

**UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET**

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**

**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

**Predmet:** Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dr med. Branislave Radojević

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 10.03.2022. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata dr med. Branislave Radojević, pod naslovom:

**„Korelacija odabranih genetičkih polimorfizama i komplikacija dugotrajne primene levodope kod osoba koje boluju od Parkinsonove bolesti“**

**Komisija u sastavu:**

1. Dr Ivan Jančić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet – predsednik Komisije
2. Dr Marina Svetel, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
3. Dr Igor Petrović, docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

**Mentori:**

Dr Miroslav Savić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Nataša Dragašević Mišković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći:

## **I Z V E Š T A J**

### **1. OSNOVNI PODACI O KANDIDATU I DISERTACIJI**

#### **A. Osnovni podaci o kandidatu**

Branislava Radojević je rođena u Rumi gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Obrazovanje je stekla na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gde je završila osnovne studije medicine, sa prosečnom ocenom 9,03 i stekla stručni naziv doktora medicine. Nakon fakulteta obavila je lekarski staž na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu. Od 2007. do 2018. godine radila je kao lekar opšte prakse. Specijalistički ispit iz neurologije položila je 2018. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa odličnom ocenom i time stekla zvanje specijaliste neurologije. Od 2018. godine je zaposlena kao neurolog u Specijalnoj bolnici za cerebrovaskularne bolesti „Sveti Sava“ u Beogradu.

Član je Srpskog lekarskog društva i Društva neurologa Srbije.

Dr Branislava Radojević govori engleski jezik.

#### **B. Naslov disertacije:**

**„Korelacija odabranih genetičkih polimorfizama i komplikacija dugotrajne primene levodope kod osoba koje boluju od Parkinsonove bolesti“**

#### **C. Obim disertacije.**

Disertacija dr med. Branislave Radojević napisana je na 134 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Bolesnici, materijal i metode istraživanja, Rezultati ispitivanja, Diskusija, Zaključci, Literatura, Lista skraćenica i Prilozi. U disertaciji se nalaze ukupno 53 tabele i 19 slika, od čega su rezultati prikazani kroz 44 tabele i 2 slike. U poglavlju Literatura vankuverskim stilom citiran je 281 literaturni navod. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

#### **D. Bibliografski podaci.**

U dosadašnjem naučnoistraživačkom radu Branislava Radojević je kao autor objavila 2 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21) i 1 rad u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorije M22). Na skupovima od međunarodnog značaja učestvovala je sa 5 saopštenja, a na skupu nacionalnog značaja sa 2 saopštenja.

##### *Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)*

1. **Radojević B**, Dragašević-Mišković N, Marjanović A, Branković M, Dobričić V, Milovanović A, Tomić A, Svetel M, Petrović I, Jančić I, Stanisavljević D, Kostić V. Clinical and Genetic Analysis of Psychosis in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2021;11(4):1973-1980. doi: 10.3233/JPD-212716. (IF 5,568 za 2020; 62/273 Neuroscience)

2. **Radojević B**, Dragašević-Mišković N, Marjanović A, Branković M, Milovanović A, Petrović I, Svetel M, Jančić I, Stanisavljević D, Milićević O, Savić M, Kostić V. The correlation between genetic factors and freezing of gait in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders.* 2022; (98):7–12. (IF 4,891 za 2020; 51/208 Clinical Neurology)

##### *Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)*

**Radojević B**, Dragašević-Mišković N, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Pešić M, Tomić A, Stanisavljević D, Savić M, Kostić V. Adherence to Medication among Parkinson's Disease Patients Using the Adherence to Refills and Medications Scale. *International Journal of Clinical Practice.* 2022, doi.org/10.1155/2022/6741280. (IF 2,503 2020; 73/169 Medicine, General and Internal)

##### *Saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)*

Petronijević M, **Radojević B**, Katarina I. Ethanol-drug interactions: data from the WHO UMC database. *International Society of Pharmacovigilance Pisa, Italy, 2013.*

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Marjanović A, Dobričić V, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Savić M, Jančić I, Novaković I, Kostić VS. The influence of polymorphisms in *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2*, and *ANKK1* genes on the onset of complications of long-term use of levodopa in individuals with Parkinson's disease. *FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, Jul 2019.*

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Marjanović A, Milovanović A, Svetel M, I. Petrović I, Savić M, Jančić I, Kostić VS. The influence of ANKK1/DRD2 haplotypes on the onset of complications of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorder, Philadelphia, PA, USA, Septembar 13-17, 2020.

**Radojević B**, Dragašević N, Milovanović A, Branković M, Svetel M, Dobričić V, Petrović I, Savić M, Stanisavljević D, Kostić V. Selected genetic polymorphisms of *COMT*, *DRD2*, *ANKK1*, and *DAT* genes and the risk of psychosis in Parkinson's disease, 7th Congress of the European Academy of Neurology, Jun 2021.

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Marjanović A, Branković M, Dobričić V, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Savić M, Jančić I, Stanisavljević D, Kostić VS. Clinical and genetic analysis of psychosis in Parkinson's disease Virtual Congress of MDS, Septembar 2021.

Saopštenja na skupu nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Marjanović A, Dobričić V, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Savić M, Jančić I, Novaković I, Kostić VS. Korelacija odabranih polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena i komplikacija dugotrajne primene levodope kod obolelih od Parkinsonove bolesti. XII/XVIII Kongres neurologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka Banja, Srbija, Novembar 2019

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Savić M, Kostić VS. Adherenca pacijenata sa idiopatskom Parkinsonovom bolešću u Srbiji: studija preseka, XII/XVIII Kongres neurologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka Banja, Srbija, Novembar 2019.

