

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj 3. novembra 2020. godine, odlukom broj 9700/11-MDP imenovana je Komisija za ocenu završne doktorske disertacije pod naslovom:

**“ISPITIVANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA KOJI REGULIŠU
FIBRINOLIZU I INTEGRITET VANĆELIJSKOG MATRIKSA SA EFEKTIMA
TERAPIJE ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA REKOMBINOVANIM TKIVNIM
AKTIVATOROM PLAZMINOGENA”**

kandidata dr Marije Dušanović Pjević, doktora medicine na specijalizaciji iz Laboratorijske medicine, zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu na mestu asistenta na Katedri za humanu genetiku. Mentor ove teze je prof. dr Biljana Jekić, a komentor prof. dr Ljiljana Beslač Bumbaširević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Suzana Cvjetičanin**, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Tatjana Damjanović**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Marija Žarkov**, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija asistenta dr Marije Dušanović Pjević je napisana na 135 strana i podeljena na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija,

zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 45 tabela, 30 slika i devet grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

Uvod disertacije je podeljen na nekoliko delova. Prvi deo je posvećen glavnim epidemiološkim odlikama, dijagnostici i terapiji ishemijskog moždanog udara (IMU). Istaknut je značaj primene rekombinovanog tkivnog aktivatora plazminogena (rtPA) u terapiji akutnog IMU i detaljno je opisana njegova struktura i funkcija. Dodatno se pretpostavlja da genetički faktori, posebno polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism - SNP) mogu doprineti različitom nivou ekspresije gena, ili aktivnosti genskog produkta, pa posredno mogu uticati na fiziologiju i funkcionalnost ćelija. Samim tim mogu predstavljati genetičke faktore rizika za razvoj određenog oboljenja, uticati na odgovor na primenjenu terapiju, patogenezu i ishod lečenja. U sledećem delu, fokus je na farmakogenetici čiji je primarni cilj otkrivanje onih pacijenata za koje je veća verovatnoća da će imati koristi od određene intervencije korišćenjem njihovih genetičkih informacija za odabir odgovarajućeg tretmana lečenja, u ovom slučaju rtPA terapije. U narednom delu, detaljno su opisani proteini uključeni u fibrinolizu (inhibitor aktivatora plazminogena I - PAI-1 i angiotenzin konvertujući enzim - ACE) i integritet vanćelijskog matriksa (matriks metaloproteinaze - MMP i njihovi tkivni inhibitori - TIMP), njihova struktura, funkcija kao i geni kojima su kodirani. Naime, pored njihove poznate uloge u fibrinolizi (PAI-1 i ACE) i održavanju integriteta vanćelijskog matriksa (MMP i TIMP), postoje dokazi koji govore da su produkti ovih gena dovedeni u vezu sa rizikom za IMU, ali i različitim stepenom oporavka nakon IMU. U ovom delu disertacije, posebna pažnja je posvećena genetičkim varijacijama u okviru gena koji kodiraju PAI-1, ACE, MMP-2, MMP-9 i TIMP-2. Pored toga, istaknuto je da su dosadašnja istraživanja najviše bila okrenuta ka povezanosti polimorfizma gena za PAI-1, ACE, MMP-2 i MMP-9 sa rizikom od nastanka IMU, dok su podaci o ispitivanju uticaja ispitivanih genskih polimorfizama na efikasnost terapije i pojavu hemoragijskih komplikacija nakon primenjene rtPA terapije kod osoba sa IMU veoma oskudni, ali i kontradiktorni. Sa druge strane, u literaturi nema podataka o povezanosti izabranih polimorfizama *TIMP-2* gena i nastanka IMU, kao i odgovora na rtPA terapiju. Zbog svega navedenog i mogućeg funkcionalnog značaja najčešćih polimorfizama gena koji kodiraju PAI-1, ACE, MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 u nastanku IMU, ali i odgovora na rtPA terapiju nakon IMU i pojavu rtPA indukovanih hemoragijskih komplikacija postavljeni su i jasno definisani **ciljevi** studije:

