skleroze (ALS) kao multifaktorijalne i multisistemske bolesti koja nastaje usled primarnog oštećenja motornih neurona na nivou kore velikog mozga, jedara moždanog stabla i prednjih rogova kičmene moždine. Oko 90% ALS pacijenata čini tzv. sporadičnu ALS (SALS), dok 5-10% pacijenta ima genetsku ili familijarnu osnovnu bolest (FALS). Do sada je opisano više od 20 gena povezanih sa ALS. Iako su u poslednjih dvadeset godina otkrivene mutacije gena koje se vezuju za ALS, u Srbiji do sada nije rađena sveobuhvatna studija o epidemiološkim i kliničkim karakteristikama pojedinih formi FALS u Srbiji.

Ciljevi rada su precizno definisani i podeljeni u 8 celina. Ciljevi rada bili su sledeći: 1. Molekularno-genetsko ispitivanje pacijenata sa FALS i SALS, uključujući sledeće gene: SOD1, c9orf72, TDP43, ANG i FUS; 2. Određivanje tipičnih kliničkih simptoma i znakova u subpopulaciji pacijenata sa FALS u poređenju sa SALS; 3. Ispitivanje korelacija kliničkih i genetskih karakteristika; 4. Analiza preživljavanja pacijenata sa ALS; 5. Poređenje nalaza neuropsihološkog testiranja pacijenata sa genetskim ALS u poređenju sa SALS bez verifikovanih mutacija; 6. Ispitivanje morfoloških specifičnosti mozga i kičmene moždine pacijenata sa genetskom i sporadičnom formom bolesti pomoću savremenih metoda magnetne rezonancije (MR); 7. Ispitivanje međusobne povezanosti rezultata genetskih, neuropsiholoških i radioloških analiza. 8. Predlozi za redosled budućeg genetskog ispitivanja i genetskog savetovanja kod pacijenata sa ALS u populaciji Srbije, na osnovu dobijenih rezultata istraživanja.

U poglavlju **materijal i metode-** su jasno definisani kriterijumi odabira pacijenata; naglašeno je da je istraživanje treba da ima karakteristike kliničke studije preseka. U ovo ispitivanje uključen je 241 pacijent sa definitivnom ili verovatnom ALS iz hospitalnog registra Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije. Pacijenti su testirani na sledeće mutacije: SOD1 (svih 5 egzona), TDP 43 (egzon 6), FUS (egzon 14 i 15), c9orf72 i ANG. Nakon dobijanja rezultata genetskog ispitivanja, genetska grupa koju je činilo 37 ispitanika poređena je klinički sa 32 SALS pacijenta bez verifikovane mutacije. Neuropsihološko testiranje je sprovedeno kod 22 SOD1 pozitivna ispitanika, 5 SOD1 negativnih ispitanika pozitivnih na druge ALS gene i 82 zdrave kontrole. Primenjivani su specifični testovi za kognitivni skrining ALS pacijenata u koje su uključeni: procena opšteg intelektualnog nivoa, pažnje, pamćenja, vizuospacijalnih i konstrukcionih, egzekutivnih i jezičkih funkcija. Od 69 pacijenata sa ALS, MR pregledom

mozga i vratnog dela kičmene moždine na aparatu od 1,5T je obuhvaćena grupa od 23 genetski determinisanih i 11 iz grupe SALS pacijenata. Kontrolna grupa bila je sastavljena od 34 uparena zdrava ispitanika (samo za MR pregled mozga). Analizirana je debljina korteksa, mikrostruktura puteva bele mase, funkcionalna povezanost delova mozga u stanju mirovanja, kao i analiza strukture kičmene moždine.