## **2. PREDMET I CILJ DISERTACIJE**

**Predmet disertacije** bio je ispitivanje korelacija odabranih polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena i pojave motornih i nemotornih komplikacija usled dugotrajne primene levodope kod osoba koje boluju od Parkinsonove bolesti (PB).

**Ciljevi ove doktorske disertacije bili su da se ispita:** tip i učestalost pojave komplikacija dugotrajne primene levodope (motornih fluktuacija, diskinezija, halucinacija i psihoza) u grupi ispitanika; učestalost polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena u

grupi ispitanika; potom, korelacija između odabranih polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena i pojave motornih fluktuacija i diskinezija, kao i korelacija između odabranih polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena i pojave halucinacija i psihoza.

### 3. OSNOVNE HIPOTEZE

Istraživanja sprovedena u okviru disertacije bila su zasnovana na hipotezi da su polimorfizmi u različitim genima koji učestvuju u metabolizmu i transportu dopamina u vezi sa pojavom neželjenih efekata primene levodope kod bolesnika koji boluju od PB.

### 4. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

U **Uvodu** postoje tri tematske celine (*Parkinsonova bolest; Farmakoterapija Parkinsonove bolesti; Polimorfizmi gena*) u kojima je dat pregled naučnih saznanja značajnih za predmet proučavanja doktorske disertacije.

U prvom potpoglavlju **Uvoda** (*Parkinsonova bolest*) prikazani su osnovni epidemiološki, patofiziološki i klinički podaci o PB. Opisani su kardinalni motorni znaci (bradikinezija, rigiditet, tremor u miru i posturalna nestabilnost), druge motorne manifestacije bolesti (poremećaj hoda, motorni blokovi u hodu, padovi, poremećaji govora i gutanja i posturalni deformiteti), kao i nemotorne manifestacije PB (psihijatrijske, autonomne, poremećaji spavanja, senzorni poremećaji). Posebno su opisani psihotični simptomi bolesti: minorni fenomeni, halucinacije i sumanute ideje. U završnom delu ovog potpoglavlja opisano je postavljanje dijagnoze PB i klinički tok bolesti.

U drugom potpoglavlju **Uvoda** (*Farmakoterapija Parkinsonove bolesti*) opisana je neurofiziologija dopaminergičkog sistema (dopaminergička sinapsa, dopaminski receptori i dopaminergički putevi u centralnom nervnom sistemu). Potom je opisana medikamentozna terapija PB. Detaljno su prikazane karakteristike terapije levodopom, motorne komplikacije dugotrajne primene levodope, tipovi motornih komplikacija dugotrajne primene levodope, levodopom indukovane diskinezije i mehanizam nastanka motornih komplikacija izazvanih levodopom. Potom su redom prikazane osnovne karakteristike terapije dopaminskim agonistima, COMT inhibitorima, MAO-B inhibitorima, zonisamidom, istradefilinom (u međuvremenu, osporeno stavljanje u promet), amantadinom i antiholinergičkim lekovima.

Poslednji deo ovog potpoglavlja se odnosi na farmakoterapijski protokol PB, terapiju motornih i nemotornih komplikacija.

U trećem potpoglavlju **Uvoda** (*Polimorfizmi gena*) dat je prikaz odabranih polimorfizama *COMT*, *DRD2*, *ANKK1* i *DAT* gena koji su bili predmet ispitivanja ove doktorske disertacije, kao i prikaz studija koje su se do sada bavile ovim polimorfizmima. Pre svega, opisan je *COMT* gen, uloge koje ima COMT enzim i objašnjeno od čega zavisi nivo enzimske aktivnosti COMT enzima tj. rs4680 *COMT* polimorfizma. Navedeno je da su dosadašnja istraživanja pokazala kontroverzne rezultate o povezanosti polimorfizma rs4680 *COMT* gena i odgovora na levodopu. Potom su opisani rs2283265, rs1076560 i rs6277 polimorfizmi *DRD2* gena, kao i rs1800497 i rs2734849 polimorfizmi *ANKK1* gena. Objašnjeno je da je T alel rs6277 *DRD2* gena udružen sa smanjenjem afiniteta DRD2 receptora u strijatumu, dok minor aleli rs2283265 i rs1076560 *DRD2* smanjuju ekspresiju D<sub>2S</sub> receptorske varijante čime je narušena funkcija negativne povratne sprege i povećana količina dopamina u sinaptičkoj pukotini. Dalje se navodi da je nekoliko studija pokazalo smanjenje gustine DRD2 receptora kod nosilaca T alela rs1800497 *DRD2* gena kao i da SNP rs2734849 može da utiče na gustinu DRD2 receptora menjajući nivo ekspresije NF-κB, koji predstavlja nužan faktor za transkripciju DRD2. Na kraju ovog potpoglavlja opisan je polimorfizam varijabilnog broja tandemskih ponovaka (eng. *Variable Number of Tandem Repeats; VNTR*) *DAT* gena koji je identifikovan u nekodirajućem 3'UTR regionu i koga čini sekvenca od 40 baznih parova koja se ponavlja od najmanje 3 do najviše 11 puta. Aleli sa 9 i 10 ponovaka se najčešće sreću, a broj ponovaka može uticati na gensku ekspresiju i time preuzimanje dopamina iz sinaptičke pukotine.

