

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.06.2020. godine, broj 9700/08, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj specifično dizajniranog programa vežbi na enzimsku aktivnost matriks metaloproteinaza seruma i funkcionalni status pacijentkinja sa postmenopauzalnom osteoporozom“

kandidata dr Tamare Filipović, zaposlene u Institutu za rehabilitaciju, u Beogradu. Mentor je Prof.dr Milica Lazović, Komentor Prof.dr Kristina Gopčević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivana Petronić-Marković, profesor Medicinskog fakulteta, Univeziteta u Beogradu
2. Prof. dr Mirjana Kocić, profesor Medicinskog fakulteta, Univeziteta u Nišu
3. Doc. dr Nela Maksimović, docent Medicinskog fakulteta, Univeziteta 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 doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Tamare Filipović napisana je na ukupno 138 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 34 tabele, 17 grafikona, 15 slika i 3 figure. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisano šta je to osteoporoza, koji tipove osteoporoze postoje i kakve smetnje imaju osobe koje imaju osteoporozu. Detaljno je opisana uloga i značaj matriks metaloproteinaza (MMP-aza) u koštanom remodelovanju, posebno MMP -2 i MMP -9 i tkivnog inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP-a 1). Opisani su patofiziološki mehanizmi odgovorni za nastanak osteoporoze i faktori koji utiču na aktivnost i diferencijaciju osteoklasta i osteoblasta, kao i njihovu dinamiku promene uslovljenu primenom odgovarajućeg tretmana. Navedeni su faktori rizika za nastanak osteoporoze, način dijagnostikovanja osteoporoze, funkcionalna procena pacijenata sa osteoporozom i terapija osteoporoze, sa posebnim osvrtom na nefarmakološko lečenje bolesti i značaj fizičke aktivnosti. Takođe su prikazana dosadašnja saznanja vezana za fizičku aktivnost i promene do kojih ona dovodi na molekularnom nivou.

Ciljevi rada su precizno definisani. Osnovni ciljevi sastojali su se u utvrđivanju uticaja specifično dizajniranog programa vežbi na promenu enzimske aktivnosti MMP-2, MMP-9 i TIMP-a 1 u serumu pacijentkinja sa postmenopauzalnom osteoporozom nakon 12 nedelja od primenjenog tretmana; ispitivanja uticaja specifično dizajniranog programa vežbi na poboljšanje funkcionalnog statusa pacijentkinja sa osteoporozom, odgovarajućim funkcionalnim testovima i utvrđivanja povezanosti genotipova i alela polimorfizama u genima za MMP-2 i MMP-9 i efekata specifično dizajniranog programa vežbi. Takođe kao primarni cilj rada navedeno je i utvrđivanje učestalosti najzastupljenijih faktora rizika u ispitivanoj populaciji. Sekundarni ciljevi bili su utvrđivanje uticaja specifično dizajniranog programa vežbi na promenu straha od pada i povećanje znanja o osteoporozu nakon 12 nedelja od primene tretmana.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o randomizovanoj prospektivnoj studiji, u koju je bilo uključeno 97 postmenopauzalnih pacijentkinja sa postavljenom dijagnozom osteoporoze, nasumično raspoređenih u 2 grupe, grupu koja vežba (VG) i kontrolnu grupu (KG), u odnosu 1:1. Pacijentkinje iz VG imale su specifično dizajniran program vežbi, pod kojim se podrazumevalo sprovođenje aerobnih vežbi, treninga snage i izdržljivosti i vežbi balansa. Pacijentkinje iz KG nisu učestvovala u programu vežbi za vreme trajanja istraživanja. Klinički deo istraživanja sproveden je u Institutu za rehabilitaciju, u Sokobanjskoj 17, u Beogradu, koji je nastavna baza Medicinskog fakulteta u Beogradu. Biohemijski deo istraživanja sproveden je u laboratoriji za analitiku biomolekula, Instituta za hemiju u medicini "Prof. dr Petar Matavulj" Medicinskog fakulteta u Beogradu, dok su