Rezultati – u ovom poglavlju detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

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

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 235 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati istraživanja dr Marjanovića pokazuju da je ukupno 37 (15,4%) od 241 pacijenta imalo jednu ili više mutacija u testiranim ALS genima. U genetskoj grupi 27 pacijenta je imalo mutaciju u SOD1 genu (72,9%), šest pacijenata je imalo mutaciju u genu za c9orf72 (16,2%), dva pacijenta mutaciju u ANG genu (5,4%), jedan pacijent je imao mutaciju u TDP43 genu (2,7%) i jedan kombinovanu mutaciju c9orf72, FUS i ANG (2,7%).

Svi SOD1 pozitivni pacijenti imali su spinalni početak bolesti i kod većine (85,2%), prvi simptomi su bili na donjim ekstermitetima. Bulbarni početak je bio češći kod SOD1 negativnih genetski pozitivnih pacijenata. Senzitivni poremećaji su zabeleženi kod 14 (51,9%) SOD1 pozitivnih i dva (20,0%) SOD1 negativna pacijenta ($p>0,05$). Poremećaji sfinkterijalne funkcije registrovani su samo u SOD1 pozitivnoj grupi ($p<0,01$). Opšti kognitivni skrining je pokazao generalno lošije rezultate kod ALS pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima ($p<0,01$). SOD1 pozitivni pacijenti su imali su značajno češće znake egektivne disfunkcije u odnosu na zdrave kontrole ($p<0,01$). Sa druge strane, SOD1 negativni genetski pacijenti su pokazali lošije rezultate u: opštem intelektualnom nivou, verbalnoj i vizuospatijalnoj memoriji, egzekutivnoj funkciji ($p<0,01$), pažnji, kao i jezičkim funkcijama ($p<0,05$) u poređenju sa zdravim kontrolama.

MR pregledom mozga nisu utvrđene značajne razlike u debljini korteksa između pacijenata sa ALS SOD1, SALS pacijenata i zdravih kontrola. U poređenju sa zdravim kontrolama, SALS pacijenti imali su značajno smanjenje frakcije anizotropije i levog i desnog kortikospinalnog puta ($p=0,001$ i $p=0,02$) i povećanu radijalnu difuzivnost levog kortikospinalnog puta ($p=0,01$). Pacijentima sa ALS SOD1 verifikovane su promene koje su po rezultatima bile između zdravih kontrola i SALS pacijenata ($p=0,06$). Posmatrajući sensorimotornu kortikalnu mrežu, SALS pacijenti su pokazali povećanu funkcionalnu povezanost desnog precentralnog korteksa u poređenju sa kontrolama, što pokazuju i analiza voksela i analiza regiona od interesa (ROI). Uz to, ROI analiza je pokazala povećanu funkcionalnu povezanost i levog precentralnog korteksa SALS pacijenata u odnosu na zdrave kontrole ($p=0,05$). ALS SOD1 pacijenti imali su značajno smanjenje srednje vrednosti površine poprečnog preseka cervikalne kičmene moždine od nivoa C2 do nivoa C7 u odnosu na SALS pacijente.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Na samom početku ove analize neophodno je naglasiti da je ovo prvo detaljno istraživanje kliničkih karakteristika ALS pacijenata nosioca genetskih mutacija u Srbiji. Dodatna vrednost ove studije su dobijeni rezultati primene novih metoda neuroradiološke dijagnostike CNS kao i rezultati neuropsihološkog testiranja, koji daju izuzetan doprinos u saznanju o dodatnim specifičnim kognitivnim i MR karakteristikama ALS pacijenata sa genetskom formom bolesti, o čemu postoje malobrojni podaci u literaturi.

Najčešće mutacije u ovom istraživanju identifikovane su u SOD1 genu (73% genetski pozitivnih pacijenata), dok je 27% pacijenata imalo mutacije u sledećim genima: c9orf72, ANG, TDP43 i FUS. Sličan procenat SOD1 pozitivnih pacijenata je registrovan u FALS kohortama iz Japana, Belgije i Škotske (u rasponu od 31 do 71%) (Kaur SJ et al., 2016). Samo 16% genetskih pozitivnih pacijenata u studiji dr Marjanovića su bili nosioci ekspanzije heksanukleotida u c9orf72 genu, dok je učestalost ove genetske promene veća u ALS kohortama iz zapadnih zemalja (Chiò A et al., 2012; Majounie E et al., 2012).