**Ciljevi rada** su precizno definisani i usmereni su na klinička i genetička ispitivanja. Ciljevi rada mogu se podeliti u 4 celine: 1. ispitivanje tipa i učestalosti pojave komplikacija dugotrajne primene levodope (motornih fluktuacija, diskinezija, halucinacija i psihoza) u grupi ispitanika; 2. ispitivanje učestalosti polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena u grupi ispitanika; 3. ispitivanje korelacije između odabranih polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena i pojave motornih fluktuacija i diskinezija; 4. ispitivanje korelacije između odabranih polimorfizama *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2* i *ANKK1* gena i pojave halucinacija i psihoza.

U poglavlju **Bolesnici, metode i materijal** navedeno je da je istraživanje sprovedeno na Klinici za neurologiju i u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških

bolesti Klinike za neurologiju, UKCS, u Beogradu. Ispitivana populacija obuhvatila je 234 osobe obolele od idiopatske PB. Jasno su definisani kriterijumi odabira bolesnika kao i ekskluzioni kriterijumi. Za prikupljanje podataka o sociodemografskim i fenotipskim karakteristikama bolesnika sa PB, korišćen je unapred dizajniran semistrukturisani upitnik. U istraživanju je korišćena opsežna baterija testova i upitnika za procenu težine motornih simptoma i stadijuma bolesti, kognitivnog i bihevioralnog statusa bolesnika, procenu diskinezija, halucinacija i psihoze.

Genetičke analize: izolovanje genomske DNK iz limfocita periferne krvi, genotipizacija za 3 polimorfizma u *DRD2* genu (rs2283265, rs1076560, rs6277), 2 polimorfizma u *ANKK1* genu (rs1800497 i rs2734849) i 1 polimorfizam u *COMT* genu (Val158Met, rs4680) metodom PCR u realnom vremenu, potom, određivanje broja ponovaka u 3'UTR regionu *DAT* gena pomoću PCR metode i razdvajanje dobijenih fragmenata na agaroznom gelu rađeni su u genetskoj laboratoriji Klinike za neurologiju, UKCS. U tekstu je precizno navedna metodologija postupka genetske analize. U ovom delu studije učestvovalo je 234 pacijenta sa PB i 234 zdravih kontrola.

Kao poseban odeljak opisana je statistička obrada podataka.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U poglavlju **Rezultati** su predstavljeni svi rezultati dobijeni u sklopu istraživanja ove doktorske disertacije. Dat je detaljan opis i rezultati su prikazani kroz 44 tabele i 2 slike.

U poglavlju **Diskusija** prikazana je detaljna analiza rezultata dobijenih u okviru ove disertacije, u kontekstu dostupnih literaturnih podataka.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su najvažniji zaključci koji proističu iz rezultata sprovedenog istraživanja i koji su u skladu sa postavljenim ciljevima rada.

Na kraju doktorske disertacije nalazi se poglavlje **Literatura**, u kom su navedene sve reference (ukupno 281) koje su korišćene tokom izrade ove doktorske disertacije.

## **5. OSTVARENI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS DOKTORSKE DISERTACIJE**

Rezultati dobijeni u doktorskoj disertaciji predstavljeni su u 4 celine (potpoglavlja).

U prvoj celini prikazani su rezultati ispitivanja koji su se odnosili na demografske i kliničke karakteristike obolelih od PB.

Druga celina se odnosi na rezultate koji predstavljaju poređenje grupa obolelih u odnosu na prisustvo komplikacija dugotrajne primene levodope, potom razlike u demografskim, kliničkim i terapijskim specifičnostima grupe obolelih sa diskinezijama i grupe obolelih bez diskinezija, kao i grupe obolelih sa halucinacijama i grupe obolelih bez halucinacija, i razlike grupe obolelih sa psihozom u PB i bez psihoze. Rezultati ukazuju da su faktori rizika za nastanak diskinezija kod obolelih od PB bili: ženski pol, mlađi uzrast na početku oboljenja, duže trajanje bolesti, više doze levodope i više ekvivalentne doze levodope. Oboleli od PB kod kojih su se razvile diskinezije imali su teži stepen kliničkog ispoljavanja bolesti, veći stepen onesposobljenosti, češće prisustvo bihevioralnih poremećaja poput depresije i anksioznosti, kao i veće opterećenje nemotornim manifestacijama PB u odnosu na obolele osobe bez diskinezija. Faktori rizika za nastanak halucinacija kod obolelih od PB bili su: mlađi uzrast na početku bolesti, duže trajanje bolesti, viši stadijum i teži stepen bolesti, kognitivni deficit, primena viših doza levodope i viših ekvivalentnih doza levodope. Oboleli od PB kod kojih se nisu razvile halucinacije češće su patili od depresije, anksioznosti i imali su veći stepen opterećenosti nemotornim simptomima PB u poređenju sa obolelim bez halucinacija. Faktori rizika za nastanak psihoze u Parkinsonovoj bolesti (PPB) bili su: mlađi uzrast na početku PB, duže trajanje bolesti, više doze levodope i više ekvivalente doze levodope. Oboleli od PB kod kojih je dijagnostikovano i prisustvo PPB imali su teži stepen kliničkog ispoljavanja bolesti, veći stepen onesposobljenosti, češće prisustvo depresije, anksioznosti i kognitivnog deficita u poređenju sa ispitanicima bez PPB. Primena antipsihotičnih lekova nije bila konfauding faktor u nastanku PPB.