1. Utvrditi učestalosti genotipova i alela izabranih polimorfizama gena za MMP-2, MMP-9, TIMP-2, PAI-1 i ACE
2. Analizirati povezanost ispitivanih polimorfnih genskih varijanti sa efikasnošću trombolitičke terapije
3. Analizirati povezanost ispitivanih polimorfnih genskih varijanti sa pojavom hemoragijskih komplikacija

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je studija dizajnirana po tipu hibridne panel studije (kombinacija kohortne studije i studije preseka). Inicijalna studija preseka obuhvatila je prvih 16 meseci od započinjanja studije i uključila je 94 pacijenta koji su unutar ovog vremenskog intervala imali IMU i lečeni rtPA terapijom. Finalno, u studiju je uključeno 166 konsektivna pacijenta sa IMU lečenih rtPA u Specijalnoj bolnici za cerebrovaskularne bolesti „Sveti Sava” u Beogradu u periodu od avgusta 2016. godine do avgusta 2018. godine. Funkcionalni oporavak kod svih bolesnika praćen je preko modifikovanog Rankin skora (mRS). MRS je određivan po otpustu iz bolnice i nakon tri meseca od IMU. Efikasnost rtPA terapije je procenjavana na osnovu povoljnog funkcionalnog oporavka, definisanog mRS skorom 0 ili 1, tri meseca nakon IMU. Prisustvo hemoragijske transformacije (HT) na kontrolnom snimku kompjuterizovane tomografije (CT) definisano je u skladu sa ECASS II kriterijumima. U slučaju naglog pogoršanja neurološkog stanja, kontrolni CT je hitno urađen, a prisustvo simptomatske intrakranijalne hemoragije (sICH) definisano je u skladu sa ECASS III kriterijumima. Svakom pacijentu je od venske krvi, uzimane radi klasičnih dijagnostičkih analiza, po 5mL sačuvano i iskorišćeno za potrebe molekularno-genetičkih analiza. Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Specijalne bolnice za cerebrovaskularne bolesti „Sveti Sava” u Beogradu (03/2278) i Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (29/X-3).

U ovom delu disertacije detaljno je opisana izolacija molekula DNK, kao i metodologija korišćena za određivanje genotipova izabranih polimorfizama: metoda reakcije lančane polimerizacije (engl. Polymerase chain reaction - PCR) za *ACE* I/D polimorfizam, reakcije lančane polimerizacije - polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata (engl. Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis - PCR-RFLP) za *PAI-1* 4G/5G, *MMP-2* -735 C/T i *MMP-9* -1562 C/T polimorfizme i reakcije lančane polimerizacije u realnom vremenu (engl. Real-time Polymerase Chain Reaction - real-time PCR) za *MMP-2* -1575 G/A, *MMP-2* -1306 C/T, *MMP-2* -790 T/G i *TIMP-2* -303 C/T i *TIMP-2* -418 G/C polimorfizme. Na osnovu urađenih genskih analiza, utvrđene su apsolutne učestalosti alela i genotipova ispitivanih polimorfizama. Učestalost genskih varijanti, kao i efikasnost rtPA terapije procenjavani su univarijantnom logističkom regresionom analizom, na

osnovu veličine i značajnosti odnosa šansi (engl. Odds Ratio, OR) sa intervalom poverenja od 95% (IP 95%). Sve varijable koje su se pokazale značajnim su zatim uvršćene u multivarijantu logističku regresionu analizu sa lošim ishodom kao ishodom varijablom. Opisana je i metoda određivanja haplotipova četiri promotorska polimorfizma *MMP-2* gena.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati kroz 34 tabele, devet grafikona i pet slika.