molekularno-genetičke analize rađene na Institutu za humanu genetiku, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Detaljno je opisana selekcija ispitanika, metode prikupljanja podataka i merenja, kao i kriterijumi za uključenje i isključenje iz studije, uz prateći dijagram (flow chart). Posebno je opisan protokol specifično dizajniranog programa vežbi i testova koji su primenjeni za procenu funkcionalnog statusa 2 grupe pacijentkinja. Dat je kratak osvrt na statističke metode primenjivane u istraživanju. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobreno je od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, kao i od strane Etičkog odbora Instituta za rehabilitaciju, Instituta za hemiju u medicini i Instituta za humanu genetiku. Izvršena je registracija istraživanja na sajtu www.clinicaltrials.gov (ClinicalTrials.gov identifikator) i dobijen je odgovarajući identifikacioni broj (NCT number: NCT03816449).

Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključjenja u studiju.

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

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

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 349 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Za posmatrane parametre, odnosno enzimsku aktivnost MMP-2, MMP-9, TIMP-a 1, i vrednosti funkcionalnih testova koji su primenjivani za procenu funkcionalnog statusa, (VG i KG) grupe su bile homogene. Posmatranjem uticaja specifično dizajniranog programa vežbi na promenu enzimske aktivnosti MMP-2, MMP-9 i TIMP-a 1, na osnovu linearne regresione analize pokazano je da se aktivnost MMP-2 i MMP-9 statistički značajno smanjila u grupi koja je vežbala, nakon 12 nedelja, dok su vrednosti TIMP-a 1 bile statistički značajno veće, u odnosu na kontrolnu grupu. Komparativnom analizom efikasnosti tretmana među grupama zaključeno je da je VG imala bolji tretman.

Posmatranjem uticaja specifično dizajniranog programa vežbi na promenu funkcionalnog statusa pacijentkinja sa postmenopauzalnom osteoporozom, ANOVA za ponovljena merenja je pokazala da su se vrednosti „ustani i kreni“ (TUG) testa statistički značajno smanjile nakon 12 nedelja u grupi koja vežba, dok su se vrednosti „ustani i sedni“ (STS) testa statistički

značajno smanjile nakon 4 i nakon 12 nedelja u grupi koja vežba. ANOVA za ponovljena merenja je pokazala da su vrednosti „testa stajanja na jednoj nozi“ (OLST testa) bile statistički značajno veće u grupi koja vežba nakon 12 nedelja, u odnosu na kontrolnu grupu.

Procena uticaja specifično dizajniranog programa vežbi na promenu straha od pada i znanja o osteoporozi pokazala je statistički značajno smanjenje straha od pada i veće usvajanje znanja o osteoporozi u grupi koja je vežbala, u odnosu na kontrolnu grupu, nakon 12 nedelja. Pacijentkinje iz VG imale su statističke značajno poboljšanje vrednosti za sve posmatrane testove, u odnosu na KG.

Molekularno-genetičke analize nisu potvrdile korelaciju između polimorfizama za MMP-9 i MMP-2 i funkcionalnog statusa merenog TUG, STS i OLST nakon 12 nedelja, u VG.

U ukupnom uzorku pokazano je da su pacijentkinje genotipa GG u polimorfizmu za MMP-2 imale inicijalno statistički značajno lošije rezultate za TUG i STS test u poređenju sa onima koje su imale genotip GA ili AA. Ovi rezultati nisu uočeni za MMP-9 polimorfizam.