U trećoj celini prikazani su redom rezultati genotipizacije kao i uticaj *ANKK1/DRD2* haplotipova na pojavu komplikacija dugotrajne primene levodopa. Rezultati su pokazali da nije postojala statistički značajna udruženost motornih fluktuacija i ispitivanih polimorfizama *COMT*, *DAT*, *DRD2* i *ANKK1* gena. Polimorfizam rs4680 *COMT* gena je bio faktor rizika za nastanak diskinezija. Nosioi AA genotipa rs4680 *COMT* gena su imali veću učestalost diskinezija u odnosu na nosioce AG i GG genotipa. Nije postojala udruženost ispitivanih polimorfizama *DRD2*, *ANKK1* i *DAT* gena i motornih komplikacija. Nosioi GGAAA i AGGAA *ANKK1/DRD2* haplotipova imali su značajno veću učestalost motornih fluktuacija u odnosu na obolele osobe koji nisu bili nosioi ovih haplotipova. Nosioi GG genotipa rs2734849 *ANKK1* gena su imali značajno veću učestalost halucinacija u odnosu na AA i AG



nosioce. Nosioci AA genotipa rs6277 *DRD2* gena imali su značajno veću učestalost PPB u odnosu na obolele nosioce GG i GA genotipa. Nosioci GG genotipa rs2734849 *ANKKI* gena imali su značajno veću učestalost PPB u odnosu na nosioce AA i AG genotipa.

U četvrtoj celini dat je prikaz rezultata logističke regresione analize. Nosioci AA genotipa rs4680 *COMT* gena imali su 1,8 puta veći rizik od nastanka diskinezija. GG genotip rs2734849 *ANKKI* gena je nosio 1,8 puta veći rizik od nastanka halucinacija u odnosu na AA i AG genotip. AA genotip 6277 *DRD2* gena je nosio 2,3 puta veći rizik od nastanka PPB u odnosu na GG i GA genotip. GG genotip rs2734849 *ANKKI* gena nosio je 2,2 puta veći rizik od nastanka PPB u odnosu na AA i AG genotip. Nezavisni faktori rizika za nastanak PPB bili su: LEDD  $\geq$  900 mg, depresija, anksioznost i GG genotip rs2734849 *ANKKI* gena.

## 6. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

U okviru poglavlja **Diskusija**, dobijeni rezultati istraživanja su detaljno analizirani i razmatrani u kontekstu dostupnih literaturnih podataka.

Prema rezultatima ove studije, od ukupnog broja ispitanika, motorne fluktuacije su bile prisutne kod 74,8% pacijenata, dok je polovina ispitanika (51,3%) imala diskinezije. Prema rezultatima drugih studija incidenca motornih fluktuacija nakon 4 godine do 6 godina lečenja levodopom iznosi 12% do 60%, a diskinezija od 8% do 64% (Ahlskog i sar., 2001). Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazuju da su oboleli kod kojih su se razvile diskinezije bili češće ženskog pola, mlađeg uzrasta na početku bolesti, dužeg trajanja bolesti, lečeni su višim dozama levodope i višim ekvivalentnim dozama levodope. Skorovi na skalama za procenu težine i stadijuma bolesti, potom depresije, anksioznosti i opterećenosti nemotornim simptomima su bili statistički značajno viši u grupi obolelih sa diskinezijama u poređenju sa obolelim osobama bez diskinezija. Brojne studije su pokazale da najveći rizik za razvoj diskinezija imaju pacijenti sa mlađim uzrastom na početku bolesti (Dragašević-Mišković i sar., 2019; Schrag i sar., 2000; Van Grepén i sar., 2006). Oboleli sa diskinezijama u ovoj studiji su lečeni značajno višim dnevnim dozama levodope i višim ekvivalentnim dozama levodope. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima ELLDOPA studije koja je pokazala da se prevalencija diskinezija povećava sa povećanjem dnevne doze levodope (Fahn i sar., 2002). Bolesnici koji su primali dnevne doze levodope veće od 600 mg imali su značajno veću učestalost diskinezija u poređenju sa onima koji su koristili 300 mg (Fahn i

sar., 2002). Studija iz Gane koja je uključila pacijente koji prethodno nisu bili lečeni levodopom je pokazala da diskinezije imaju veze sa dužinom trajanja bolesti i dozom levodope, ali ne i sa dužinom uzimanja levodope (Cilia i sar., 2014).

Ova studija je pokazala da je statistički značajno veća učestalost diskinezija u grupi ispitanika koji su nosioci AA genotipa rs4680 *COMT* gena u odnosu na nosioce AG i GG genotipa. Nosioci AA genotipa rs4680 *COMT* gena su imali 1,8 puta veći rizik od nastanka diskinezija. Prethodne studije o povezanosti polimorfizma rs4680 *COMT* gena i diskinezija u PB pokazale su nedosledne rezultate. Prospektivna studija sprovedena u Holandiji (de Lau i sar., 2012) koja je uključila 219 osoba obolelih od PB pokazala je da postoji dvostruko veći rizik od razvoja diskinezija tokom terapije levodopom kod nosilaca AG genotipa, odnosno, 2,81 puta veći rizik kod nosilaca AA genotipa. Međutim, rezultati drugih kliničkih studija nisu potvrdili predviđanja da će alel sa niskom aktivnošću imati povećan rizik od diskinezija. Studije preseka u kohorti od 322 poljska pacijenta sa PB i 104 italijanska pacijenta sa PB nisu pokazale značajan uticaj *COMT* polimorfizma na razvoj diskinezija (Bialecka i sar., 2008; Contin i sar., 2005). Druga studija na 1087 kineskih pacijenata sa PB takođe nije pokazala povezanost između rs4680 polimorfizma *COMT* gena i diskinezija (Hao i sar., 2014). Međutim, u ovoj studiji GG genotip je bio značajno češći kod pacijenata sa motornim fluktuacijama u odnosu na pacijente kod kojih se one nisu javile (Hao i sar., 2014).