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

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije rezultate koji su proistekli iz disertacije. Pokazano je da su učestalosti genotipova i alela kod pacijenata sa IMU za sve ispitivane polimorfizme u saglasnosti sa prijavljenim učestalostima u NCBI (engl. The National Center for Biotechnology Information - NCBI) bazi, kao i da nema razlike u učestalosti genotipova, kao ni alela ispitivanih polimorfizama u odnosu na efikasnost rtPA terapije kod pacijenata sa IMU. Sa druge strane, 5G/5G genotip *PAI-1* 4G/5G polimorfizma je povezan sa sistemskim krvarenjem, ali i agitacijom kao komplikacijama trombolitičke terapije, dok je D/D genotip *ACE* I/D polimorfizma, takođe, povezan sa sistemskim krvarenjem nakon rtPA. GG genotip *MMP-2* -1575 G/A, CC genotip *MMP-2* -1306 C/T ili TT genotip *MMP-2* -790 T/G polimorfizama su bili ređi kod pacijenata koji su imali prethodni IMU, što je i potvrdila analiza haplotipova gde je GCTC haplotip (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T) *MMP-2* gena ređi kod pacijenata sa rekurentnim IMU. Sa druge strane, osobe sa GCT haplotipom (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G) *MMP-2* gena češće su imale parenhimski hematom tip 1, dok su osobe sa istim haplotipom ređe imale alergijsku reakciju na rtPA. Kod osoba TT genotipa *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma češće se javila neka druga intrakranijalna hemoragija (proširena iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH) nakon rtPA terapije, ali i parenhimski hematom tip 2. Kombinacijom genotipova uočeno je da su sve osobe sa sistemskim krvarenjem istovremeno imale GG genotip *MMP-2* -1575 G/A polimorfizma i CC genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma, ali i da su osobe koje su istovremeno imale TT genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma i TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma češće imale HT, sICH, kao i druga intrakranijalna krvarenja (proširena iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH) nakon rtPA terapije. Stoga je zaključeno da istovremeno određivanje genotipova *TIMP-2* -303 C/T i *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama može predstavljati koristan pokazatelj u proceni rizika od hemoragijskih komplikacija nakon rtPA terapije kod pacijenata sa IMU.

Bibliografija sadrži listu od 298 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Učestalosti genotipova i alela kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom za sve ispitivane polimorfizme su u saglasnosti sa prijavljenim učestalostima u NCBI bazi. Uočeno je da je učestalost C alela *TIMP-2* -418 G/C polimorfizma u našoj populaciji veoma niska, kao i da su *MMP-2* -1575 G/A i *MMP-2* -1306 C/T polimorfizmi blisko vezani lokusi. U studiji nije uočena statistički značajna asocijacija između genotipova i alela izabranih polimorfizama i efikasnosti rtPA terapije kod pacijenata sa IMU. Sa druge strane, uočena je povezanost genotipova određenih polimorfizama sa intrakranijalnim i ekstrakranijalnim krvarenjima nakon rtPA terapije. Intrakranijalna hemoragija (proširena iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH) kod osoba sa IMU lečenim rtPA statistički značajno češće se javila kod osoba TT genotipa *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma, u odnosu na osobe drugih genotipova ispitivanog polimorfizma. Osobe sa istim genotipom (TT genotip) navedenog polimorfizma su statistički značajno češće imale i parenhimski hematoma tip 2, kao podtip HT. Parenhimski hematoma tip 1, kao podtip HT, statistički značajno češće se javio kod osoba sa GCT haplotipom (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G) *MMP-2* gena. Takođe, uočeno je da su se sistemsko krvarenje, ali i agitacija, kao komplikacije rtPA terapije, statistički značajno češće javile kod osoba 5G/5G genotipa *PAI-1* 4G/5G polimorfizma. Dodatno, sistemsko krvarenje nakon rtPA terapije statistički značajno češće se javilo kod ispitanika D/D genotipa *ACE* I/D polimorfizma. Pored efikasnosti i komplikacija rtPA terapije, u studiji je analizirana i povezanost genotipova izabranih polimorfizama i prethodnog IMU. Uočeno je da su osobe kojima je ovo ponovni IMU statistički značajno ređe imale GG genotip *MMP-2* -1575 G/A, CC genotip *MMP-2* -1306 C/T ili TT genotip *MMP-2* -790 T/G polimorfizama. Ovo je i potvrđeno analizom haplotipova pomenutih polimorfizama, gde je pokazano da su osobe kojima je ovo bio rekurentni IMU statistički značajno ređe imale GCTC haplotip (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T) *MMP-2* gena, što može da ukaže na njegovo protektivno dejstvo za ponovni IMU. Finalno, osobe sa HT, sICH, kao i osobe kod kojih su se javila druga intrakranijalna krvarenja (proširena iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH) nakon rtPA terapije statistički značajno češće istovremeno imale TT genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma i TT genotip *MMP-9* -1562 C/T, kao i da su sve osobe sa sistemskim krvarenjem istovremeno imale GG genotip *MMP-2* -1575 G/A polimorfizma i CC genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Genske varijacije, ne samo da utiču na predispoziciju za IMU, već i na terapijski odgovor i klinički ishod same bolesti. Trombolitička terapija rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena zajedno sa mehaničkom ekstrakcijom tromba su jedine dozvoljene terapije akutnog IMU u svetu. Međutim, kod određenog broja pacijenata koji su primili rtPA, dolazi do razvoja ozbiljne komplikacije ove terapije - hemoragijske transformacije, koja je, kada je simptomatska, povezana sa visokom stopom morbiditeta i mortaliteta (Yaghi *et al.*, 2017). Usled velikih interindividualnih varijacija u odgovoru na primljenu trombolitičku terapiju, farmakogenetika se sve više fokusira na ispitivanje uticaja genskih varijacija nakon primene pomenute terapije za lečenje IMU, imajući u vidu da sve veći broj dokaza govori u prilog činjenici su već neke SNP varijante povezane sa odgovorom na rtPA terapiju, tokom same bolesti, ali i javljanjem hemoragijskih komplikacija nakon primljene rtPA terapije (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; Lansberg, Albers and Wijman, 2007; Munshi and Sharma, 2014).