Analizom rezultata 97 postmenopauzalnih pacijentkinja sa osteoporozom pokazano je da su najzastupljeniji faktori rizika bili smanjenje vitamina D (91,8%), smanjen unos mlečnih proizvoda (87,6%), sedentarni način života (76,3%), deficijencija vitamina D (51,5%) i pozitivna porodična anamneza (48,5%).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Osteoporoza je hronična, sistemska i najčešća metabolička koštana bolest, koja se odlikuje smanjenjem koštane mase i remodelovanjem mikroarhitekture kosti, što za rezultat ima veću fragilnost kosti i povećani rizik od frakture. Uprkos postojanju objektivnih mogućnosti, osteoporoza je i dalje nedovoljno dijagnostikovana i lečena. Prema najnovijim istraživanjima broj ljudi kod kojih je ustanovljena osteoporoza će se udvostručiti u narednih 50 godina, usled starenja svetske populacije i uticaja raznih faktora, među kojima značajno mesto zauzima način života, što je potvrđeno u ovom istraživanju. Do danas, nijedna studija koja se bavila ovom problematikom nije pokazala uticaj specifično dizajniranog programa vežbi na promenu enzimske aktivnosti matriks metaloproteinaza i funkcionalni status pacijentkinja, nakon 12 nedelja od primenjenog programa vežbi. Ovo istraživanje je pokazalo značaj specifično dizajniranog programa vežbi i njegov uticaj na različite kliničke i biohemijske parametre, čiji je krajnji cilj prevencija nastanka frakture i sprečavanje progresije bolesti naših pacijentkinja.

Istraživanje rasvetljava složene patofiziološke mehanizme odgovorne za nastanak osteoporoze, odnosno faktora koji utiču na aktivnost i diferencijaciju osteoklasta i osteoblasta, kao i njihovu dinamiku promene uslovljenu primenom odgovarajućeg tretmana. Dokazano je da u procesu remodelovanja ekstracelularnog matriksa kosti značajnu ulogu imaju matriks-metaloproteinaze (MMPaze), kako u nastanku kosti tako i u patološkim procesima razgradnje kosti (Kanis, et al. 2019; Cosman, et al. 2014; Henriët and Emonard, 2019). Na animalnim modelima potvrđeno je da MMP-9 može biti marker osteoklastne aktivnosti (Grigoryan, et al. 2017.). Metodom želatin zimografije, korišćene i u ovom istraživanju, pokazano je značajno smanjenje serumske aktivnosti MMP-9 nakon primene određenog farmakološkog tretmana u ovariektomisanih pacova (Chai, et al. 2018). U novijim istraživanjima potvrđena je korelacija između povećane ekspresije MMP-aza, posebno MMP-9 (Logar, et al. 2007), MMP-1 i MMP-2 i povećane koštane resorpcije u pacijentkinja sa osteoporozom (Galliera, et al. 2010; Wang, et al. 2017). Povećana ekspresija MMP-aza u mnogim patološkim stanjima, kao i njihova uloga u procesima apoptoze ćelija, celularne migracije, angiogeneze, destrukcije ECM, dozvoljava njihovu upotrebu kao markera inflamacije (Jabłońska-Trypuć, et al. 2016). Pokazano je da bisfosfonati, primenjivani kao antiresorptivni agensi, koji interaguju primarno sa osteoklastima, inhibiraju aktivnost nekoliko MMP-aza (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13 i -14) kroz helatni mehanizam, sugerišući krucijalnu ulogu ovih proteaza u gubitku koštane mase u osteoporozi (Murphy and Lee, 2005). Uprkos uticaju brojnih terapijskih modaliteteta na regulaciju aktivnosti MMP-aza (Makowski, et al. 2005), u ovoj studiji je prvi put dokumentovano kako trening snage zajedno sa aerobnim treningom i vežbama balansa utiče na promenu ovih vrednosti. Dokazan je uticaj specifično dizajniranog programa vežbi na smanjenje vrednosti MMP-9 i MMP-2 i povećanje TIMP-a 1, u poređenju sa pacijentkinjama koje nisu bile uključene u kineziterapijski program.

Primena fizičke aktivnosti kao sastavnog dela terapijskih procedura koje se moraju primenjivati u lečenju pacijenata sa osteoporozom, osim što utiče na enzimsku aktivnost MMP-aza, značajno utiče na funkcionalni ishod pacijentkinja sa sniženom koštanom gustinom, čiji se značaj posebno ogleda u prevenciji nastanka pada i preloma. Kako osteoporoza afektira mnoge aspekte svakodnevnog života, traganje za multikomponentnim programom vežbi koji bi uslovio najbolji funkcionalni ishod, još uvek je predmet istraživanja, zaključeno je u velikoj meta-analizi, koja je analizirala 1587 citata, od kojih je 2113 pacijenata iz 28 studija, ispunilo kriterijume za uključenje (Varahra, et al. 2018).