U ovom istraživanju nije pokazana povezanost drugih ispitivanih polimorfizama *DRD2*, *ANKK1* i *DAT* gena i motornih komplikacija. Nalazi drugih studija bili su nekonkluzivni. Studija Lee i saradnika koja je uključila 503 pacijenta sa PB koji su lečeni levodopom najmanje 5 godina nije pokazala udruženost polimorfizma rs1800497 *ANKK1* gena sa motornim fluktuacijama i diskinezijama (Lee i sar., 2011). U studiji Wang i saradnika koja je uključila 140 pacijenata sa PB AA genotip rs1800497 *ANKK1* gena je bio udružen sa povišenim rizikom od motornih fluktuacija (Wang i sar., 2001). Kaiser i saradnici pokazali su da se alel sa 9 ponovaka 40bp VNTR *DAT* gena javlja mnogo češće kod pacijenata koji su razvili diskinezije (Kaiser i sar., 2003).

U ovoj studiji halucinacije su bile prisutne kod 41,9% obolelih ispitanika, pri čemu su formirane VH bile najčešći psihotični simptom (38,9%). Prevalenca VH u drugim studijama varira između 6% i 60% (Williams i sar., 2005; Diederich i sar., 2005). Slušne halucinacije je referisalo 14,9% ispitanika u ovom istraživanju, dok su se u drugim studijama javljale u približno 20% ispitanika (Fenelon i sar., 2010). Slušne halucinacije se javljaju najčešće

udruženo sa VH (Fenelon i sar., 2010), što je pokazala i ova studija. Deluzije se javljaju sa prevalencom u rasponu od 3% do 14%, a u ovoj studiji su bile prisutne kod 14% pacijenata. Minorne fenomene je imalo 24,7% pacijenata, slično rezultatima drugih studija (20%-45%) (Schneider i sar., 2017).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su pacijenti kod kojih su se javile halucinacije bili mlađeg uzrasta na početku bolesti, dužeg trajanja bolesti, višeg stadijuma i težine bolesti, lošijeg kognitivnog statusa, da su lečeni višim dozama levodope i višim ekvivalentnim dozama levodope. Skorovi na skalama depresije, anksioznosti i nemotornih simptoma su, takođe, bili viši kod ispitanika sa halucinacijama u poređenju sa onim bez halucinacija. Druge studije su, takođe, kao i ova demonstrirale vezu između trajanja bolesti i pojave halucinacija (Gupta i sar., 2004; Sanchez-Ramos i sar., 1996) Prema studiji Grahama i saradnika kod pacijenata sa halucinacijama kod kojih je PB trajala 5 godina ili manje, VH su bile udružene sa bržim napredovanjem motornih, ali ne i kognitivnih simptoma, dok su kod ostalih sa dužim trajanjem bolesti, VH bile povezane sa posturalnom nestabilnošću i globalnim kognitivnim padom (Graham i sar., 1967). Kao i ova studija, većina drugih studija je pokazala vezu između stadijuma bolesti, težine bolesti i prisustva halucinacija (Barnes i sar., 2001).

Koristeći NINDS/NIMH kriterijume za psihozu u PB (Ravina i sar., 2007) pronađeno je da je 43,2% pacijenata imalo psihozu. Prevalencija psihoze u PB varira u velikoj meri, od 16%-75% u studijama preseka zbog razlika u odabranim dijagnostičkim kriterijumima i specifičnostima ispitivane populacije (Schneider i sar., 2017; Fenelon i sar., 2001). Nedavne longitudinalne studije utvrdile su porast incidence psihoze u PB tokom perioda praćenja sa oko 18% na 74% (Forsaa i sar., 2015; Hely i sar., 2005). Ovo istraživanje je pokazalo da su pacijenti sa psihozom bili mlađi na početku bolesti i da su imali duže trajanje bolesti. Dodatno, pacijenti sa psihozom su imali niže rezultate na testu procene kognitivnih funkcija i više skorove svih motornih i nemotornih skala (težina bolesti, funkcionalna onesposobljenost, nemotorni simptomi, depresija, anksioznost) u poređenju sa ispitanicima bez psihoze. U ovoj studiji, pacijenti sa psihozom su lečeni višim dozama levodope i višim ekvivalentnim dozama levodope u poređenju sa ispitanicima koji nisu imali psihotične simptome. U multivarijantnom modelu vrednosti LEDD  $\geq$  900 mg su bile nezavisni prediktor koji udvostručuje rizik od nastanka psihoze u PB. Suprotno ovim rezultatima, neke studije preseka nisu pronašle značajnu razliku u dnevnim dozama levodope između pacijenata sa PB sa i bez halucinacija (Papaetropoulos i sar., 2005; Fenelon i sar., 2000; Chang i sar., 2016). Dugo se