Povezanost PAI-1 sa efikasnošću reperfuzije i hemoragijskim rizikom nakon rtPA terapije se može objasniti time što je PAI-1 najefikasniji endogeni inhibitor tPA. Međutim, uprkos ovoj činjenici, njegova uloga u ishodu nakon rtPA terapije kod pacijenata sa IMU nije do kraja rasvetljena (Donkel *et al.*, 2019). Do sada su svega tri studije, uključujući studiju dr Dušanović Pjević, sprovedene s ciljem ispitivanja povezanosti 4G/5G polimorfizma sa efikasnošću rtPA terapije i javljanjem neželjenih hemoragijskih efekata indukovanih ovom terapijom. Jedna od ovih studija je ukazala na povezanost 4G/4G genotipa sa lošijim oporavkom pacijenata nakon primene rtPA u lečenju IMU (Fernandez-Cadenas *et al.*, 2010). Ova asocijacija nije potvrđena u studiji Szegedi i saradnika (Szegedi *et al.*, 2019), kao ni u studiji dr Dušanović Pjević. Međutim, Szegedi i saradnici su ukazali na značaj 5G/5G genotipa kao nezavisnog faktora rizika za HT nakon primene rtPA kod pacijenata sa IMU (Szegedi *et al.*, 2019). Rezultati disertacije dr Dušanović Pjević su ukazali na statistički značajnu razliku u distribuciji genotipova 4G/5G polimorfizma u odnosu na pojavu hemoragijskih komplikacija u drugim sistemima organa. Osobe kod kojih se javilo sistemsko krvarenje nakon rtPA terapije, statistički značajno češće su bile 5G/5G genotipa PAI-1 4G/5G polimorfizma. Preciznije, osobe 5G/5G genotipa imaju tri i po puta veći rizik da razviju ovu hemoragijsku komplikaciju rtPA u odnosu na osobe 4G/4G+4G/5G genotipa. Dobijeni rezultati nisu mogli da se porede sa rezultatima drugih istraživača, jer nijedna studija još nije pratila ostala neželjena dejstva rtPA nakon IMU.

Kada su u pitanju rezultati doktorske disertacije dr Dušanović Pjević, nije pokazano da