Prema preporukama internacionalnog vodiča za prevenciju i definisanje faktora rizika (Kanis, et al. 2019; Kanis et al. 2013), testovi kao što su STS i TUG test, kao i OLST za determinisanje statičkog balansa, su najčešće korišćeni testovi za procenu mobilnosti, snage donjih ekstremiteta i predikciju rizika za pad (Lundin, et al. 2014).

U ovom istraživanju predložen je multikomponentni program vežbi, koji se sastojao iz vežbi snage, balansa i aerobnog treninga po tipu brzog hoda u pacijentkinja sa postmenopauzalnom osteoporozom u Srbiji, pri čemu je dokazano da isti nakon 3 meseca statistički značajno popravljaju njihovu mišićnu snagu, procenjivanu TUG i STS testom, statički balans, meren OLST testom, smanjuje strah od pada, procenjivan FES-I upitnikom i povećava znanje o osteoporozi, mereno OKAT-S upitnikom.

U dostupnoj literaturi nema dovoljno randomizovanih, dobro dizajniranih, standardizovanih studija, koje dokumentuju efikasnost multikomponentnih programa vežbi, određenog intenziteta, trajanja i učestalosti na funkcionalni ishod pacijentkinja sa postmenopauzalnom osteoporozom među srpskom populacijom. Ovako koncipiran program vežbi, koji je primenjen u ovom istraživanju, ima potencijal da promoviše medicinu zasnovanu na dokazima i ohrabri pacijentkinje sa osteopenijom i osteoporozom da učine nešto za svoje zdravlje.

Dramatično povećanje starije populacije, učestalost osteoporoze u pacijenata oba pola, broj osteoporotičnih fraktura koji se desi u svetu u svakom trenutku, kao i stopa morbiditeta, ali i mortaliteta koje sa sobom nose, nedvosmisleno nameću zaključak o potrebi primene individualizovanih, specifično dizajniranih programa vežbi i sve veće potvrde efikasnosti istih u cilju zaustavljanja progresije i prevencije posledica ove bolesti. S druge strane, kliničko definisanje funkcionalnog statusa je neophodno u cilju praćenja efikasnosti terapije, odnosno vežbe, kao i modifikacije iste, i set testova primenjen u ovom istraživanju može da posluži za izradu protokola za procenu funkcionalnog statusa pacijentkinja sa osteoporozom.

Rezultati istraživanja u svetu su pokazali da funkcionalni genski polimorfizmi (PM), modulirajući ekspresiju MMP-aza, mogu biti asocirani sa različitim odgovorom naših pacijentkinja na primenu istog programa vežbi. U dostupnoj svetskoj literaturi istraživanja u ovoj oblasti su ograničena, dok ih u domaćoj literaturi nema. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da varijabilnost gena za MMP-2 i MMP-9 nije uticala na ispoljavanje individualnih razlika u dosezanju različitih funkcionalnih ishoda, uslovljenih fizičkom

aktivnosti, u postmenopauzalnih pacijentkinja sa osteoporozom koje su imale specifično dizajniran program vežbi. Ovi rezultati predstavljaju skroman, ali značajan doprinos nauci i praksi, jer je pretragom dostupne literature, zaključeno da je ovo prva studija koja se bavila ispitivanjem povezanosti rs243866 u genu za MMP-2 kao i rs3918242 u genu za MMP-9 i funkcionalnog statusa pacijentkinja sa postmenopauzalnom osteoporozom, praćenog setom navedenih testova. Ipak, analizom ukupnog uzorka, utvrđeno je da veća učestalost GG genotipa u polimorfizmu za MMP-2 predstavlja prediktor lošijeg funkcionalnog statusa merenog TUG i STS testom u ispitivanoj populaciji.