smatralo da su psihotični simptomi sporedni efekat dugotrajne dopaminergičke terapije, a neki od njih kao što su DA, antiholinergici i amantadin nose veći rizik od halucinacija (Chang i sar., 2016; Marsh i sar., 2004). Ovo se ponekad nazivalo farmakotoksičnom psihozom, odnosno, lekom indukovana psihoza. U radu je objašnjeno da koncept farmakotoksične psihoze potkrepljuju klinička zapažanja da se psihotični simptomi mogu povući nakon redukcije doze ili obustave dopaminergičkih lekova kao i činjenica da antagonisti dopaminskih receptora pokazuju korist u lečenju psihotičnih simptoma. Međutim, postoje i studije koje pokazuju da psihoza u PB nije samo „lekom indukovana“, već da postoje i drugi faktori koji mogu da doprinesu njenom nastanku. U prilog ovom shvatanju navode se rezultati jedne longitudinalne studije koja je pokazala da su se psihotični simptomi ponovo pojavili za manje od jedne godine kod polovine PB pacijenata sa psihozom nakon smanjenja doze ili uvođenja antipsihotičnih lekova (Goetz i sar., 2008). Halucinacije, koje su uglavnom bile slušne, pojavile su se samo u 1% pacijenata lečenih dopaminskim agonistima zbog tumora hipofize (Turner i sar., 1984) Takođe, zanimljiv je i podatak o pojavi psihoze kod pacijenata sa PB koji nisu primali dopaminergičku terapiju (Dotchin i sar., 2009). Zaključeno je da antiparkinsonski lekovi sami po sebi nisu ni neophodni, ni dovoljni da izazovu psihozu u PB, te da najverovatnije dopaminergički lekovi predstavljaju „okidače“ psihotičnih simptoma u prisustvu neurodegenerativnog procesa koji leži u osnovi (Marsh i sar., 2004).

Ovo istraživanje je pokazalo da su AA genotip rs6277 *DRD2* gena i GG genotip rs2734849 *ANKK1* gena bili češći kod pacijenata sa psihozom u poređenju sa ispitanicima koji nisu imali psihozu. Udruženost drugih ispitivanih polimorfizama (rs4680 *COMT*, rs1076560 i rs2283265 *DRD2* i rs1800497 *ANKK1* gena) sa pojavom psihoze nije utvrđena u ovoj studiji. Do sada postoji samo jedna studija koja se bavila uticajem sličnih polimorfizma *DRD2* i *ANKK1* gena kao i ova studija u nastanku halucinacija. Pomenuta studija je pokazala značajnu povezanost TaqIA polimorfizma i kasnih halucinacija (halucinacije koje su se razvile 5 godina nakon pojave prvih simptoma PB), ali ne i ranih halucinacija, što sugeriše da je ovaj polimorfizam faktor rizika koji postaje klinički značajan sa dužim trajanjem bolesti (Makoff i sar., 2000). Pored toga, VH u PB su bile povezane sa polimorfizmom Ser9Gli *DRD3* gena u jednoj studiji (Goetz Cg i sar., 2001). U ovoj studiji nije pokazana povezanost između rs4680 *COMT* gena i psihoze u PB. Ovakav nalaz je u skladu sa retrospektivnom studijom Camicioli i saradnika koja je uključila pacijente sa autopsijom dokazanom PB i studijom Creese i saradnika koja je obuhvatila dementne pacijente sa PB (Camicioli i sar., 2005; Creese i sar., 2012). Objasnjeno je da ovakvi rezultati sugerišu da dopamin verovatno

ima ograničenu ulogu u patogenezi psihotičnih simptoma u PB u poređenju sa drugim neurotransmiterima. Ova studija nije pokazala povezanost VNTR *DAT* gena i psihoze u PB. Retrospektivna studija u kojoj je učestvovalo 183 pacijenta sa PB je pokazala da se alel sa 9 ponavljanja javlja mnogo češće kod pacijenata sa psihozom ili diskinezijom (Kaiser i sar., 2003). Ovo otkriće može biti u skladu sa *in vitro* podacima koji sugerišu da je alel od 9 kopija *DAT* gena povezan sa povećanom ekspresijom *DAT* u poređenju sa alelom od 10 kopija i da može vremenom dovesti do povećanog oštećenja strijatalnih neurona zbog povećanog presinaptičkog unosa dopamina. Studija preseka Schumacher-Schuh i saradnika nije pronašla značajniju povezanost VH sa polimorfizmom 3'VNTR (Schumacher-Schuh i sar., 2013).

### **Citirana literatura**

Ahlskog JE, Muenter MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord.* 2001;16:448-458.

Barnes J, David AS. Visual hallucinations in Parkinson's disease: a review and phenomenological survey. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;70:727-733.

Bialecka M, Kurzawski M, Klodowska-Duda G, Opala G, Eng-King T, Drozdziak M, et al. The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response, and complications. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18:815-821.

Camicioli R, Rajput A, Rajput M, Reece C, Payami H, Hao C, et al. Apolipoprotein E ε4 and catechol-O-methyltransferase alleles in autopsy-proven Parkinson's disease: Relationship to dementia and hallucinations. *Mov Disord.* 2005;20:989-994.

Chang A, Fox SH. Psychosis in Parkinson's Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Drugs.* 2016;76:1093-1118.

Cilia R, Akpalu A, Sarfo FS, Cham M, Amboni M, Cereda E, et al. The modern pre-levodopa era of Parkinson's disease: insights into motor complications from sub-Saharan Africa. *Brain.* 2014;137:2731-2742.