postoji razlika u učestalosti genotipova, kao ni alela *ACE* I/D polimorfizma u odnosu na efikasnost rtPA terapije kod pacijenata sa IMU, ali ni sa pojavom HT. Svega tri studije, uključujući i studiju dr Dušanović Pjević, ispitivale su povezanost *ACE* I/D polimorfizma i oporavka pacijenata nakon IMU. U prvoj studiji, D alel *ACE* I/D polimorfizma povezan je sa lošijim funkcionalnim oporavkom pacijenata nakon IMU (Malueka *et al.*, 2018). Sa druge strane, Fernández-Cadenas sa saradnicima je sproveo, pored studije dr Dušanović Pjević, jedinu studiju u kojoj je ispitan uticaj *ACE* I/D polimorfizma na funkcionalni oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom i pojavu HT nakon pomenute terapije. U njihovoj studiji je uočena značajna povezanost D/D genotipa sa stepenom rekanalizacije nakon 1h, 6h i 24h od trenutka aplikovanja rtPA, dok je izostala povezanost genotipova pomenutog polimorfizma i javljanja HT nakon rtPA (Fernández-Cadenas *et al.*, 2006). Razlike u rezultatima u odnosu na uticaj *ACE* I/D polimorfizma na funkcionalni oporavak pacijenata između doktorske disertacije dr Dušanović Pjević i studije Fernández-Cadenas i saradnika mogu biti posledica korišćenja različitih metoda za procenu efikasnosti terapije. Na kraju, imajući u vidu gore navedeno, nijedna studija do sada nije uspeła da pronađe asocijaciju *ACE* I/D genotipova i pojave HT nakon rtPA. Dodatno, dr Dušanović Pjević je u svojoj disertaciji pratila i pojavu drugih hemoragijskih komplikacija rtPA, gde je uočena statistički značajna povezanost između *ACE* I/D polimorfizma i sistemskog krvarenja, kao još jedne komplikacije rtPA terapije. Svi pacijenti koji su ispoljili sistemsko krvarenje imali su D/D genotip. Ovi rezultati su u saglasnosti sa hipotezom da je *ACE* D alel povezan sa značajnim povećanjem ACE u cirkulaciji, a samim tim i angiotenzinom II. Viši nivoi angiotenzina II dovode do rane proliferacije glatkih mišićnih ćelija u zidu arteriola, a posledično do smrti glatkih mišićnih ćelija i oštećenja zida arteriola. Ovaj proces dovodi do vazokonstrikcije i hipertenzije koja pogoršava aterosklerozu, a finalno može uticati na pojavu hemoragije (Sun *et al.*, 2013). Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da postoji tri puta veći rizik da će se kod osoba D/D genotipa nakon IMU lečenog rtPA razviti sistemsko krvarenje u odnosu na druge genotipove, međutim treba naglasiti niske učestalosti javljanja sistemskog krvarenja u studijskoj grupi.

Ravnoteža između MMP i TIMP jedan je od ključnih faktora za održavanje integriteta vanćelijskog matriksa, ali i krvno-moždane barijere (KMB) (Visse and Nagase, 2003). Promene aktivnosti MMP i TIMP mogu dovesti do narušavanja njihovog balansa, oštećenja KMB i predstavljaju jedan od deklansirajućih faktora za javljanje HT nakon IMU (Hannocks *et al.*, 2019). Najveći broj studija o IMU fokusirao se na ispitivanje povezanosti polimorfizama unutar gena za MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 i rizika za nastanak IMU (Nie, Wang and Tang, 2014; Hao *et al.*, 2015;

Chang, Stanfill and Pourmotabbed, 2016). Kombinacija haplotipova četiri promotorska polimorfizma (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T) *MMP-2* gena povezana je sa brojnim patološkim stanjima (Vašků *et al.*, 2004; Alp *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016), dok su podaci o njihovoj povezanosti sa IMU i odgovorom na terapiju veoma oskudni (Manso *et al.*, 2010). Prilikom pretrage NCBI baze, nije pronađen nijedan rad koji je ispitivao povezanost haplotipova izabranih polimorfizama i rizika od IMU, oporavka nakon IMU ili odgovora na rtPA terapiju. Rezultati doktorske disertacije dr Dušanović Pjević nisu pokazali statistički značajnu povezanost ispitivanih haplotipova *MMP-2* gena i odgovora na rtPA terapiju kod pacijenata sa IMU, kao ni na pojavu rtPA indukovane HT. Sa druge strane, svi pacijenti kod kojih se razvio parenhimski hematoma tip 1, kao podtip HT imali su GCT haplotip (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G), što je statistički značajno češće nego kod osoba bez parenhimskog hematoma tip 1.

Studija koju su sproveli Inzitari i saradnici ukazala je da su se jedino povišeni cirkulišući nivoi *MMP-9* nezavisni prediktor lošeg oporavka pacijenata, pojave HT i smrtnog ishoda kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom (Inzitari *et al.*, 2013). Povezanost viših nivoa *MMP-9* u plazmi i pojave HT nakon IMU su potvrdile i druge studije (Ramos-Fernandez, Bellolio and Stead, 2011; Wang *et al.*, 2018). Podaci o povezanosti polimorfizma unutar *MMP-9* gena i funkcionalnog ishoda nakon IMU lečenog rtPA i dalje su nejasni, ali i nedovoljno istraženi (Manso *et al.*, 2010). Pretraživanjem literature, svega tri studije su ispitivale uticaj *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma na javljanje HT nakon IMU, gde su u dve studije pacijenti lečeni rtPA terapijom, dok nijedna studija nije analizirala uticaj pomenutog polimorfizma na oporavak pacijenata nakon rtPA terapije. Jedna od ovih studija pokazala je da je CC genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma značajno povezan sa pojavom HT kod pacijenata sa IMU u poređenju sa pacijentima CT i TT genotipa, ali pacijenti u ovoj studiji nisu lečeni rtPA terapijom (Zhang *et al.*, 2015). Rezultati doktorske disertacije dr Dušanović Pjević, zajedno sa rezultatima drugih studija (Montaner *et al.*, 2003; Fernández-Cadenas *et al.*, 2012), nisu uspjeli da potvrde ove rezultate. Međutim, rezultati doktorske disertacije dr Dušanović Pjević su ukazali na statistički značajnu razliku u učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez parenhimskog hematoma tip 2, kao podtipa HT, kao i između pacijenata sa i bez neke druge intrakranijalne hemoragije (proširene iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH). Osobe sa parenhimskim hematomom tip 2, kao i osobe kod kojih se razvila neka druga intrakranijalna hemoragija nakon rtPA terapije, statistički značajno češće su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma. Dobijeni rezultati bi mogli da ukažu da je TT genotip *MMP-9* -1562 C/T faktor rizika za intrakranijalnu hemoragiju kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

terapijom, a mogu se objasniti višim nivoima MMP-9 u plazmi kod osoba TT genotipa *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma (Zhang *et al.*, 1999; Montaner *et al.*, 2003), koji su povezani sa oštećenjem KMB i posledične hemoragije (Barr *et al.*, 2010).

Polimorfizmi -418 G/C i -303 C/T *TIMP-2* gena povezani su sa rizikom za javljanje različitih oboljenja (Park *et al.*, 2014; Mikołajczyk-Stecyna *et al.*, 2015; Ross and Paré, 2018; Wang *et al.*, 2019). Veoma je oskudan broj studija koja su ispitivale uticaj drugih polimorfizama *TIMP-2* gena na nastanak IMU. Analizom -418 G/C i -303 C/T polimorfizama *TIMP-2* gena i IMU, kao i povezanošću genotipova navedenih polimorfizama i oporavka pacijenata nakon IMU lečenog rtPA terapijom i pojavom rtPA-indukovanih hemoragijskih komplikacija nije se bavila nijedna studija uključena u NCBI bazu. Rezultati doktorske disertacije dr Dušanović Pjević nisu ukazali na statistički značajnu povezanost genotipova, ni alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma i oporavka pacijenata sa IMU lečenih rtPA, kao ni povezanost ovog polimorfizma sa pojavom rtPA indukovane HT, ili sICH. Međutim, nakon analize gen-gen interakcije uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T i *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama između pacijenata sa i bez HT. Hemoragijska transformacija se statistički značajno češće javila kod pacijenata koji su istovremeno imali TT genotip *TIMP-2* -303 C/T i TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama. Takođe je zabeležena i statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T i *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama između pacijenata sa i bez neke druge intrakranijalne hemoragije nakon rtPA terapije, ali i između pacijenata sa i bez sICH. Pacijenti kod kojih se razvila neke druga intrakranijalna hemoragija, kao i pacijenti kod kojih se razvila sICH nakon rtPA terapije statistički značajno češće su istovremeno imali TT genotip za oba ispitivana polimorfizma. Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da je TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma povezan sa višim nivoima ovog enzima u plazmi i posledičnim oštećenjem KMB nakon IMU, a da TT genotip -303 C/T polimorfizma *TIMP-2* gena, verovatno, putem smanjenja regulacije *TIMP-2* gena, dovodi do pojačavanja ovog efekta, što rezultira češćom pojavom HT, sICH i drugih hemoragija. S obzirom da je ovo prva studija koja je ispitivala uticaj *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma, kako pojedinačno, tako i u kombinaciji sa *MMP-9* -1562 C/T polimorfizmom, trenutno nije moguće prodiskutovati ove rezultate. Finalno, svih 166 pacijenata u našoj studiji je bilo homozigotno za G alel za ispitivani -418 G/C polimorfizam *TIMP-2* gena, što ukazuje da je učestalost C alela *TIMP-2* -418 G/C polimorfizma u našoj populaciji veoma niska.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije:

1. **Dušanović Pjević M**, Beslac Bumbaširevic L, Vojvodic L, Grk M, Maksimović N, Damnjanović T, Novaković I, Kačar K, Pesic M, Perovic D, Savic M, Maksic V, Trickovic J, Jekic B. Analysis of the Association Between Polymorphisms within PAI-1 and ACE genes and Ischemic Stroke Outcome After rt-PA Therapy. *J Pharm Pharm Sci.* 2019;22:142-149. DOI: <https://doi.org/10.18433/jpps30339>

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija "ISPITIVANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA KOJI REGULIŠU FIBRINOLIZU I INTEGRITET VANĆELIJSKOG MATRIKSA SA EFEKTIMA TERAPIJE ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA REKOMBINOVANIM TKIVNIM AKTIVATOROM PLAZMINOGENA" kandidata dr Marije Dušanović Pjević, predstavlja originalni naučni doprinos razumevanju uticaja nasledne osnove na terapijski odgovor i pojavu neželjenih hemoragijskih komplikacija kod pacijenata lečenih rtPA terapijom nakon akutnog ishemijskog moždanog udara. Treba imati u vidu da je ovo jedna među prvim farmakogenetičkim studijama u svetu koje se bave uticajem genetičkih polimorfizama na efekte terapije akutnog ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena, kao i pojavu rtPA indukovanih neželjenih događaja. Preventivno određivanje genotipova genskih polimorfizama, koji su povezani sa ispoljavanjem hemoragijskih komplikacija indukovanih rtPA terapijom, kod osoba sa povećanim rizikom za ishemijski moždani udar, doprinelo bi prilagođavanju terapijskog protokola u zavisnosti od genotipa. Rezultati doktorske disertacije dr Dušanović Pjević su ukazali da su određeni genotipovi izabranih polimorfizama povezani sa hemoragijskim komplikacijama izazvanih rtPA terapijom kod pacijenata sa IMU, ali ne i sa efikasnošću terapije rtPA, tačnije da TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma može biti faktor rizika za hemoragijske komplikacije nakon IMU lečenog rtPA, posebno u kombinaciji sa TT genotipom *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma. S obzirom na težinu kliničke slike akutnog ishemijskog moždanog udara i činjenicu da je rtPA trenutno jedini lek dostupan za lečenje akutnog IMU, kao i na to da hemoragijska transformacija predstavlja izuzetno ozbiljan neželjeni efekat ove terapije, rezultati ove studije, ukoliko se potvrde, mogli bi značajno uticati na bolju selekciju pacijenata kod kojih će se primiti terapija. Preventivno određivanje ciljanih genskih polimorfizama koji su povezani sa rtPA-indukovanim hemoragijskim

komplikacijama kod osoba u riziku za IMU umnogome bi ubrzalo oporavak pacijenata, poboljšalo kvalitet života, ali i sprečilo pojavu hemoragijskih komplikacija nakon IMU lečenog rtPA kod pacijenata sa određenim genotipom. Rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji dr Dušanović Pjević mogu biti korisni za dalja istraživanja u ovoj oblasti ispitivanjem uticaja drugih polimorfizama na efikasnost i pojavu neželjenih efekata rtPA terapije, imajući u vidu opterećenje ishemijskim moždanim udarom u populaciji Srbije.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je 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 Marije Dušanović Pjević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 18. novembar 2020. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Suzana Cvjetičanin

Mentor:

Prof. dr Biljana Jekić

Prof. dr Tatjana Damjanović

Komentor:

Prof. dr Ljiljana Beslać Bumbaširević

Prof. dr Marija Žarkov