U ovom istraživanju, dr Marjanović je zaključio da 16% ispitanih ALS pacijenata u populaciji Srbije ima mutacije u jednom od testiranih gena, čija je frekvencija 94% u FALS i 9% u SALS grupi. Slična učestalost sporadičnih ALS (8,2%) pacijenata sa genetskom promenom evidentirana je u slovenačkoj populaciji (Vrabec K et al., 2015). U Italiju 67%

pacijenata sa FALS i samo 4,7% pacijenata sa SALS je imalo gensku mutaciju (Chiò A et al., 2012).

Bolji rezultati na kognitivnim testovima kod pacijenata sa SOD1 mutacijom u poređenju sa pacijentima sa drugim mutacijama su u skladu sa nalazima Wicks-a i sar. (Wicks P et al., 2009). Međutim, mora se naglasiti da ovi autori nisu našli znake disegzekutivnog sindroma kod SOD1 pozitivnih pacijenata za razliku od Marjanovića. Rezultati studije dr Marjanovića nisu potvrdili rezultate Rakowicz-a i Hodges-a (Rakowicz WP & Hodges JR., 1998), koji su ukazali da je ALS povezan sa dismnestičkim poremećajima i poremećajima govora - pronalaženjem reči (Abrahams S et al., 2005; Phukan J et al., 2007).

U tezi je pokazano da je raniji početak bolesti povezan sa dužim preživljavanjem obolelih. Postoji opšti konsenzus da je duže vreme preživljavanja u korelaciji sa mlađim uzrastom na početku bolesti (Chio A et al., 2009; Alcaz S et al., 1996; Czaplinski A et al., 2006). Pored toga, rezultati većine studija pokazali su da je spinalni početak bolesti bio prediktor dužeg preživljavanja, što je u skladu i sa nalazima dr Marjanovića (del Aguila MA et al., 2003; Chio A et al., 2009; Logroscino G et al., 2010; Millul A et al., 2005; Czaplinski A et al., 2006). Prethodni rezultati su pokazali da su niži ALSFRS-r skor i brza progresija bolesti negativno povezani sa prognozom ALS (Kaufmann P et al., 2005; Rauchway AC et al., 2007). Podaci u disertaciju su u skladu sa ovim stavovima. Značajno bolje preživljavanje evidentirano je u grupi pacijenata koji su bili na terapiji riluzolom. Do danas dostupnim podacima, riluzol je jedini lek koji usporava progresivni tok ALS (dokazano u četiri kliničke studije klase I) (Turner MR et al., 2002; Bensimon G et al., 1994; Paillisse C et al., 2000; Bensimon G et al., 2002).

Nekoliko MR studija koje su procenjivale pacijente sa ALS SOD1 mutacijama, rađene su na malom uzorku pacijenata. Ove studije su pokazale relativnu očuvanost premotornog/motornog korteksa (Turner MR et al., 2007), a nije bilo ni značajnog mikrostrukturnog oštećenja puteva bele mase (Stanton BR et al., 2009). Studija dr Marjanovića potvrđuje ove nalaze u većoj kohorti pacijenta sa različitim SOD1 mutacijama. Ipak, funkcionalna anizotropija (FA) kortikospinalnog trakta u grupi pacijenta sa ALS SOD1 je pokazala vrednosti između onih dobijenih u grupi SALS pacijenta i zdravih kontrola. Čak je uočen i trend razlike kada se upoređuje FA levog kortikospinalnog trakta. Novija *diffusion tensor* (DT) merenja (Menke RA et al., 2016) motornih puteva mozga u 12 asimptomatskih nosilaca SOD1 mutacije, pokazala su da su ovi ispitanici imali kvalitativne vrednosti merenja između pacijenata sa SALS i zdravih kontrola.

Ovo je prva studija koja je pokazala odsustvo aberantne povezanosti u senzomotornoj mreži u grupi ALS SOD1 pacijenata. Ovaj nalaz je u skladu sa nedavnom studijom koja je procenjivala povezanost senzomotorne mreže u stanju mirovanja kod nosilaca mutacije SOD1 (Menke RA et al., 2016). I strukturni i funkcionalni rezultati MR mozga iz naše studije podržavaju hipotezu da su patološka oštećenja senzomotorne mreže u mozgu kod ALS SOD1 pacijenat blaža nego kod SALS što je u skladu i sa patohistološkim nalazima (Cudkowiec ME et al., 1998; Ince PG et al., 1998).

Važno je istaći da u studiji dr Marjanovića nije pokazano značajno smanjenje debljine korteksa kod SALS pacijenata u poređenju sa zdravim kontrolama. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima većine prethodnih MR studija koje pokazuju atrofiju motornih i ekstrapotornih kortikalnih regiona kod pacijenata sa SALS (Agosta F et al., 2016; Walhout R et al., 2015). Ovo odstupanje je verovatno uzrokovano malim SALS uzorkom kod kojih je sprovedeno neuroradiološko ispitivanje u našoj grupi ispitanika.

Analiza cervikalne kičmene moždine pokazala je izraženiju atrofiju u grupi ALS SOD1 pacijenata u poređenju sa SALS pacijentima, iako su vrednosti magnetizacionog transfera bile slične u ove dve grupe. Promene u odnosima neurometabolita u cervikalnoj kičmenoj moždini prethodno su dokazane kod asimptomatskih SOD1 ispitanika, bez kliničkih i elektromiografskih znakova bolesti (Carew JD et al., 2011).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Marjanović IV**, Selak-Djokić B, Perić S, Janković M, Arsenijević V, Basta I, Lavrnjić D, Stefanova E, Stević Z. Comparison of the clinical and cognitive features of genetically positive ALS patients from the largest tertiary center in Serbia. *J Neurol.* 2017 Jun;264(6):1091-1098.
2. Agosta F, Spinelli EG, **Marjanovic IV**, Stevic Z, Pagani E, Valsasina P, Salak-Djokic B, Jankovic M, Lavrnic D, Kostic VS, Filippi M. Unraveling ALS due to SOD1 mutation through the combination of brain and cervical cord MRI. *Neurology.* 2018 Feb 20;90(8):e707-e716.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Kliničko genetska analiza pacijenata sa familijarnom amiotrofičkom lateralnom sklerozom u populaciji Srbije“ dr Ivana V. Marjanovića, kao prvi

ovakav rad u našoj populaciji, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju ove genotipski i fenotipski heterogene grupe bolesti.

Najveći doprinos ove studije se zapravo zasniva na mogućnosti boljeg razumevanja motornih i nemotornih simptoma kod FALS i SALS pacijenata. S druge strane, morfološko ispitivanje afekcije centralnog nervnog sistema, koje je korišćeno u studiji dr Marjanovića, predstavlja potencijalni *in vivo* biomarker i nudi mogućnost definisanja dodatnih kriterijuma, koji bi mogli biti od koristi u ranoj dijagnostici, definisanju podtipova bolesti, praćenju progresije bolesti i eventulano proceni efikasnosti buduće terapije. Konačno, ispitivanje morfološko-funkcionalne povezanosti kliničkih i neuropsiholoških nalaza kod SALS i FALS pacijenata, vodi ka boljem razumevanju patofizioloških poremećaja koja leže u osnovi pojedinih simptoma bolesti.

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

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

U Beogradu, 12.04.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dragana Lavrnić

Prof. dr Ivana Novaković

Mentor:

Prof. dr Zorica Stević

Prof. dr Ranko Raičević