Contin M, Martinelli P, Mochi M, Riva R, Albani F, Baruzziet A. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and levodopa pharmacokinetic-pharmacodynamic pattern in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005;20:734-739.

Creese B, Ballard C, Aarsland D, Londos E, Sharp S, Jones E. No association of COMT Val158met polymorphism and psychotic symptoms in Lewy body dementias. *Neurosci Lett.* 2012; 531:1-4.

de Lau LM, Verbaan D, Marinus J, Heutink P, van Hilten JJ. Catechol-O-methyltransferase Val158Met and the risk of dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012;27:132-135.

- Diederich NJ, Goetz CG, Stebbins GT. Repeated visual hallucinations in Parkinson's disease as disturbed external/internal perceptions: focused review and a new integrative model. *Mov Disord.* 2005;20:130–40.
- Dotchin CL, Jusabani A, Walker RW. Non-motor symptoms in a prevalent population with Parkinson's disease in Tanzania. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15:457–460.
- Dragašević-Mišković N, Petrović I, Stanković I, Kostić V. Chemical management of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease patients. *Expert Opin Pharmacother.* 2019;20:219-230.
- Fahn S. Results of the ELLDOPA (earlier vs later levodopa) study. *Mov Disord.* 2002;17:13-14.
- Fenelon G, Mahieux F, Huon R, Ziegler M. Hallucinations in Parkinson's disease: prevalence, phenomenology and risk factors. *Brain.* 2000;123:733-745.
- Fenelon G, Soulas T, Zenasni F, de Langavant LC. The changing face of Parkinson's disease-associated psychosis: a cross-sectional study based on the new NINDS-NIMH criteria. *Mov Disord.* 2010;25:763-766.
- Forsaa EB, Larsen JP, Wentzel-Larsen , Alves G. A 12-year population-based study of freezing of gait in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015;21:254-8.
- Goetz CG, Burke PF, Leurgans S, Berry-Kravis E, Blasucci LM, Raman R, et al. Genetic variation analysis in Parkinson disease patients with and without hallucinations: case-control study. *Arch Neurol.* 2001;58:209-213.
- Goetz CG, Fan W, Leurgans S. Antipsychotic medication treatment for mild hallucinations in Parkinson's disease: positive impact on long-term worsening. *Mov Disord.* 2008;23:1541-1545.
- Graham JM, Grunewald RA, Sagar HJ. Hallucinosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1967;63:434-440.
- Gupta M, Singh G, Khwaja GA, Mehndiratta MM. Hallucinations in Parkinson's Disease - A Study of Forty Three Patients. *JAPI.* 2004; 52:703-706.
- Hao H, Shao M, An J, Chen C, Feng X, Xie S, et al. Association of catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase B gene polymorphisms with motor complications in parkinson's disease in a Chinese population. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014;20:1041-1045.
- Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord.* 2005;20:190-199.
- Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A, Gasser T, Kupsch A, Roots I, et al. L-dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology.* 2003;60:1750-1755.

Lee JY, Cho J, Lee EK, Park SS, Jeonet BS. Differential genetic susceptibility in diphasic and peak-dose dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011;26:73-79.

Makoff AJ, Graham JM, Arranz MJ, Forsyth J, Li T, Aitchison KJ, et al. Association study of dopamine receptor gene polymorphisms with drug-induced hallucinations in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Pharmacogenetics.* 2000;10:43-48.

Marsh L. Psychosis in Parkinson's Disease. *Curr Treat Options Neurol.* 2004;3:181-189.

Papaetropoulos S, Argyriou A, Ellul J. Factors associated with drug-induced visual hallucinations in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2005;252:1223-1228.

Ravina B, Marder K, Fernandez HH, Friedman JH, McDonald W, Murphy D, et al. Diagnostic criteria for psychosis in Parkinson's disease: report of an NINDS, NIMH work group. *Mov Disord.* 2007, 22:1061-1068.

Sanchez-Ramos JR, Ortoll R, Paulson GW. Visual hallucinations associated with Parkinson disease. *Arch Neurol.* 1996;53:1265-1268.

Schneider RB, Iourinets J, Richard IH. Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis, and management. *Neurodegener. Dis. Manag.* 2017;7.

Schrag A, Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain.* 2000;123:2297-2305.

Schumacher-Schuh AF, Francisconi C, Altmann V, Monte TL, Callegari SM, Rieder CR et al., Polymorphisms in the dopamine transporter gene are associated with visual hallucinations and levodopa equivalent dose in Brazilians with Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;1-8.

Turner TH, Cookson JC, Wass JA, Drury PL, Price PA, Besser GM. Psychotic reactions during treatment of pituitary tumours with dopamine agonists. *Br Med J.* 1984;289:1101-1103.

Van Gerpen JA, Kumar N, Bower JH, Weigand S, Ahlskog JE. Levodopa-associated dyskinesia risk among Parkinson disease patients in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Arch Neurol.* 2006;63:205-209.

Wang J, Liu Z, Chen B. Association study of dopamine D2, D3 receptor gene polymorphisms with motor fluctuations in PD. *Neurology.* 2001;56:1757-1759.

Williams DR, Lees AJ. Visual hallucinations in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a retrospective autopsy study. *Lancet Neurol.* 2005;4:605-610.