Prisustvo najzastupljenijih faktora rizika u ispitivanoj populaciji, kao što su smanjene vrednosti vitamina D, ishrana siromašna kalcijumom, sedentarni način života i pozitivna porodična anamneza, nameće neophodnost prepoznavanja i prevencije istih.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Tamara Filipović, Kristina Gopčević, Sanja Dimitrijević, Marija Hrković, Ana Backović, Milica Lazović **Effects of 12-Week Exercise Program on Enzyme Activity of Serum Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Female Patients With Postmenopausal Osteoporosis: A Randomized Control Study.** *Biomed Res Int.* 2020: 9758289.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj specifično dizajniranog programa vežbi na enzimsku aktivnost matriks metaloproteinaza seruma i funkcionalni status pacijentkinja sa postmenopauzalnom osteoporozom” dr Tamare Filipović, kao prvi ovakav rad u srpskoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u boljem razumevanju uticaja specifično dizajniranog programa vežbi na dobijanje pozitivnog odgovora ispitivanih biohemijskih parametara, uključenih u proces remodelovanja kostiju. Istovremeno, rezultati ovog istraživanja ukazuju na značaj primene MMP-aza kao potencijalnih biohemijskih markera ove kompleksne bolesti, čime se otvaraju i nove terapijske mogućnosti. Smanjenje enzimske aktivnosti MMP-aza, nakon primene odgovarajućeg programa fizičke aktivnosti i medikamentozne terapije, predstavlja značajan faktor u ranoj proceni terapijskog odgovora. Nakon primene terapije, ukoliko odgovor izostaje, ista se može prilagođavati pacijentu sve do postizanja optimalnog terapijskog efekta.

Specifično dizajniran program vežbi, koji je primenjen u ovom istraživanju pokazao se efikasnim u poboljšanju funkcionalnog statusa pacijentkinja sa osteoporozom, poboljšanjem mišićne snage i balansa, ali i poboljšanju njihovog socijalnog i mentalnog stanja, odnosno smanjenjem straha od pada i povećanjem znanja o osteoporozi. Imajući u vidu da još uvek nije jasno definisan protokol fizičke aktivnosti za pacijentkinje sa osteoporozom, odnosno da postoji izvesno neslaganje ekspertskih grupa po pitanju najefektivnijeg oblika vežbi, rezultati ove studije mogu doprineti definisanju specifičnog programa vežbi za pacijentkinje sa postmenopauzalnom osteoporozom.

Jedna od njegovih najvećih prednosti je mogućnost njegove šire primene u široj društvenoj zajednici, kako u pacijenata sa osteoporozom, tako i onih sa osteopenijom. Program zahteva malo opreme, ima male materijalne troškove i može lako biti implementiran u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Može se izvoditi i u kućnim uslovima, nakon sprovedene edukacije pacijenta.

Iako je u ovom istraživanju pokazano da polimorfizmi gena za MMP-9 i MMP-2 nisu modulatori individualne osetljivosti na vežbu u pacijentkinja sa osteoporozom u Srbiji, korelacija između GG genotipa u polimorfizmu za MMP-2 i testova na samom početku istraživanja, odnosno u skrining periodu, može biti značajna u sagledavanju budućeg ishoda pacijentkinja sa osteoporozom i što preciznijih definisanja budućih ciljeva rehabilitacionog tretmana. Takođe identifikacija pacijentkinja sa većom učestalošću GG genotipa u polimorfizmu za MMP-2 može poslužiti za identifikaciju pacijentkinja sa osteoporozom koje imaju predispoziciju za lošijim funkcionalnim statusom. Ako se daljim istraživanjima na većem broju ispitanika, potvrdi da je ispitivani polimorfizam prediktor lošijeg funkcionalnog statusa, terapija bi se mogla prilagođavati strogo prema potrebama pojedinca.

Identifikacija najzastupljenijih promenljivih faktora rizika u ispitivanoj populaciji, nameće zaključak o neophodnosti korigovanja istih (suplementacije vitamina D i kalcijuma i korekcije sedentarnog načina života), koja je uprkos brojnim smernicama i vodičima, još uvek nedovoljno prepoznata.

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 Tamare Filipović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.06.2020.

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivana Petronić-Marković

Prof.dr Mirjana Kocić

Doc.dr Nela Maksimović

Mentor:

Prof. dr Milica Lazović

Komentor:

Prof. dr Kristina Gopčević