## **7. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

### *Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)*

1. **Radojević B**, Dragašević-Mišković N, Marjanović A, Branković M, Dobričić V, Milovanović A, Tomić A, Svetel M, Petrović I, Jančić I, Stanisavljević D, Kostić V. Clinical

and Genetic Analysis of Psychosis in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2021;11(4):1973-1980. doi: 10.3233/JPD-212716. (IF 5,568 za 2020; 62/273 Neuroscience)

2. **Radojević B**, Dragašević-Mišković N, Marjanović A, Branković M, Milovanović A, Petrović I, Svetel M, Jančić I, Stanisavljević D, Milićević O, Savić M, Kostić V. The correlation between genetic factors and freezing of gait in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders.* 2022; (98):7–12. (IF 4,891 za 2020; 51/208 Clinical Neurology)

*Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)*

**Radojević B**, Dragašević-Mišković N, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Pešić M, Tomić A, Stanisavljević D, Savić M, Kostić V. Adherence to Medication among Parkinson's Disease Patients Using the Adherence to Refills and Medications Scale. *International Journal of Clinical Practice.* 2022, doi.org/10.1155/2022/6741280. (IF 2,503 2020; 73/169 Medicine, General and Internal)

*Saopštenja na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)*

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Marjanović A, Dobričić V, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Savić M, Jančić I, Novaković I, Kostić VS. The influence of polymorphisms in *COMT*, *DAT (SLC6A3)*, *DRD2*, and *ANKK1* genes on the onset of complications of long-term use of levodopa in individuals with Parkinson's disease. FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, Jul 2019.

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Marjanović A, Milovanović A, Svetel M, I. Petrović I, Savić M, Jančić I, Kostić VS. The influence of ANKK1/DRD2 haplotypes on the onset of complications of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorder, Philadelphia, PA, USA, Septembar 13-17, 2020.

**Radojević B**, Dragašević N, Milovanović A, Branković M, Svetel M, Dobričić V, Petrović I, Savić M, Stanisavljević D, Kostić V. Selected genetic polymorphisms of *COMT*, *DRD2*, *ANKK1*, and *DAT* genes and the risk of psychosis in Parkinson's disease, 7th Congress of the European Academy of Neurology, Jun 2021.

**Radojević B**, Dragašević-Mišković NT, Marjanović A, Branković M, Dobričić V, Milovanović A, Svetel M, Petrović I, Savić M, Jančić I, Stanisavljević D, Kostić VS. Clinical and genetic analysis of psychosis in Parkinson's disease Virtual Congress of MDS, Septembar 2021.



## **8. ZAKLJUČAK SA OBRAZLOŽENJEM NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija kandidata dr med. Branislave Radojević se zasniva na ispitivanju korelacije odabranih genetičkih polimorfizama *COMT*, *DRD2*, *ANKK1* i *DAT* gena i komplikacija dugotrajne primene levodopa kod obolelih od PB. Zaključci disertacije, koji ukazuju da homozigoti za alel niske *COMT* aktivnosti imaju veću učestalost diskinezija, da polimorfizam rs2734849 *ANKK1* gena indukuje vulnerabilnost za pojavu halucinacija, kao i da nosioci GG genotipa rs2734849 *ANKK1* gena i AA genotipa rs6277 *DRD2* gena imaju 2,2, odnosno 2,3 puta veći rizik od pojave psihoze u PB, od velikog su značaja za razumevanje komplikacija dugotrajne primene levodope kod obolelih od PB i ukazuju da na njihov nastanak bar delimično utiče i sama genetska osnova pacijenta.

Detaljnou analizom priložene doktorske disertacije Komisija je konstatovala da je disertacija urađena prema odobrenou prijavi, prikazana na jasan i pregledan način i da su svi postavljeni ciljevi u potpunosti realizovani. Na kraju doktorske disertacije prikazani su zaključci izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i dostupnih literaturnih podataka.

Podaci predstavljeni u disertaciji daju originalan naučni doprinos boljem razjašnjenju etiologije komplikacija dugotrajne terapije levodopom, i ukazuju na moguću ulogu polimorfizama odgovarajućih gena u nastanku neželjenih komplikacija antiparkinsone terapije. Studija sličnog tipa do sada nije rađena na teritoriji Srbije. Određivanje uticaja odabranih genetskih polimorfizama kod bolesnika sa Parkinsonovom bolešću bi omogućilo predikciju terapijskog odgovora, kao i pravovremenu modifikaciju antiparkinsone terapije u cilju obezbeđivanja optimalnog odgovora, što ukazuje na moguću aplikativnost studije. Svemu navedenom u prilog ide činjenica da su rezultati ove doktorske disertacije do sada publikovani u okviru tri rada u međunarodnim časopisima: kategorije M21 i kategorije M22 i saopšteni na skupu nacionalnog značaja.

## 9. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu svega izloženog Komisija smatra da je kandidat dr med. Branislava Radojević ispunila sve postavljene ciljeve u svojoj doktorskoj disertaciji i da rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos, što je potvrđeno njihovim objavljivanjem u tri rada u međunarodnim časopisima.

Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji dr med. Branislave Radojević pod nazivom „**Korelacija odabranih genetičkih polimorfizama i komplikacija dugotrajne primene levodope kod osoba koje boluju od Parkinsonove bolesti**“ i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu.

U Beogradu, 10. 05. 2022. godine

Članovi Komisije:

1. \_\_\_\_\_  
Dr Ivan Jančić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. \_\_\_\_\_  
Dr Marina Svetel, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
3. \_\_\_\_\_  
Dr Igor Petrović, docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet