

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marija G. Dušanović Pjević

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

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Marija G. Dušanović Pjević

**ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN
POLYMORPHISMS WITHIN GENES WHICH
REGULATE FIBRINOLYSIS AND
EXTRACELLULAR MATRIX INTEGRITY WITH
THE EFFECTS OF ISCHEMIC STROKE
THERAPY WITH RECOMBINANT TISSUE
PLASMINOGEN ACTIVATOR**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR: prof. dr Biljana Jekić, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMENTOR: prof. dr Ljiljana Beslač Bumbaširević, redovni profesor u penziji, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Suzana Cvjetičanin**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. **Prof. dr Tatjana Damjanović**, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. **Prof. dr Marija Žarkov**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se svojoj mentorki, prof. dr Biljani Jekić, na strpljenju, razumevanju, nesebičnoj pomoći i divnom odnosu, ne samo tokom izrade disertacije, već od početka mog rada na Institutu.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj komentorki, prof. dr Ljiljani Beslač Bumbaširević, na neprocenjivim, dobronamernim i stručnim savetima.

Članovima komisije, prof. dr Suzani Cvjetićanin, prof. dr Tatjani Damnjanović i prof. dr Mariji Žarkov, zahvaljujem se na svim konstruktivnim savetima i sugestijama.

Hvala svim zaposlenima na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i u Jedinici za moždani udar Specijalne bolnice za cerebrovaskularne bolesti „Sveti Sava” u Beogradu, kao i dr Ljubici Vojvodić u podršci tokom izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Tatjani Pekmezović, rukovodiocu projekta u koji sam uključena, a koja me je naučila osnovama naučno-istraživačkog rada i od koje i dalje puno učim.

Hvala mojoj drugarici, dr Jovani Todorović sa Instituta za socijalnu medicinu, za pomoć oko statističke obrade rezultata.

Najveća zahvalnost ide mojoj MAMI i BAKAMA koje su me nesebično podržavale tokom svih godina školovanja!!!

Sve ovo bi bilo neizvodljivo bez Miloševe ljubavi i podrške i Pavlovog osmeha...

Mojim momcima, Mišu i Pavlu...

Ispitivanje povezanosti polimorfizama gena koji regulišu fibrinolizu i integritet vanćelijskog matriksa sa efektima terapije ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena

SAŽETAK

Uvod: Ishemijski moždani udar (IMU) nastaje usled okluzije krvnog suda embolusom, ili trombozom *in situ* u određenim regionima mozga. Centralna zona ishemije, sa terapijskog aspekta, od početka je izgubljena, ali oko nje se nalazi zona penumbre u kojoj su neuroni poremećene funkcije, ali strukturalno intaktni i gde je još uvek moguć oporavak njihove funkcije. Terapija izbora u akutnoj fazi IMU je intravenska primena rekombinovanog tkivnog aktivatora plazminogena (rtPA). Uprkos činjenici da samo mali broj pacijenata sa akutnim IMU primi rtPA, pacijenati u terapijskom prozoru za primenu iste, imaju veće dugoročno preživljavanje i niže stope mortaliteta, kao i bolji funkcionalni oporavak nakon IMU. Sa druge strane, kod određenog broja pacijenata koji su primili rtPA, dolazi do hemoragijske transformacije (HT) ili simptomatske intrakranijalne hemoragije (sICH), najozbiljnijih komplikacija ove terapije povezanih sa visokom stopom morbiditeta i mortaliteta. Razlozi zašto neki pacijenti bolje, a drugi lošije odgovore na rtPA terapiju su brojni, ali i dalje nisu do kraja razjašnjeni. Genski polimorfizmi mogu biti u osnovi različitog nivoa ekspresije gena, ili aktivnosti genskog produkta, pa posredno mogu uticati na fiziologiju i funkcionalnost ćelija, ali i na odgovor na primenjenu terapiju. Cilj ove disertacije bio je da se kod osoba sa IMU lečenim rtPA terapijom utvrdi učestalost genotipova i alela izabranih polimorfizama u genima koji regulišu fibrinolizu (*PAI-1* i *ACE*) i integritet vanćelijskog matriksa (*MMP-2*, *MMP-9* i *TIMP-2*), kao i da se analizira povezanost ispitivanih polimorfničkih genskih varijanti sa efikasnošću i pojavom hemoragijskih komplikacija nakon rtPA terapije.

Metod: Istraživanje je sprovedeno po tipu hibridne panel studije. Studija je sprovedena od avgusta 2016. godine do avgusta 2018. godine u Specijalnoj bolnici za cerebrovaskularne bolesti „Sveti Sava” u Beogradu, dok su molekularno-genetička istraživanja obavljena na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Inicijalna studija preseka je uključila sve pacijente koje su imali IMU lečen rtPA terapijom prvih šesnaest meseci studije i obuhvatila je 94 pacijenta. Finalno, u studiju je uključeno 166 konsektivna pacijenta sa IMU lečenih rtPA terapijom. Funkcionalni oporavak kod svih bolesnika praćen je preko modifikovanog Rankin skora (mRS). mRS je određivan svakom pacijentu po otpustu iz bolnice i tri meseca nakon IMU. Efikasnost rtPA terapije je procenjivana na osnovu povoljnog funkcionalnog oporavka, definisanog mRS skorom 0 ili 1, tri meseca nakon IMU. Svim pacijentima 24h nakon rtPA terapije urađen je kontrolni CT snimak. Prisustvo hemoragijske transformacije na kontrolnom CT snimku definisano je u skladu sa ECASS II kriterijumima. U slučaju naglog pogoršanja neurološkog stanja, kontrolni CT snimak je hitno

urađen. Prisistvo sICH definisano je u skladu sa ECASS III kriterijumima. Genotipizacija odabranih polimorfizama obavljena je koristeći metode reakcije lančane polimerizacije (PCR), reakcije lančane polimerizacije-polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP) i metodom reakcije lančane polimerizacije u realnom vremenu (*real time* PCR). Statistička obrada podataka urađena je SPSS softverom 22.0 (SPSS, Chicago, IL, USA, 2009).

Rezultati: Učestalosti genotipova i alela kod pacijenata sa IMU lečenim rtPA terapijom za sve ispitivane polimorfizme su u saglasnosti sa prijavljenim učestalostima u NCBI bazi. Učestalost C alela *TIMP-2* -418 G/C polimorfizma u našoj populaciji je veoma niska. Dodatno je uočeno da su *MMP-2* -1575 G/A i *MMP-2* -1306 C/T polimorfizmi blisko vezani lokusi. U našoj 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. Sa druge strane, 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, analizirana je i povezanost genotipova izabranih polimorfizama i prethodnog IMU. U našoj studiji 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. 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 trombolitičke terapije statistički značajno češće 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.

Zaključak: Naši rezultati su pokazali da su određeni genotipovi izabranih polimorfizama povezani sa rtPA indukovanim hemoragijskim komplikacijama kod pacijenata sa IMU, ali ne i sa efikasnošću rtPA terapije. Dodatno je uočeno da je učestalost C alela *TIMP-2* -418 G/C polimorfizma izuzetno niska u našoj populaciji i da su *MMP-2* -1575 G/A i *MMP-2* -1306 C/T polimorfizmi blisko vezani lokusi.

Ključne reči: ishemijski moždani udar; rekombinovani tkivni aktivator plazminogena; hemoragijska transformacija; farmakogenetika; genski polimorfizmi; matriks metaloproteinaze, tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza; inhibitor aktivatora plazminogena 1; angiotenzin konvertujući enzim.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK br. _____

Analysis of the association between polymorphisms within genes which regulate fibrinolysis and extracellular matrix integrity with the effects of ischemic stroke therapy with recombinant tissue plasminogen activator

ABSTRACT

Introduction: Ischemic stroke (IS) occurs due to an embolus or thrombosis causing vascular occlusion in situ in certain brain parts. From the therapeutic point of view, the central zone of ischemia is irrelevant, since nerve cells cannot be saved. However, it is surrounded by a penumbra, an area where the neurons are functionally disturbed, but structurally intact, with the possibility for the recovery of their function. The therapy of choice in the acute phase of IS is an intravenous administration of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA). Even though only a small number of patients with acute IS receive rtPA, patients within the therapeutic window for its application have higher long-term survival and lower mortality rates, as well as better functional recovery. On the other hand, a certain number of patients who have received rtPA develop symptomatic intracranial hemorrhage (sICH) or hemorrhagic transformation (HT), as the most severe complications of this therapy - associated with high morbidity and mortality rates. The reasons why some patients respond to rtPA therapy better, and others worse are numerous, but still not fully elucidated. Gene polymorphisms could have different effects on gene expression, or the activity of a gene product, and can indirectly affect the physiology and functionality of cells, and also the response to applied therapy. This study aimed to determine the frequency of genotypes and alleles of selected polymorphisms in genes that regulate fibrinolysis (*PAI-1* and *ACE*) and extracellular matrix integrity (*MMP-2*, *MMP-9*, and *TIMP-2*) in individuals with IS treated with rtPA therapy, as well as to analyze the association of the studied polymorphic gene variants with the rtPA efficacy and occurrence of hemorrhagic complications after rtPA therapy.

Method: This is a hybrid panel study. It was conducted from August 2016 to August 2018 at the Special Hospital for Cerebrovascular Diseases "St. Sava" in Belgrade, while molecular genetic researches were performed at the Institute of Human Genetics of the Medical Faculty of the University of Belgrade. The initial cross-sectional study included all patients who had IS treated with rtPA therapy during the first sixteen months of the study and involved 94 patients. Finally, 166 consecutive patients with IS treated with rtPA therapy were enrolled in the study. Functional recovery in all patients was estimated by a modified Rankin score (mRS). MRS for each patient was determined at hospital discharge and 3 months after IS. The efficacy of rtPA therapy evaluation was based on the favorable functional recovery, defined by mRS score 0 or 1, three months after IS. All patients underwent a control CT scan 24 hours after rtPA therapy. The presence of HT on the control CT scan was defined in accordance with the ECASS II criteria. In case of a sudden worsening of the

neurological condition, a control CT scan was done urgently. The appearance of sICH was defined according to the ECASS III criteria. Genotyping of the selected polymorphisms was performed using the polymerase chain reaction (PCR), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) methods. Statistical analysis was performed using SPSS software 22.0 (SPSS, Chicago, IL, USA, 2009).

Results: The frequencies of genotypes and alleles in patients with IS treated with rtPA therapy for all examined polymorphisms are in accordance with the reported frequencies in the NCBI database. The frequency of C allele of *TIMP-2* -418 G/C polymorphism in our population is very low. Additionally, *MMP-2* -1575 G/A and *MMP-2* -1306 C/T polymorphisms are closely related loci. In our study, no statistically significant association was observed between genotypes and alleles of selected polymorphisms and the efficacy of rtPA therapy in patients with IS. The association of genotypes of certain polymorphisms with intracranial and extracranial hemorrhages after rtPA therapy was observed. Intracranial hemorrhage in patients with IS treated with rtPA was statistically significantly more often in patients with TT genotype of the *MMP-9* -1562 C/T polymorphism, compared with subjects with other genotypes. Patients with TT genotype of the same polymorphism were statistically significantly more likely to have parenchymal hematoma type 2, as a subtype of HT. Parenchymal hematoma type 1, as a subtype of HT, was statistically significantly more frequent in individuals with the GCT haplotype (-1575 G/A -1306 C/T -790 T/G) of the *MMP-2* gene. On the other hand, it was observed that patients with systemic bleeding but also agitation, as complications of the thrombolytic therapy, had 5G/5G genotype of the *PAI-1* 4G/5G polymorphism statistically significantly more often. In addition, it was observed that patients with systemic bleeding after rtPA therapy had statistically significantly more often a D/D genotype of the *ACE* I/D polymorphism compared to patients with other genotypes. Furthermore, the association of prior IS and genotypes of selected polymorphisms were analyzed. We have shown that patients with previous IS had statistically significantly less often the GG genotype of *MMP-2* -1575 G/A, CC genotype of *MMP-2* -1306 C/T, or TT genotype *MMP-2* -790 T/G polymorphisms. This was confirmed by the haplotype's analysis of the mentioned polymorphisms, where it was noticed that patients who had a recurrent IS had statistically significantly less often the GCTC haplotype (-1575 G/A -1306 C/T -790 T/G -735 C/T) of the *MMP-2* gene, which may indicate its protective effect. Finally, patients with HT, sICH, and patients who experienced other intracranial hemorrhages after thrombolytic therapy had statistically significantly more often the TT genotype of *TIMP-2* -303 C/T polymorphism and the TT genotype of *MMP-9* -1562 C/T polymorphism, as well as that all individuals with systemic bleeding, as a rtPA complication, had the GG genotype of the *MMP-2* -1575 G/A polymorphism and the CC genotype of the *TIMP-2* -303 C/T polymorphism at the same time.

Conclusion: Our results showed that certain genotypes of selected polymorphisms were associated with rtPA-induced hemorrhagic complications in patients with IS, but not with the efficacy of rtPA therapy. Additionally, it was observed that the frequency of the C allele of the *TIMP-2* -418 G/C polymorphism is extremely low in our population and that *MMP-2* -1575 G/A and *MMP-2* -1306 C/T polymorphisms are closely related loci.

Keywords: ischemic stroke; recombinant tissue plasminogen activator; hemorrhagic transformation; pharmacogenetics; genetic polymorphisms; matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinases; plasminogen activator inhibitor 1; angiotensin-converting enzyme.

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular Medicine

UDK No. _____

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. MOŽDANI UDAR.....	1
1.1.1. Definicija i klasifikacija moždanog udara	1
1.1.2. Epidemiologija moždanog udara	2
1.2. ISHEMIJSKI MOŽDANI UDAR	2
1.2.1. Definicija ishemijskog moždanog udara	2
1.2.2. Patogeneza ishemijskog moždanog udara	3
1.2.3. Faktori rizika ishemijskog moždanog udara.....	7
1.2.4. Klinička slika i dijagnoza ishemijskog moždanog udara	8
1.2.5. Terapija ishemijskog moždanog udara	8
1.2.5.1. Tkivni aktivator plazminogena	12
1.2.5.2. Rekombinovani tkivni aktivator plazminogena - rtPA	15
1.2.6. Farmakogenetika.....	18
1.3. GENETIČKA OSNOVA ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA.....	19
1.3.1. Geni povezani sa rizikom od IMU i sa efektima rtPA terapije IMU.....	21
1.3.2. Struktura, funkcija i polimorfizmi <i>PAI-1</i> gena	24
1.3.3. Struktura, funkcija i polimorfizmi <i>ACE</i> gena	27
1.3.4. Struktura, funkcija i polimorfizmi gena za matriks metaloproteinaze	29
1.3.4.1. Struktura, funkcija i polimorfizmi <i>MMP-2</i> i <i>MMP-9</i> gena.....	30
1.3.5. Struktura, funkcija i polimorfizmi <i>TIMP-2</i> gena.....	34
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	38
3. MATERIJAL I METODE	39
3.1. DIZAJN STUDIJE	39
3.2. ISPITANICI	39
3.3. METODE	43
3.3.1. Izolacija molekula DNK.....	43

3.3.2. Određivanje genotipova polimorfizama 4G/5G <i>PAI-1</i> (rs1799889), -735 C/T <i>MMP-2</i> (rs2285053) i -1562 C/T <i>MMP-9</i> (rs 3918242) gena.....	44
3.3.2.1. Analiza 4G/5G polimorfizma <i>PAI-1</i> gena (rs1799889).....	50
3.3.2.2. Analiza -735 C/T polimorfizma <i>MMP-2</i> gena (rs2285053).....	51
3.3.2.3. Analiza polimorfizma -1562 C/T <i>MMP-9</i> gena (rs 3918242).....	52
3.3.3. Određivanje genotipova I/D polimorfizma <i>ACE</i> gena (rs4646994).....	53
3.3.4. Određivanje genotipova polimorfizama -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864) <i>MMP-2</i> i -303 C/T (rs2277698) i -418 G/C (rs8179090) <i>TIMP-2</i> gena.....	53
3.3.4.1. Analiza polimorfizma -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864) <i>MMP-2</i> i -418 G/C (rs8179090) i -303 C/T (rs2277698) <i>TIMP-2</i> gena.....	57
3.4. STATISTIČKA ANALIZA	58
4. REZULTATI.....	59
4.1. REZULTATI MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA.....	64
4.1.1. Rezultati ispitivanja <i>PAI-1</i> 4G/5G (rs1799889) polimorfizma	64
4.1.2. Rezultati ispitivanja <i>ACE</i> I/D (rs4646994) polimorfizama	68
4.1.3. Rezultati ispitivanja polimorfizama -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864) i -735 C/T (rs2285053) <i>MMP-2</i> gena.....	72
4.1.3.1. Analiza haplotipova izabranih polimorfizama <i>MMP-2</i> gena (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053).....	79
4.1.4. Rezultati ispitivanja <i>MMP-9</i> -1562 C/T (rs3918242) polimorfizma.....	85
4.1.5. Rezultati ispitivanja polimorfizama <i>TIMP-2</i> -418 G/C (rs8179090) i -303 C/T (rs2277698).....	89
4.1.6. Rezultati analize kombinacije genotipova ispitivanih polimorfizama	92
4.1.6.1. Kombinovani genotipovi polimorfizama <i>MMP-2</i> i <i>TIMP-2</i> gena.....	93
4.1.6.2. Kombinovani genotipovi polimorfizama <i>MMP-9</i> i <i>TIMP-2</i> gena.....	93
4.1.6.3. Kombinovani genotipovi polimorfizama <i>MMP-2</i> i <i>MMP-9</i> gena	94
4.2. REZULTATI INICIJALNE STUDIJE NAKON 16 MESECI ISTRAŽIVANJA.....	94
5. DISKUSIJA.....	98

6. ZAKLJUČCI.....	112
7. LITERATURA.....	113

1. UVOD

1.1. MOŽDANI UDAR

1.1.1. Definicija i klasifikacija moždanog udara

Akutni moždani udar (AMU) se definiše kao fokalni ili globalni poremećaj moždane funkcije koji naglo nastaje, traje duže od 60 minuta, a posledica je poremećaja moždane cirkulacije ili stanja u kome protok krvi nije dovoljan da zadovolji metaboličke potrebe neurona za kiseonikom i glukozom (1).

Moždani udar, u odnosu na način nastanka, deli se na (2):

- ishemijski moždani udar (IMU);
- hemoragijski moždani udar koji se deli na intracerebralnu hemoragiju (ICH) i subarahnoidalnu hemoragiju (SAH).

Ishemijski moždani udar čini 87% svih moždanih udara (MU), 10% je ICH, dok se SAH javlja kod 3% pacijenata sa moždanim udarom (3).

Prema TOAST (engl. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) klasifikaciji, a u odnosu na etiologiju nastanka, IMU se može podeliti na sledeće kategorije (4):

- IMU kao posledica ateroskleroze velikih arterija
- IMU kao posledica kardioembolizacije
- IMU kao posledica okluzije malih arterija- lakuarni IMU
- IMU kao posledica ostalih poznatih uzročnika (disekcija, vaskulitis, poznati genetički poremećaji i drugi)
- IMU nepoznate etiologije

Učestalost etioloških podtipova IMU značajno varira širom sveta. Kardioembolijski tip IMU je najčešći kod evropskih pacijenata, dok su lakunarni IMU češći u azijskoj populaciji. Različita učestalost etioloških podtipova IMU u različitim regionima sveta može se pripisati, kako genetičkim faktorima, tako i stilu života, odnosno postojanju različitih faktora rizika između rasa i naroda druge etničke i kulturološke pripadnosti (5).

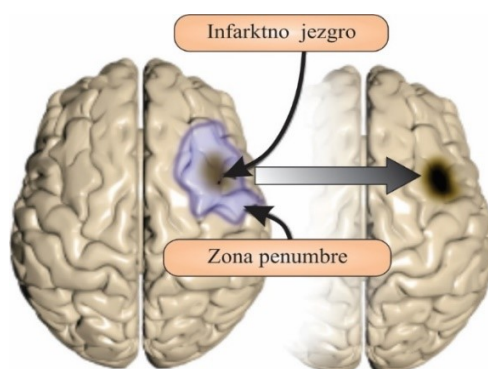
1.1.2. Epidemiologija moždanog udara

Produženi životni vek, kao i brojni faktori rizika, doveli su do povećanja prevalencije moždanog udara, za koji se smatra da je trenutno jedan od vodećih zdravstvenih problema u svetu (6). MU predstavlja drugi najčešći uzrok smrtnosti u svetu, nakon ishemijske bolesti srca (7–9), a očekuje se da će se ovakav trend održati sve do 2030. godine (10). Dodatno, MU je treći vodeći uzrok invaliditeta u svetu (11). Incidencija, kao i stope mortaliteta od MU značajno se razlikuju između država, ali i geografskih regiona; sa smanjenjem incidencije u razvijenim zemljama, i povećanjem incidencije u srednje razvijenim i nerazvijenim zemljama, iako ne statistički značajno (8). Smrtnost od MU je tri do četiri puta veća u nerazvijenim zemljama u poređenju sa razvijenim (6). U Republici Srbiji, MU je i dalje najčešći uzrok smrtnosti kod osoba ženskog pola i drugi najčešći kod osoba muškog pola (12).

1.2. ISHEMIJSKI MOŽDANI UDAR

1.2.1. Definicija ishemijskog moždanog udara

Ishemijski moždani udar (IMU) nastaje usled smanjenog, ili potpunog prekida cirkulacije u određenim regionima mozga zbog okluzije krvnog suda embolusom, ili razvojem tromboze *in situ* (2). Centralna zona ishemije, sa terapijskog aspekta, od početka je izgubljena, ali oko nje se nalazi zona penumbre u kojoj su neuroni poremećene funkcije, ali strukturalno intaktni i gde je još uvek moguć oporavak njihove funkcije (Slika 1). Međutim, ukoliko se rekanalizacija ne uspostavi na vreme, dolazi do ireverzibilnog strukturnog i funkcionalnog oštećenja, odnosno ishemijske nekroze u zoni penumbre, što značajno povećava neurološki deficit tj. stepen invaliditeta (13).



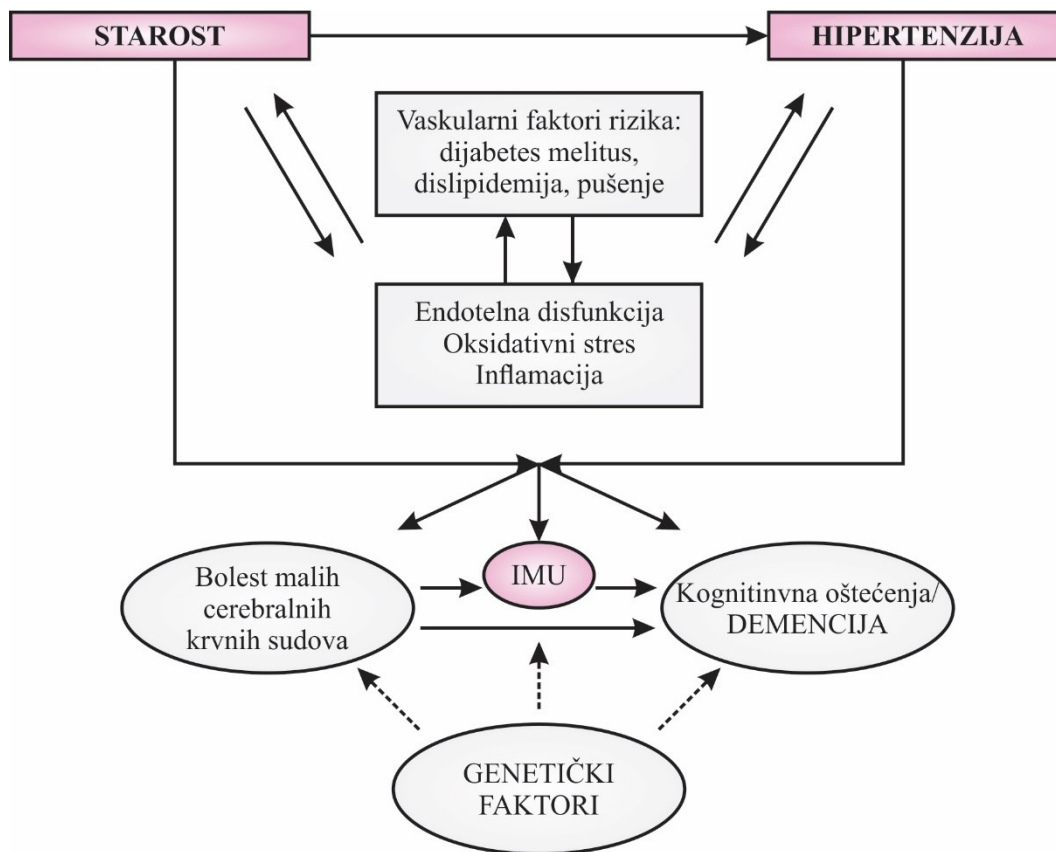
Slika 1. Shematski prikaz infarktnog jezgra i zone penumbre kod IMU (modifikovano). (Slika dostupna na <https://learn.pharmacy.unc.edu/strokecare/node/78>)

Ishemijski moždani udar i tranzitorni ishemijski atak (TIA) su dva klinička entiteta sa veoma sličnim patofiziološkim mehanizmima nastanka (14). TIA podrazumeva postojanje kratkotrajnih epizoda neuroloških ispada nastalih usled moždane ili retinalne ishemije, koji traju manje od jednog časa, najčešće nekoliko minuta i bez postojanja znakova infarkta mozga nakon snimka nuklearne magnetne rezonance (NMR), ili ukoliko nema uslova za NMR, onda kompjuterizovane tomografije (CT) endokranijuma (15). TIA se može smatrati ozbiljnim upozorenjem za predstojeći IMU. Rizik je najveći u prvim satima i danima nakon TIA (17), a oko 5% osoba će imati IMU unutar 48 časova od nastanka prvih simptoma TIA (17).

1.2.2. Patogeneza ishemijskog moždanog udara

Krvno-moždana barijera (KMB) se karakteriše visokospecifičnom strukturom sačinjenom od endotelnih ćelija centralnih kapilara međusobno povezanih interendotelnim okludentnim zonulama, bez formiranja endotelnih fenestri, kontinuirane bazalne lamine endotela i astroglialne bazalne lamine centralnog nervnog sistema (CNS). Na ovaj način KMB održava cerebralnu homeostazu tako što kontroliše para- i transcelularni protok vode, jona i velikih molekula u parenhimu mozga (18). Osnovna uloga krvno-moždane barijere je restrikcija ulaska molekula i ćelija imunog sistema u CNS. Osnovnu ulogu u regulaciji cerebrovaskularne homeostaze obavlja azot-oksidi (NO), produkt endotelnih ćelija. Azot-oksidi kontroliše tonus i rast glatkih mišićnih ćelija u zidu krvnog suda, inhibira agregaciju trombocita kao i adheziju leukocita (19). Permeabilnost KMB sa godinama se povećava, što može biti jedan od značajnijih mehanizama u inicijaciji, ili pogoršanju cerebrovaskularnih bolesti (CVB) (20). Patološka stanja, kao što je IMU, mogu značajno da izmene propustljivost krvno-moždane barijere i interakciju između endotelnih ćelija (21). Kroz oštećenu KMB krv počinje da ulazi u moždani parenhim dovodeći do oštećenja mozga, cerebralnog edema i vazomotorne/hemodinamske disfunkcije (22).

Ishemijski moždani udar je veoma kompleksno oboljenje čijem nastanku doprinose brojni činioci, kao što su starost, faktori rizika, genetički faktori, a u poslednje vreme uočava se sve veća uloga inflamacije u patogenezi i progresiji ateroskleroze, rupture plaka i formiranja tromba dovodeći do IMU. Endotelna disfunkcija, kojoj dodatno doprinose oštećenja izazvana prekomernom proizvodnjom reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. reactive oxygen species- ROS) prisutnih tokom oštećenja moždanog parenhima (Slika 2), doprinosi pogoršanju aterosklerotskih lezija (18).



Slika 2. Različiti mehanizmi uključeni u patofiziologiju ishemijskog moždanog udara (modifikovano) (18)

Tromboza *in situ*, okluzija cerebralnog krvnog suda embolusom ili hipoperfuzija mozga (hemodinamski IMU) dovode do delimične ili potpune redukcije krvnog protoka u delu mozga koji on snabdeva (23). Stepenn redukcije krvnog protoka zavisi, pre svega, od postojanja i funkcionisanja rezidualne perfuzije preko kolateralnog krvotoka (može biti izmenjena kod određenih oboljenja), od zahvaćene arterije, ali i od sistemskog krvnog pritiska. Potpun prekid krvnog protoka dovodi do smrti tog regiona mozga za 4 do 10 minuta, protok manji od 16-18ml krvi/100g moždanog tkiva u minuti dovodi do infarkta mozga unutar jednog časa, dok protok manji od 20ml krvi/100g moždanog tkiva u minuti izaziva cerebralnu ishemiju, ali bez znakova infarkta, osim ako se to stanje nastavi nekoliko sati, ili dana (24). Zona penumbre, ishemijsko, ali reverzibilno disfunkcionalno moždano tkivo, okružuje centralni deo oko okluzije - infarktno jezgro. Ishemijska penumbra će postati deo infarktne jezgre ukoliko se u njoj ne uspostavi krvni protok pravovremeno (25).

Efekti ishemije nastupaju vrlo brzo usled prekida snabdevanja neurona glukozom, nepostojanja depoa glukoze u nervnim ćelijama i onemogućenosti neurona da obavljaju aerobni metabolizam (18,26). Cerebralna ishemija pokreće niz složenih biohemijskih i molekularnih mehanizama koji dovode do ozbiljnog narušavanja nervnih funkcija usled onemogućenog održavanja

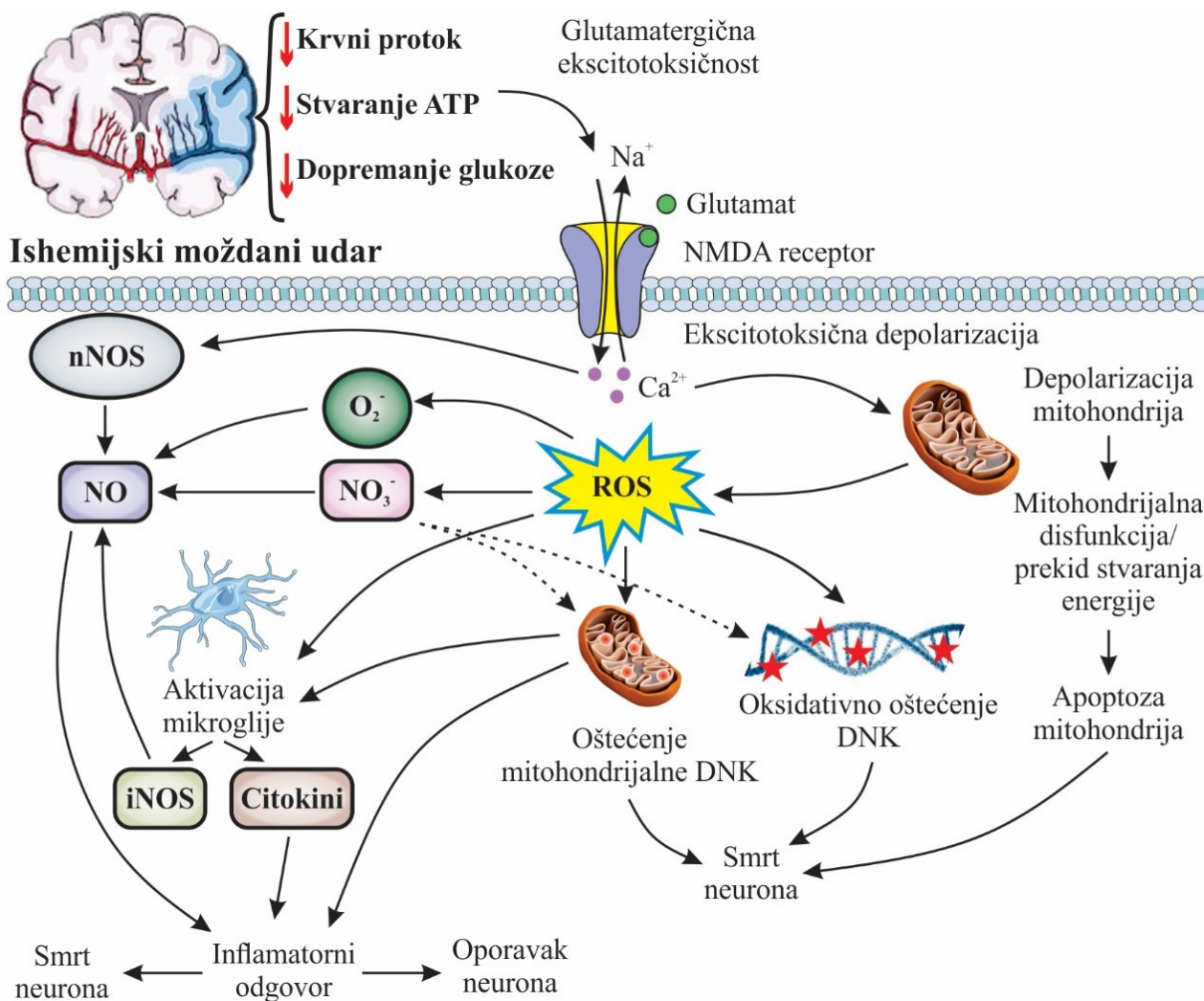
normalnog transmembranskog jonskog gradijenta i homeostaze. Ovo aktivira ekscitotoksičnu glutamatergičnu signalizaciju, jonski disbalans, oksidativni i nitrozativni stres, inflamaciju i apoptozu (23,27,28). Pomenuti patofiziološki procesi dovode do ozbiljnih poremećaja neurona, glije i endotelnih ćelija, međusobno su povezani, aktiviraju jedan drugi preko mehanizama pozitivne povratne sprege, a finalno dovode do destrukcije neurona (27–29).

Na celularnom nivou, ishemija dovodi do zaustavljanja oksidativne fosforilacije i sinteze adenozin-trifosfata (ATP). Celokupan ATP u neuronima potroši se u roku od dva minuta od početka ishemije. To negativno utiče na natrijum-kalijumovu (Na^+/K^+) pumpu, dovodi do depolarizacije ćelijske membrane, otpuštanja jona kalijuma (K^+) u vanćelijski prostor i ulaska jona natrijuma (Na^+) u ćelije (30). Takođe, tokom ishemije, dolazi do oštećenja kalcijumske pumpe i drastičnog porasta jona kalcijuma (Ca^{2+}) unutar neurona. Ovakav infuks Ca^{2+} u neuronima aktivira nekoliko proteina koji pokreću ćelijsku smrt, kao što su Ca^{2+} -zavisne proteaze, lipaze i dezoksiribonukleaze, rezultujući smrću neurona u infarktnom jezgru (31). Jedan od razloga za veliku osetljivost mozga na ishemiju je taj što moždano tkivo sadrži visoke koncentracije glutamata, a mnogi neuroni se aktiviraju preko glutamatskih receptora. Prilikom IMU, glutamat je ključni molekul za neuronsku degeneraciju (32), kada deluje kao neurotoksični ekscitatorni neurotransmiter i ima ključnu ulogu u ishemiji preko ekscitotoksične patogeneze (23). Poznato je da je inicijalni infuks Ca^{2+} okidač intracelularnog toksičnog nakupljanja Ca^{2+} , što je povezano sa smrću neurona. Joni kalcijuma su esencijalni za glutamatsku neurotoksičnost (33). Naime, aktivacija N-metil-D-aspartatskih (NMDA) i α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionskokiselinskih (AMPA) tipa glutamatskih receptora dovodi do depolarizacije membrane neurona, infleksa Ca^{2+} u neurone i posledično do ekscitotoksičnosti (34–36). Pokazano je da su NMDA receptori (NMDAr) odgovorni za oštećenje neurona nakon IMU, a ujedno su i Ca^{2+} -najpermeabilniji jonotropni glutamatski receptori (32). Tokom ekscitotoksičnosti, povećana koncentracija Ca^{2+} unutar mitohondrija dovodi do stvaranja ROS (37), depolarizacije mitohondrija, mitohondrijalne disfunkcije i prekida stvaranja energije (38), apoptoze mitohondrija, a finalno do neuronske smrti (39).

Mehanizmi koji učestvuju u oštećenju mozga tokom ishemije su kompleksni (40), sa NMDAr-posredovanom ekscitotoksičnošću kao ključnim faktorom (40,41).

Do oksidativnog i nitrozativnog stresa dolazi kada stvaranje slobodnih radikala, kao što su ROS i reaktivne azotne vrste (engl. Reactive nitrogen species- RNS), nadjača endogeni antioksidativni sistem. Brojne studije su pokazale da su kod svih tipova IMU količine slobodnih radikala značajno povećane (42), a ROS i RNS molekuli važni faktori oštećenja moždanog tkiva prilikom ishemije (43). Nekoliko različitih mehanizama dovodi do stvaranja slobodnih radikala,

uključujući i NMDA^r-posredovanu ekscitotoksičnost, influks Ca^{2+} , mitohondrijalnu disfunkciju, kao i aktivaciju azot-oksida sintaze (44). Prekomerna količina ROS molekula dovodi do razarajućih efekata na celularne makromolekule i doprinosi aktivaciji dodatnih signalnih puteva, oštećenja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), koji rezultiraju neuronskom smrću. ROS aktivira i ćelije mikroglije koje se transformišu u fagocite i oslobađaju citotoksične, ali i citoprotektivne molekule i u tom slučaju može doći do oporavka neuronske funkcije, ukoliko ostali delovi ćelije nisu u prevelikoj meri oštećeni (45) (Slika 3).



Slika 3. Prikaz signalnih puteva uključenih u patofiziologiju ishemijskog moždanog udara: *ATP* - adozin-trifosfat, *DNK* - dezoksiribonukleinska kiselina, *iNOS* - inducibilna NOS, *NMDA* - N-metil-D-aspartat, *ROS* - reaktivne kiseonične vrste, NO_3^- - nitratni jon, O_2^- - jon kiseonika, *NO* - azot-oxid, *NOS* - NO sintaza, *nNOS* - neuronalna NOS (modifikovano) (46)

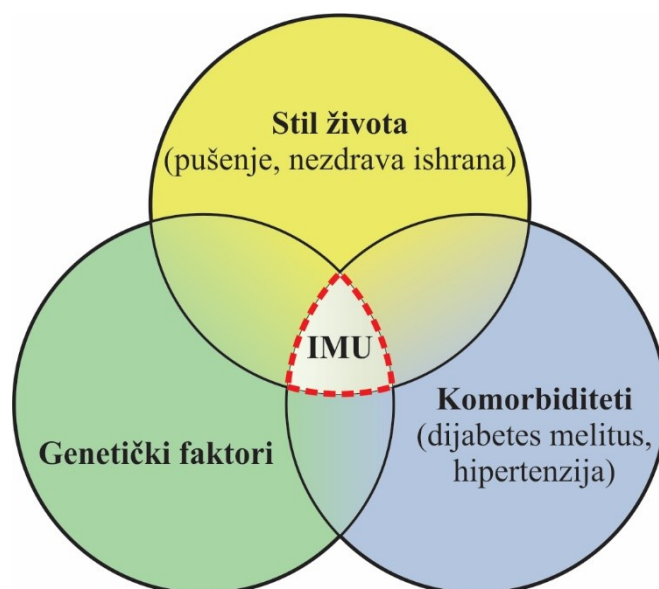
1.2.3. Faktori rizika ishemijskog moždanog udara

Iako su se u poslednjih dvadeset godina incidencija IMU, kao i mortalitet i godine života korigovane u odnosu na nesposobnost tzv. DALY (engl. Disability adjusted life years) usled IMU, smanjile zahvaljujući napretku sistema zdravstvene zaštite, lekovima novijih generacija, novim smernicama u terapiji, uvećanje svetske populacije, produženje životnog veka, kao i brojni faktori rizika doprineli su da globalno opterećenje IMU i dalje raste (47–49).

Faktori rizika za razvoj IMU se mogu podeliti u dve grupe. Prvu grupu čine faktori rizika na koje ne može da se utiče i tu spadaju starost, pol, rasna/etnička pripadnost i genetički faktori. Sa druge strane, faktori rizika kao što su hipertenzija (HTA), dijabetes melitus (DM), atrijalna fibrilacija (AF), dislipidemija, ishemijska bolest srca (IBS), pušenje, ishrana, fizička aktivnost i ostali, mogu se modifikovati (8,48). Iako je patofiziologija IMU dobro poznata i proučena, devet od deset IMU nastaje usled prisustva nekog od faktora rizika koji se može modifikovati (49). Smanjenje ovih faktora rizika značajno smanjuje rizik od nastanka IMU (50). Zato su rana identifikacija i korigovanje faktora rizika imperativ u prevenciji IMU.

Kao što je već navedeno, i genetički faktori imaju ulogu u nastanku IMU. Javljanje IMU kod roditelja ili članova porodice značajno povećava rizik za nastanak IMU (51). Iako se na genetičke faktore rizika ne može uticati, novija istraživanja pokazuju da se epigenetički faktori mogu modifikovati (48).

Faktori koji doprinose nastanku IMU predstavljeni su na Slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz multifaktorskog porekla ishemijskog moždanog udara

1.2.4. Klinička slika i dijagnoza ishemijskog moždanog udara

Neurološki simptomi naglo nastali, jasno lokalizovani, gotovo sigurno ukazuju na IMU ili TIA. Fokalni neurološki deficit nastaje kao posledica disfunkcije dela mozga u kome je cirkulacija kompromitovana. Shodno tome, dolazi do javljanja različitih simptoma i znakova u zavisnosti od lokalizacije zahvaćenog krvnog suda (14). Oštećenje govora, koji pacijenti često opisuju kao nerazumljiv govor, ili nemogućnost pronalaska adekvatnih reči, slabost ekstremiteta ili lica, gubitak vida na jednom oku, pojava duplih slika, poremećaj ravnoteže, kao i različiti senzitivni ispadi su najčešća simptomatologija IMU (52). U zavisnosti od lokalizacije i stepena okluzije arterije, varira i klinička slika IMU.

Kod pacijenata sa gore navedenim simptomima, prvo treba napraviti razliku da li se radi o TIA ili IMU. Za razliku od pacijenata sa IMU, kod pacijenata koji imaju TIA, simptomi se najčešće povlače nakon nekoliko minuta, do jednog sata i ne postoje znaci infarkta na CT ili NMR snimku endokranijuma (15). Iako pomenuti simptomi u preko 95% govore u prilog IMU ili TIA, znatno ređe mogu da se jave i kod drugih oboljenja. Diferencijalno dijagnostički najčešće treba posumnjati na konvulzije, sinkopu, tumore mozga, septičko stanje praćeno visokom febrilnošću i poremećenim stanjem svesti, metaboličke poremećaje (hipoglikemija) i drugo (53).

Dijagnoza akutnog ishemijskog moždanog udara (AIMU) se postavlja urgentno, a na osnovu kliničke slike, neurološkog pregleda i CT ili NMR snimka endokranijuma. Precizno vreme početka prvih simptoma je jedan od ključnih anamnestičkih podataka koji je bitan neurologu za procenu da li je pacijent stigao u terapijskom prozoru za primanje trombolitičke terapije (1,54). Ukoliko je pacijent ispunio kriterijume za primenu trombolitičke terapije, a nakon saglasnosti pacijenta, ili porodice u pratnji, ista mu se ordinira. Nakon dobijene terapije, u daljem toku se preduzima ispitivanje koje podrazumeva laboratorijske analize krvi, elektrokardiogram (EKG), posebno kod mlađih pacijenata, dopler krvnih sudova, po potrebi angiografija, ehokardiografija, a sve u cilju utvrđivanja etiologije moždanog udara (1,53).

1.2.5. Terapija ishemijskog moždanog udara

Ishemijski moždani udar se može prevenirati, ali i lečiti. U prošlosti, najčešće korišćena terapija AIMU bila je davanje antiagregacionih lekova (smanjuju aktivaciju i agregaciju trombocita, kao i nastanak tromba), ali sa skromnim učinkom (55). Formiranje specijalizovanih Jedinica za moždani udar, koje podrazumevaju multidisciplionarni, protokolisani, timski pristup svakom pacijentu i adekvatan i pravovremeni rehabilitacioni tretman, dodatno je poboljšalo oporavak pacijenata sa IMU (56). U poslednje dve decenije, terapija AIMU je doživela velike izmene usled

pojave opcija lečenja baziranih na smanjenju i daljem širenju moždane ishemije (57). Tri osnovna načela u lečenju AIMU su:

1. Postizanje blagovremene rekanalizacije okludirane arterije i reperfuzije ishemijskog tkiva;
2. Uspostavljanje kolateralnog krvotoka;
3. Sprečavanje sekundarnih oštećenja moždanog tkiva (57).

Tretman pacijenata sa AIMU treba započeti odmah po postavljanju dijagnoze IMU na terenu, na osnovu kliničke slike i neurološkog pregleda. Nakon brzog transporta u odgovarajuću ustanovu, kod pacijenata u terapijskom prozoru, a bez kontraindikacija (koje su definisane postojećim vodičima) započinje se sa trombolitičkom terapijom (57). Najnovija istraživanja preporučuje da terapijski prozor, vremenski okvir unutar kog se smatra da primena trombolitičke terapije ima veću korist u odnosu na moguće neželjene efekte, iznosi tri do četiri i po sata (58). Studije su ukazale da je vreme od početka simptoma do primene trombolitičke terapije izuzetno važno i da je kraće vreme od pojave prvih simptoma do primene ove terapije povezano sa boljim ishodom, ali i redom pojavom simptomatske intrakranijalne hemoragije (59).

Trombolitička terapija je savremena terapija lečenja AIMU koja ima za cilj rekanalizaciju okludiranog krvnog suda kako bi se ponovo uspostavila normalna funkcija ćelija penumbre (60). Spašavanje ćelija penumbre je cilj svih revaskularizacionih terapija. Iako je poslednjih 20 godina korišćena kao rutinska terapija AIMU, prve studije o trombolitičkoj terapiji i AIMU publikovane su još 1958. godine (61), a prvo uspešno kliničko ispitivanje deset godina kasnije (62). Veliki broj studija se bavio proučavanjem streptokinaze, kao trombolitičkog leka za lečenje IMU, međutim, usled većeg mortaliteta zbog hemoragijskih cerebralnih komplikacija u poređenju sa placebo grupom, njena primena je zaustavljena (63). Nakon niza kliničkih studija, alteplaza (rekombinovani tkivni aktivator plazminogena- rtPA) je 1996. godine postala prvi licencirani trombolitički lek za lečenje AIMU u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i Evropi (64,65), iako je pre toga, od 1987. godine korišćena za lečenje akutnog infarkta miokarda (AIM), kao i za lečenje masivnih plućnih embolija od 1990. godine (66). Intravenska trombolitička terapija sa rtPA predstavlja zlatni standard u lečenju AIMU, jer deluje tako što direktno razlaže krvni ugrušak. Rana rekanalizacija i reperfuzija su osnov za lečenje AIMU i dovode do smanjenog oštećenja moždanog tkiva kao posledice ishemije, a samim tim i do smanjenja neuroloških oštećenja i nesposobnosti kod pacijenata (67). Rekanalizacija se definiše stepenom ponovnog otvaranja okludirane arterije, dok se reperfuzija meri stepenom protoka koji se dostiže u prethodno hipoperfuzionim regionima mozga (68). Usled akutno nastalog prekida u protoku krvi, oko 32 hiljade neurona umre u svakoj sekundi, odnosno oko 1,8 miliona neurona svakog minuta u zahvaćenom regionu, sve do trenutka kada se protok ponovo ne uspostavi ("vreme je

mozak”) (69). Imajući u vidu da se radi o terapiji sa potencijalno teškim neželjenim efektima, prvenstveno hemoragijskim, kriterijumi za primenu trombolitičke terapije su strogo definisani (1,70) (Tabela 1). Alteplaza se daje intravenski (i.v.), najkasnije do četiri i po sata nakon pojave prvih simptoma IMU, u dozi 0,9mg alteplaze/kg telesne mase, ali sa napomenom da ukupna doza leka ne sme da pređe 90mg. Deset posto leka se daje odmah, kao i.v. bolus injekcija, dok se ostatak leka daje u infuzionom rastvoru u trajanju od 60 minuta (71).

Tabela 1. Inkluzioni i ekskluzioni kriterijumi za primenu intravenske trombolitičke terapije sa rtPA
(1)

Inkluzioni i ekskluzioni kriterijumi za primenu intravenske rtPA

Inkluzioni kriterijumi

1. IMU sa jasnim vremenom početka simptoma
2. Neurološki deficit koji je merljiv po NIHSS (eng. National Institutes of Health Stroke Scale) skali
3. Starost > 18 godina
4. Bez znakova hemoragije na CT endokranijuma
5. Aplikacija intravenske rtPA unutar četiri i po sata od pojave simptoma.

Ekskluzioni kriterijumi

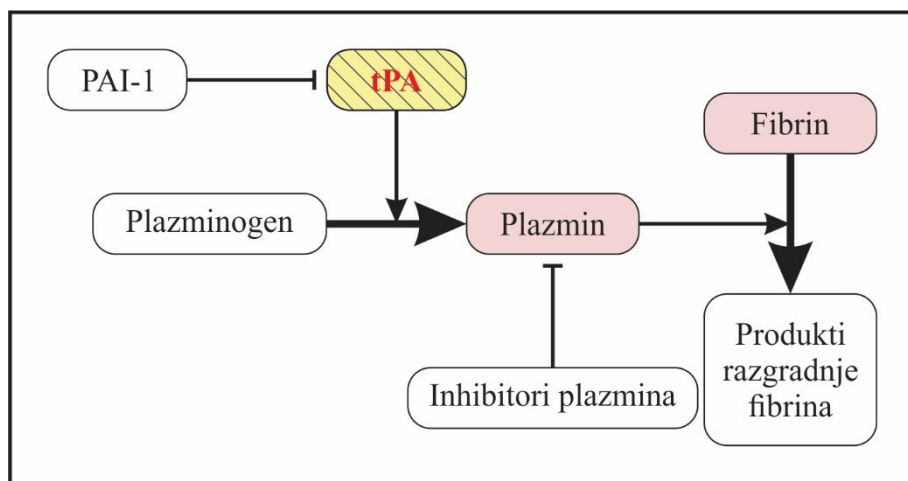
1. IMU sa nejasnim vremenom početka simptoma
2. Neurološki simptomi koji se povlače nakon nekoliko sekundi ili minuta
3. Simptomi koji ukazuju na SAH i pored negativnog nalaza na CT endokranijuma
4. Prethodna krvarenja u endokranijumu
5. Ozbiljna trauma glave ili moždani udar unazad tri meseca
6. Intrakranijalna neoplazma, arteriovenska malformacija ili aneurizma
7. Skorašnja intrakranijalna ili spinalna operacija
8. Povišen krvni pritisak (sistolni > 185 mm Hg ili dijastolni >110 mm Hg)
9. Aktivno unutrašnje (gastrointestinalno ili urogenitalno) krvarenje
10. Arterijska punkcija na nedostupnom mestu za kompresiju prethodnih nedelju dana
11. Broj trombocita < 100 000/mm³
12. Korišćenje heparina unutar 48 sati koji dovodi do produženog aPTT
13. Korišćenje antikoagulantnih lekova sa INR > 1,7 ili protrombinsko vreme > 15s
14. Vrednost glukoze < 2,7 mmol/l ili >22,2 mmol/l
15. Akutni infarkt miokarda u prethodna tri meseca
16. Lumbalna punkcija unazad nedelju dana
17. Ozbiljne hirurške operacije unazad 14 dana

INR- protrombinsko vreme/Internacionalni normalizovani odnos, aPTT- aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme

Samo 1-8% svih pacijenata sa AIMU primi trombolitičku terapiju. Ovo je znatno ispod očekivanih 20% za koje se smatra da bi ispunili inkluzione kriterijume i imali korist od trombolitičke terapije. Kao osnovni razlog za ovako mali procenat pacijenata smatra se kasno prepoznavanje simptoma IMU i odložen dolazak u jedinice moždanog udara (72–74). Za pacijente kod kojih postoji bar jedan ekskluzioni kriterijum za trombolitičku terapiju, lečenje AIMU podrazumeva adekvatnu hemodinamsku terapiju, monitoring, lečenje edema mozga i rano otkrivanje i lečenje sistemskih komplikacija (intrahospitalnih infekcija, srčane aritmije, popuštanja srčanog mišića, venskih tromboembolija) (74). Na isti način se nastavlja sa lečenjem i kod pacijenata koji su primili rtPA. Sa druge strane, mehanička ekstrakcija tromba (trombektomija) predstavlja metod izbora za lečenje AIMU u slučajevima kada, usled kontraindikacija, nije moguće dati rtPA. Za razliku od trombolitičke terapije, terapijski prozor za trombektomiju je šest sati (75).

1.2.5.1. Tkivni aktivator plazminogena

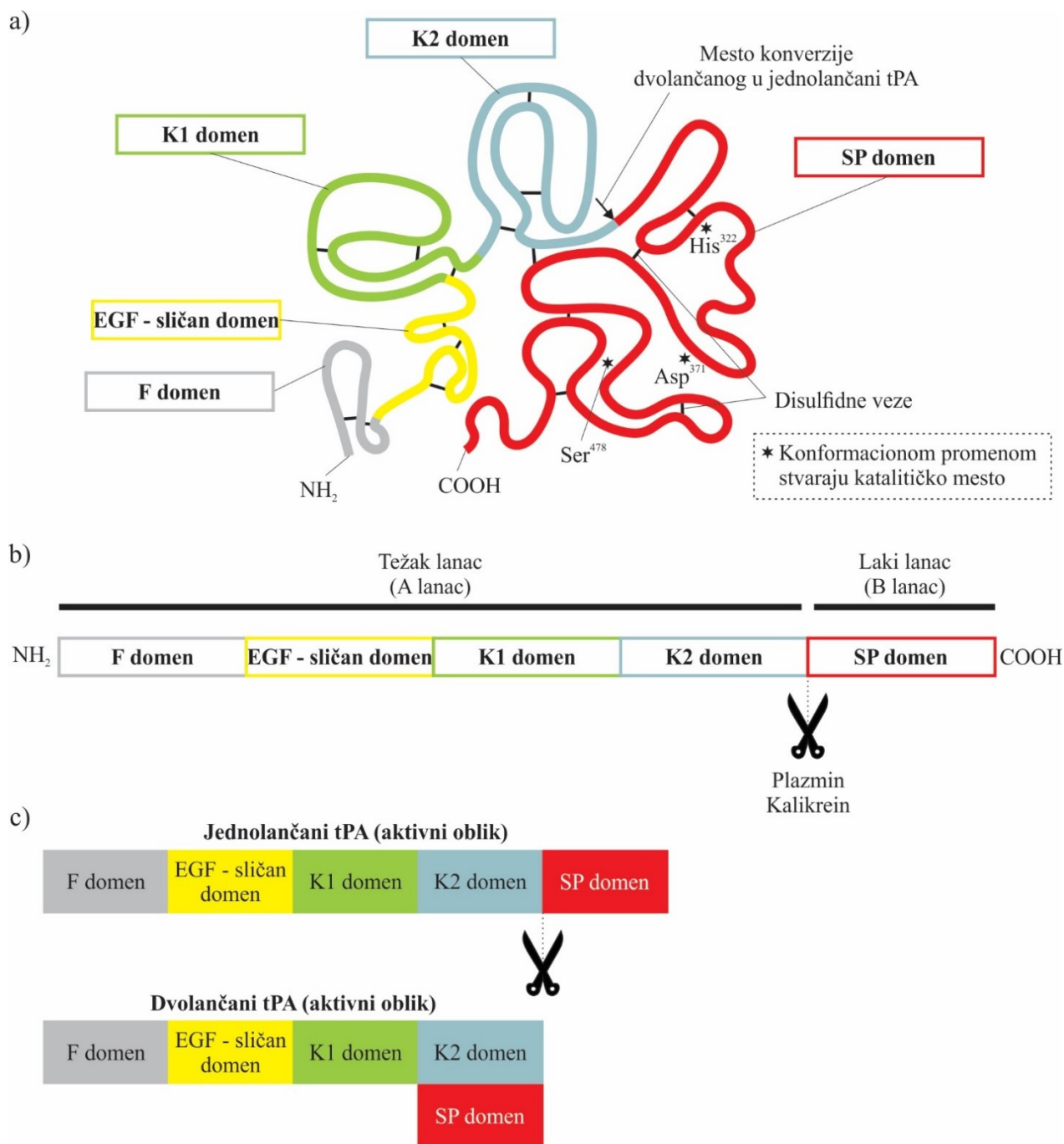
Aktivatori plazminogena, tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinaza (uPA), pripadaju grupi serin proteaza. Oba enzima katalizuju konverziju inaktivnog enzima plazminogena u aktivni enzim - plazmin, koji razgrađuje fibrin u solubilne produkte razgradnje fibrina (Slika 5). Ovaj proces se naziva fibrinoliza (76). TPA i uPA se razlikuju po mestu delovanja, gde uPA uglavnom katalizuje stvaranje plazmina u ekstravaskularnom prostoru, a tPA unutar samog krvnog suda. U serumu su koncentracije tPA veoma niske, ali se povećavaju, kako lokalno, tako i sistemski kao odgovor na potrebu za povećanjem fibrinolitičke aktivnosti (okluzija krvnog suda, epinefrin, nikotinska kiselina i drugo). Lučenje tPA iz endotelnih ćelija krvnih sudova u kojima se sintetiše regulisano je kompleksnim fizičkim i hormonskim faktorima kao što su venski pritisak, vazoaktivne supstance, ali i glavnim enzimom u koagulacionoj kaskadi - trombinom. U fiziološkim uslovima balans između formiranja i razgradnje tromba bazira se na činjenici da stimulansi za formiranje tromba istovremeno stimulišu oslobađanje tPA, supstance koja posledično dovodi do njegove lize (77). Sinteza plazmina od strane tPA predstavlja fiziološki odgovor na rekanalizaciju okludiranog krvnog suda, samim tim olakšava reperfuziju zahvaćenog tkiva. Inhibicija fibrinolitičkog sistema može da se dogodi na nivou aktivatora plazminogena delovanjem specifičnog inhibitora aktivatora plazminogena (PAI), ili na nivou plazmina delovanjem inhibitora plazmina (α 2-antiplazmin) (78).



Slika 5. Prikaz fibrinolitičkog sistema: *PAI-1* - inhibitor aktivatora plazminogena 1, *tPA* - tkivni aktivator plazminogena

Endogeni tPA, veličine 72 kDa, jednonlančani je glikoprotein koji pripada superfamiliji serin proteaza. Kao i ostale serin proteaze, tPA postoji u jednonlančanom i dvolančanom obliku. Pod dejstvom endogenih proteaza (plazmin, kalikrein i druge), tPA se proteolizom arginina na poziciji 275 cepa na dvolančani molekul sačinjen od teškog (A lanac) i lakog lanca (B lanac). Dva lanca tPA molekula su povezana disulfidnom vezom. Za razliku od većine serin proteaza, obe forme tPA su proteolitički aktivne. TPA je sačinjen od pet različitih strukturnih domena, koji su u jednonlančanom tPA povezani sa 17 disulfidnih veza. N-terminalni kraj tPA počinje domenom u obliku prsta, takođe nazvanim i fibronektin domen. Na njega se nastavlja epidermalnom faktoru rasta-sličan (engl. Epidermal growth factor- EGF) domen koji omogućava aktiviranje EGF receptora nakon interakcije sa tPA. Sledeća su dva „kringl” domena (proteinski strukturni domeni koji formiraju veliku proteinsku petlju za protein-protein interakciju) označena kao K1 i K2. Kringl domeni se uglavnom nalaze u proteinima uključenim u koagulacionu kaskadu i fibrinolizu. Unutar kringl domena nalaze se aktivna mesta sa visokim afinitetom za lizinske ostatke. Fibronektin domen i K2 domen primarno su odgovorni za vezivanje tPA za fibrin, dok se tPA preko fibronektin domena može vezati i za određene membranske receptore. Sva četiri navedena domena nalaze se na teškom lancu. Laki lanac tPA se sastoji od jednog velikog domena unutar koga se nalazi aktivno katalitičko mesto sa serin proteaznom aktivnošću (Slika 6). Katalitičko mesto se sastoji od asparaginske kiseline³⁷¹, histidina³²² i serina⁴⁷⁸, međusobno razdvojenih u primarnoj strukturi tPA, ali prilikom aktivacije i konformacione promene tPA, ove aminokiseline dolaze u blizak kontakt i raskidaju Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² vezu unutar plazminogena, pretvarajući ga u plazmin. Fibrinoliza je signal za konformacionu promenu tPA iz jednonlančanog u dvolančani molekul. Iako imaju sličnu aktivnost, uPA i tPA se značajno strukturno razlikuju. Enzimska aktivnost tPA značajno je povećana u prisustvu fibrina u poređenju sa uPA. Fibrin dovodi do povećanja enzimske aktivnosti tPA promenom konformacijskog oblika nakon što

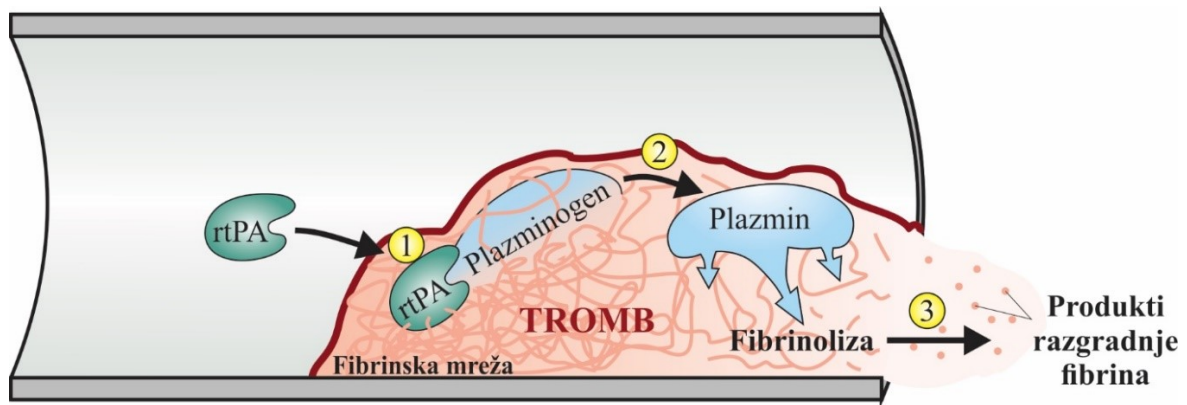
se tPA veže za fibrin, što dodatno povećava interakciju tPA i plazminogena na površini fibrina. I tPA i plazminogen se vezuju direktno za fibrin preko kringl domena, dok se tPA vezuje i preko fibronektin domena (79–82).



Slika 6. Shematski prikaz a) primarne strukture tPA sa označenim domenima; b) jednolančanog tPA i mesta konverzije u dvolančani tPA; c) prikaz jednolančane i dvolančane forme tPA: *tPA* - tkivni aktivator plazminogena, *F*- fibronektin (domen u obliku prsta), *EGF* - epidermalni faktor rasta, *K1* - kringl 1, *K2* - kringl 2, *SP*- serin proteaza (modifikovano) (80)

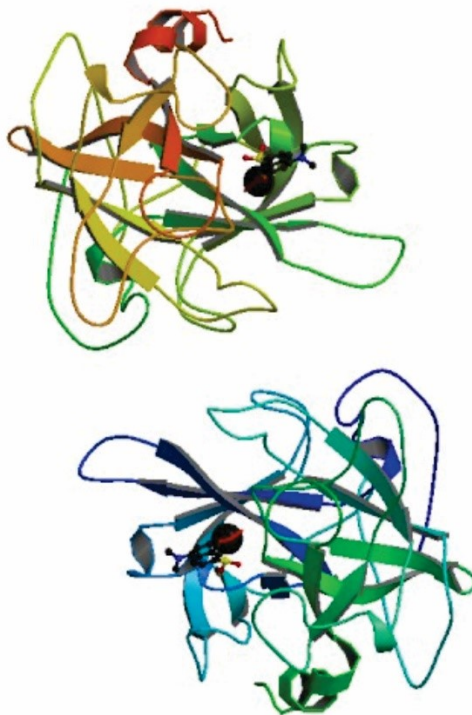
1.2.5.2. *Rekombinovani tkivni aktivator plazminogena - rtPA*

Alteplaza predstavlja prvi rekombinovani tkivni aktivator plazminogena (rtPA) i zajedno sa ostalim rtPA spada u grupu serin proteaza. Alteplaza je nastala rekombinovanom DNK tehnikom koristeći komplementarnu DNK iz tPA izolovanog iz humanih melanocita. Izgrađena je od 527 aminokiselina. Glikozilacija pojedinih ostataka asparagina obezbeđuje njenu hidrosolubilnost (66). N-terminalni teški lanac i C-terminalni laki lanac sa aktivnim katalitičkim mestom povezani su disulfidnim mostom izgrađenim od cisteinskih ostataka. RtPA ima identičnu strukturu i mehanizam dejstva kao tPA i sastoji se od istih pet domena, gde fibronektin i kringl domeni obezbeđuju visok afinitet vezivanja sa plazminogenom (Slika 6). Katalitička aktivnost alteplaze se ogleda u raskidanju peptidne veze između aminokiselina arginin i valin na pozicijama 561 i 562 unutar plazminogena, čime se on konvertuje u plazmin. Nakon što nastane, plazmin, aktivni proteolitički enzim, dalje razlaže tromb na produkte razgradnje fibrina, dovodeći do dezintegracije krvnog ugruška i ponovnog uspostavljanja cirkulacije u krvnom sudu (Slika 7). Fibrinski monomeri, međusobno povezani u mrežu preko bočnih lanaca lizina, predstavljaju osnovu građe tromba (66). Poput plazminogena, i alteplaza ima visok afinitet za vezivanje za bočne ostatke lizina unutar tromba. Na ovaj način formiraju se tercijski kompleksi sačinjeni od alteplaze, plazminogena i fibrina. Specifičnost alteplaze za vezivanje za plazminogen osigurava da se njegovo prevođenje u plazmin odvija pretežno u trombovima sa najmanjom koncentracijom cirkulišućeg plazmina. Prednost alteplaze u odnosu na starije generacije trombolitičkih lekova je njena visoka specifičnost za fibrin koja je, u preko 80% slučajeva, posredovana fibronektin domenom (63). Alteplaza se preko EGF-sličnog, fibronektin i K1 domena vezuje za glikoproteinske receptore na hepatocitima. Trodimenzionalni prikaz alteplaze predstavljen je na slici 8. Iako se alteplaza veoma brzo metaboliše u jetri, njena farmakodinamska dejstva su produžena. Iz tog razloga aplikacija drugih antikoagulantnih lekova se ne preporučuje najmanje 24 časa nakon rtPA terapije usled povećanog rizika od hemorgijskih komplikacija (67). Više od 80% alteplaze se eliminiše urinom, 18h nakon aplikacije (66).



- ① Vezivanje rtPA za plazminogen unutar tromba
- ② Konverzija plazminogena u plazmin i aktivacija fibrinolize
- ③ Razgradnja fibrina na produkte razgradnje fibrina

Slika 7. Mehanizam delovanja rtPA unutar tromba: *rtPA* - rekombinovani tkivni aktivator plazminogena



Slika 8. Trodimenzionalni prikaz alteplaze (Slika dostupna na https://s3-us-west-2.amazonaws.com/drugbank/protein_structures/full/DB00009.png?1266600394)

Terapija rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena je povezana sa značajnim smanjenjem invaliditeta i mortaliteta, ali se kod 40% pacijenata rekanalizacija uopšte ne dogodi, ili se događa kasno (83). Takođe, zbog destruktivnog dejstva rtPA na bazalnu membranu i vanćelijski

matriks, može doći do popuštanja KMB i najozbiljnije komplikacije trombolitičke terapije-hemoragijske transformacije (HT) (84).

Hemoragijska transformacija je definisana kao bilo koje krvarenje u regionu ishemije nakon IMU, koje može da varira od mikroskopski vidljivih krvarenja do velikih hemoragija (85), a koja se u 3% slučajeva završava smrtnim ishodom (67). Posttrombolitička HT nastaje kao posledica više kompleksih patofizioloških mehanizama među kojima su ishemijska lezija, narušavanje KMB, koagulopatija i reperfuzione povrede (86). Hemoragijska transformacija može da se javi neposredno nakon IMU, ali i nekoliko dana kasnije i ne mora uvek da bude praćena neurološkim pogoršanjem. Takođe, može da se javi i kod pacijenata koji nisu lečeni trombolitičkom terapijom, iako je njena učestalost kod pacijenata lečenih sa rtPA značajno veća (87).

U skladu sa ECASS II kriterijumima, a na osnovu radiografskih nalaza, hemoragijska transformacija se deli na (88):

1. Hemoragijski infarkt tip 1 (HI-1) - petehijalna krvarenja;
2. Hemoragijski infarkt tip 2 (HI-2) - konfluentna petehijalna krvarenja;
3. Parenhimski hematoma tip 1 (PH-1) - parenhimski hematoma koji obuhvata <30% ishemije sa malim efektom mase;
4. Parenhimski hematoma tip 2 (PH-2) - parenhimski hematoma koji obuhvata >30% ishemije sa širenjem u područje van ishemije sa značajnim efektom mase.

Simptomatska intrakranijalna hemoragija (sICH) je najteža komplikacija trombolitičke terapije, a koja se javlja sa učestalošću između 2% i 7% u različitim populacijama. U skladu sa ECASS III (engl. European Cooperative Acute Stroke Study) kriterijumima, sICH je definisana kao bilo koji tip intrakranijalne hemoragije koji dovodi do neurološkog pogoršanja u vidu povećanja NIHSS skora za četiri ili više poena unutar sedam dana od primene trombolitičke terapije, ili dovodi do smrtnog ishoda pacijenta, kao direktnim uzrokom (89). Sve HT koje ne ispunjavaju kriterijume za sICH po ECASS III kriterijumima su označene kao nesimptomatske HT.

Neželjena dejstva trombolitičke terapije u vidu ekstrakranijalnih krvarenja se, takođe, javljaju, ali sa uglavnom blagom kliničkom slikom u vidu petehija na površini kože, epistaksom ili krvarenjem u gingivama. Ne tako često, može doći i do ozbiljnijih ekstrakranijalnih krvarenja, poput onih u gastrointestinalnom traktu koja se javljaju sa učestalošću od približno 1% (90). Kod određenog broja pacijenata dolazi do javljanja alergijske reakcije na rtPA. Najčešće su u vidu lokalizovane ili generalizovane urtikarije, a znatno ređe se javlja angioedem ili anafilaktički šok, koji predstavljaju životno-ugrožavajuća stanja (91).

Epileptički napad je još jedan neželjeni efekat rtPA terapije. Iako epileptički napadi nisu česti nakon AIMU, učestalost njihovih javljanja nakon AIMU lečenog trombolitičkom terapijom je nešto veća i povezana je sa lošijih oporavkom pacijenata (92).

Efikasnost trombolitičke terapije se gleda u odnosu na brzinu aktivacije plazminogena od strane rtPA unutar tromba; sposobnosti prodiranja plazminogena u krvni ugrušak; odnosa rtPA i njegovih inhibitora, kao i brzine eliminacije rtPA. Pored navedenih mehanizama, za efikasnost rtPA terapije bitno je i vreme za koje se postiže rekanalizacija, ali i sam obim rekanalizacije, posebno kod IMU. Sa druge strane, efikasnost rtPA terapije je smanjena usled pojave neželjenih efekata, kao što su HT, reokluzija krvnog suda, neurološka ekscitotoksičnost ili oštećenja KMB koja vode dodatnom oštećenju moždanog parenhima (93).

U cilju poboljšanja sigurnosti i ishoda terapije rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena, sve je veće interesovanje za pronalazak novih biomarkera, kao potencijalnih prediktora hemoragijske transformacije i drugih neželjenih ishoda ove terapije. Identifikacija faktora koji predviđaju efikasnost rtPA bila bi značajna za tretman pacijenata sa IMU, posebno onih za koje se ispostavi da nemaju odgovarajući odgovor na rtPA, jer kod ovih pacijenata, primena rtPA sa dodatnim koadjuvantim lekovima mogla bi biti efikasnija nego lečenje samo sa rtPA.

1.2.6. Farmakogenetika

Farmakogenetika predstavlja modernu disciplinu koja objedinjuje oblasti farmakologije i genetike, a fokusira se na otkrivanje individualnih genskih varijanti koje utiču na efikasnost ili toksičnost lekova (94,95). Farmakogenetika se može podeliti na dve oblasti. Prva oblast se bavi proučavanjem genskih polimorfizama koji dovode do razlika u farmakokinetici (apsorpcija, distribucija, metabolizam ili eliminacija) leka. Druga oblast je fokusirana na polimorfizme koji utiču na farmakodinamska svojstva (izmena ciljnog mesta delovanja ili ometanje bioloških puteva) lekova, nezavisno od koncentracije samog leka (95).

Nakon što su objavljeni prvi radovi o farmakogenetici, počelo je sve veće interesovanje za ovu disciplinu što je dodatno podstaknuto značajnim napretkom tehnika genotipizacije i povećanog interesovanja za razvoj ciljanih farmaceutskih lekova. Ne zadugo, Američka agencija za hranu i lekove (engl. The Food and Drug Administration- FDA) unela je promene u sažetku o svakom leku, gde su dodate potencijalne farmakogenetske varijacije koje bi mogle da objasne različit odgovor na lek između osoba (96).

Primarni cilj farmakogenetike je detekcija onih pacijenata za koje je veća verovatnoća da će imati koristi od određene intervencije korišćenjem njihovih genetičkih informacija za odabir odgovarajućeg tretmana lečenja. Imajući takav cilj, bolje razumevanje genetičkih determinanti koje utiču na individualne strategije lečenja i odgovor na terapiju kod IMU u velikoj meri će pomoći da se poboljša bezbednost i efikasnost, ali i smanje troškovi lečenja (97). Farmakogenetika omogućava lečenje pacijenata sa IMU obezbeđivanjem pravog leka i prave doze. Postoje primeri bolesti kod kojih se lečenje pacijenata odgovarajućim lekom ili odgovarajućom dozom bazira na njihovom genotipu, što umnogome pomaže poboljšanju prednosti lečenja i smanjenju neželjenih reakcija (98).

1.3. GENETIČKA OSNOVA ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA

Brojne studije su pokazale da genetički faktori imaju značajnog udela u nastanku IMU. Taj uticaj je još veći kada su, pored genetičkih faktora, prisutni i poznati faktori rizika za IMU, kao što su hipertenzija, pušenje, dijabetes melitus, gojaznost i drugi (99,100). Kao još jednu potvrdu genetičke pozadine u nastanku IMU dale su blizanačke studije i studije sprovedena unutar članova porodica (101). Blizanačke studije su pokazale da je prevalencija IMU kod jednojajčanih blizanaca pet puta veća u odnosu na prevalenciju IMU kod dvojajčanih blizanaca (102). U cilju poboljšanja strategija prevencije i lečenja IMU, ali i smanjenja javnozdravstvenog opterećenja IMU, otkrivanje genetičkih determinanti je veoma značajno.

Genska ispitivanja kod osoba sa IMU se sprovode sa različitim ciljevima. Neki od njih su pronalazak monogenih varijanti koje dovode do IMU ili genskih varijanti koje dovode do IMU-sličnih sindroma. Jedan broj studija baziran je na ispitivanju genskih varijanti poznatih faktora rizika za IMU (AF, HTA, DM i drugi). Praćenje javljanja IMU unutar porodice i posmatranje epigenetičkih uticaja na ekspresiju gena tokom AIMU su tema istraživanja drugih studija. Ispitivanja povezanosti genskih varijanti sa oporavkom nakon IMU i farmakogenetika su sve više u žiži interesovanja kao budućnost personalizovane terapije (103).

Metode molekularne genetike ključne za ova ispitivanja su, pre svega, studije ispitivanja gena kandidata i studije asocijacije kompletnog genoma (engl. Genome Wide Association Studies-GWAS), studije analize ribonukleinskih kiselina (RNK) i proteina, kao i savremene analitičke kompjuterske metode za ispitivanje statističko značajne povezanosti. U novije vreme, napretkom tehnologije, došlo je i do unapređenja molekularnih tehnika, a samim tim i dodatnih saznanja o genetici IMU. U moderne tehnike spadaju analize kompletnog genoma, metode sekvenciranja nove

generacije (engl. Next-generation sequencing- NGS), metode sekvenciranja celog genoma (engl. Whole genome sequencing- WGS) i druge (103). GWA studijama identifikovan je određeni broj genetičkih faktora povezanih sa rizikom od nastanka IMU (3,104). Nešto manje od 1% svih IMU nastaje kao posledica monogenih oboljenja (retka mutacija jednog gena dovoljna je da izazove IMU) i u većini slučajeva se javlja u odsustvu poznatih faktora rizika za IMU (104,105). Ovaj procenat je nešto veći kod mlađih pacijenata sa IMU (106). Najčešća monogenska oboljenja kod kojih je IMU, pored drugih simptoma, jedan od osnovnih kliničkih manifestacija bolesti, predstavljena su u tabeli 2 (107):

Tabela 2. Monogenska oboljenja kod kojih je IMU jedan od osnovnih znakova bolesti (107)

Oboljenje	Gen	Način nasleđivanja
<i>Monogenska oboljenja koja dovode do lakunarnog IMU</i>		
- Cerebralna autozomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CADASIL)	<i>NOTCH3</i>	Autozomno-dominantno
- Cerebralna autozomno recesivna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom (CARASIL)	<i>HTRA1</i>	Autozomno-recesivno
- Retinalna vaskulopatija sa cerebralnom leukodistrofijom (RVCL)	<i>TREX1</i>	Autozomno-dominantno
<i>Monogenska oboljenja koja dovode do IMU kao posledice ateroskleroze malih ili velikih arterijskih krvnih sudova</i>		
- Srpasta anemija	<i>HBB</i>	Autozomno-recesivno
- Homocistinurija	<i>CBS*</i>	Autozomno-recesivno*
- Fabrijeva bolest	<i>GLA</i>	X-vezano
- Pseudoksantoma elastikum (PXE)	<i>ABCC6</i>	Autozomno-recesivno
<i>Monogenska oboljenja koja dovode do IMU nejasne etiologije</i>		
- Elers-Danlos sindrom	<i>COL3A1</i>	Autozomno-dominantno
- Marfanov sindrom	<i>FBNI*</i>	Autozomno-dominantno

*najčešći oblik

S obzirom da je IMU u većini slučajeva multifaktorsko oboljenje i ne sledi Mendelov obrazac nasleđivanja, interakcije gen-gen ili gen-okolina su odgovorne za razvoj bolesti. Određeni genski lokusi u interakciji sa drugim genskim lokusima mogu doprineti razvoju kompleksnih bolesti, između ostalih i IMU, međutim, efekti svakog lokusa su nedovoljni da bi mogli da budu pojedinačno opservirani (108,109). U većini slučajeva genetički faktori u interakciji sa faktorima sredine doprinose riziku od nastanka IMU, kao deo multifaktorskog nasleđivanja (Slika 4) (104). Epigenetički faktori mogu uticati na gensku ekspresiju preko metilacije DNK ili izmene histona (proteina koji učestvuju u pakovanju DNK). Promene u molekulu DNK mogu obuhvatiti ceo ili veći deo hromozoma (citogenetičke promene). Ovakve promene su mikroskopski vidljive i u velikom broju slučajeva inkompatibilne sa životom. Izmena DNK srednje veličine vidljiva je na submikroskopskom nivou. Najmanje molekularne promene podrazumevaju varijaciju u samo jednom nukleotidu (103).

Normalna varijabilnost u nukleotidnoj sekvenci gena koja se javlja u populaciji sa učestalošću većom od 1% predstavlja genski polimorfizam, sa druge strane sve varijabilnosti sa učestalošću manjom od 1% predstavljaju genske mutacije (110). Genski polimorfizmi mogu biti u osnovi različitog nivoa ekspresije gena, ili aktivnosti genskog produkta, pa posredno mogu uticati na fiziologiju i funkcionalnost ćelija, a u perspektivi i na sklonost ka određenom oboljenju, odgovoru na primenjenu terapiju, patogenezu i ishod same bolesti (110). Do danas je identifikovan veliki broj gena čiji su produkti uključeni u procese angiogeneze, koagulacije/fibrinolize i inflamacije (111,112). U ovim genima javljaju se varijacije u vidu polimorfizama pojedinačnih nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism- SNP), inserciono-delecionih varijanti (INDELs), ili polimorfizama nukleotidnih ponovaka. Do današnjeg dana, veliki broj studija o uticaju genetičkih faktora na IMU bavio se istraživanjem SNP (113).

1.3.1. Geni povezani sa rizikom od IMU i sa efektima rtPA terapije IMU

U studijama udruženosti gena kandidata otkriveno je nekoliko gena sa potencijalnom ulogom u nastanku IMU. Uočeno je da genski činioci imaju veći značaj kod IMU pacijenata mlađih od 70 godina, nego kod onih starijih. Genetički faktori imaju više značaja i kod IMU nastalog kao posledica ateroskleroze velikih i malih krvnih sudova u odnosu na IMU nejasne etiologije (114,115). Studije udruženosti gena kandidata bile su, pre svega, fokusirane na ispitivanje SNP varijanti gena kod kojih je prethodno uočena povezanost sa kardiovaskularnim oboljenjima (116,117). Za nekoliko SNP varijanti je potvrđeno da su povezane sa nastankom IMU velikih krvnih sudova i kardioembolijskim IMU (Tabela 3) (103). Takođe, veliki broj SNP varijanti različitih gena uključenih u procese

inflamacije, ateroskleroze, renin-angiotenzin sistem, hemoglobinopatije, metabolizam lipida, između ostalog, bile su povezane i sa IMU (118).

Tabela 3. Primeri SNP varijanti povezanih sa rizikom za nastanak IMU (103)

Region SNP	Gen (SNP)
4q25	<i>PITX2</i> (rs1906591)
7p21	<i>HDAC9</i> (rs11984041)
9p21	<i>CDKN2A/B</i> (rs4977574)
12p13.33	<i>NINJ</i> (rs11833579)
12q24.12	<i>NAA25/C12orf30</i> (rs17696736)

GWA studije omogućavaju identifikaciju genskih lokusa povezanih sa oboljenjem od interesa, bez postojanja prethodne hipoteze o postojanju određenog molekularnog puta. Uprkos ovoj prednosti, samo mali broj GWAS sproveden je kod pacijenata sa IMU (105), dok se nijedna GWA studija nije bavila ispitivanjem povezanosti genskih varijanti i funkcionalnog oporavka nakon IMU (119).

Klinički ishod nakon IMU je veoma različit, a razlog za ove varijacije često se ne mogu objasniti. Oporavak nakon IMU zavisi od mnogo faktora (120), kao što su starost pacijenta, vreme započinjanja terapije, lokalizacija zahvaćenog dela mozga, kao i težina IMU (121). Do funkcionalnog oporavka nakon IMU može se doći brzo, a može da traje mesecima i godinama. Takođe, stepen oporavka može značajno da varira od potpunog oporavka do trajne i teške onesposobljenosti ili smrtnog ishoda. Procena ishoda je, prema tome, veoma teška i nepouzdana i zavisi od više faktora, sa nejasnim ili ograničenim uticajem. Genetički faktori su jedan od tih faktora, a uticaj njihove varijabilnosti na mogućnost i stepen funkcionalnog oporavka nakon IMU sve je više u žiži interesovanja.

Farmakogenetika IMU se bazira na ispitivanju polimorfizama različitih gena kako bi se utvrdio njihov uticaj na različit odgovor na terapiju kod pacijenata. Najveći broj studija bio je usmeren na analizu odgovora pacijenata sa IMU na terapiju aspirinom, klopidogrelom i varfarinom (98,122). Aspirin je najčešće korišćen antiagregacioni lek za prevenciju prvog, ali i rekurentnog IMU. Međutim, kod određenog broja pacijenata dolazi do aspirinske rezistencije, koja može biti posledica postojanja alternativnih metaboličkih puteva na koje ne deluje aspirin, ili genetičkih faktora. Do danas, nekoliko gena je povezano sa aspirinskom rezistencijom. U nekim slučajevima, klopidogrel se koristi zajedno sa aspirinom kao dvojna antiagregaciona terapija za prevenciju rekurentnog IMU.

Međutim, i ovde su opisane genske varijante kod kojih dolazi do lošijeg odgovora na terapiju klopidogetrom, kao i povećanog rizika od ponovnog IMU kod određenih osoba. Varfarin je lek izbora za prevenciju IMU kod osoba sa atrijalnom fibrilacijom. Kako bi se osigurala optimalna efikasnost varfarina, a smanjio rizik od krvarenja, potrebno je redovno kontrolisanje INR vrednosti. Međutim, studije su pokazale da su genske varijante, u vidu polimorfizama i mutacija različitih gena, u 30% - 35% slučajeva razlog lošijeg odgovora na terapiju kod određenih pacijenata (98,122). Takođe je aducin Trp460 varijanta G460W polimorfizma (rs4961) *ADDI* gena povezana sa smanjenim mortalitetom nakon IMU ili AIM kod pacijenata lečenih diureticima (123). Dok je druga studija ukazala da su osobe, nosioci alela 4 izrazito polimorfno regiona 25. introna *COL3A1* gena, ne samo povezane sa smanjenom učestalošću IMU, već i sa ređim javljanjem HT kod pacijenata lečenih glikoprotein 2B/3A inhibitorima (124).

Određeni genski polimorfizmi povezani su sa različitim stepenom oporavka pacijenata sa IMU.

Metilen-tetrahidrofolat reduktaza (*MTHFR*) kodirana je *MTHFR* genom i određeni polimorfizmi ovog gena su već povezani sa rizikom od IMU. Sa druge strane, rs868014 SNP varijanta ovog gena povezana je sa lošijim oporavkom kod pacijenata nakon IMU (125).

Neurotrofni moždani faktor (engl. Brain derived neurotrophic factor- BDNF) uključen je u cerebralnu regeneraciju i neuroplastičnost, a SNP varijanta (Val66Met) unutar *BDNF* gena je povezana sa boljim oporavkom nakon IMU (126). Sa druge strane, SNP unutar *APOE ε4* gena povezan je sa lošijim oporavkom pacijenata nakon IMU (127).

U velikoj internacionalnoj studiji uočena je statistički značajna povezanost između SNP (rs1842681) *LOC105372028* gena i funkcionalnog oporavka tri meseca nakon IMU, kao i moguća povezanost sa nekoliko SNP varijanti koju treba dodatno potvrditi (119).

Iako je opisana ogromna interindividualna varijabilnost u odgovoru na rtPA terapiju kod pacijenata sa IMU (62), veoma mali broj studija se bavio farmakogenetikom rtPA. Nekoliko studija udruženosti gena kandidata korišćene su za ispitivanje moguće povezanosti različitih polimorfizama i odgovora na rtPA terapiju.

Posebnu pažnju u novije vreme privlači ispitivanje polimorfizama gena koji regulišu fibrinolizu i integritet vanćelijskog matriksa, imajući u vidu da su produkti tih gena dovedeni u vezu sa rizikom za IMU, ali i različitim stepenom oporavka nakon IMU. Identifikacija genskih varijanti povezanih sa rekanalizacijom, a samim tim i efikasnošću rtPA terapije je od izuzetne značajnosti.

1.3.2. Struktura, funkcija i polimorfizmi PAI-1 gena

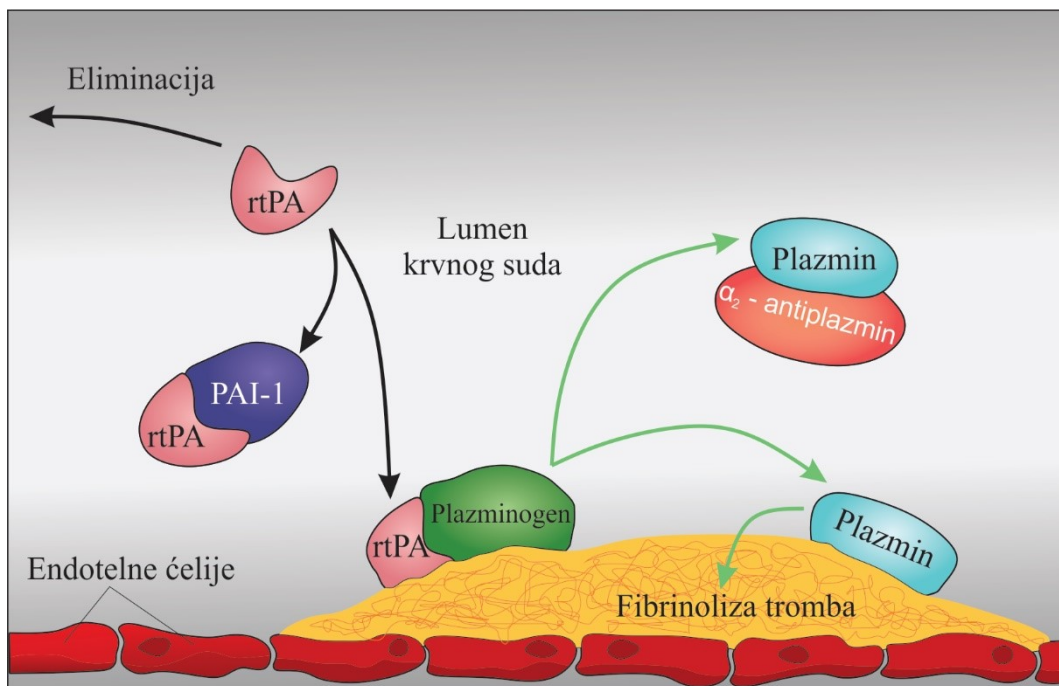
Protrombinsko stanje se definiše kao bilo koje stanje sa pojačanom sklonošću ka stvaranju krvnih ugrušaka. Protrombinska stanja mogu biti uzrokovana endotelnom disfunkcijom, abnormalnostima u koagulationom sistemu, smanjenom sposobnošću fibrinolitičkog sistema da razgradi tromb, ili bilo kojim drugim abnormalnostima koje narušavaju normalnu hemostazu (128). Abnormalnosti fibrinolitičkog sistema imaju važnu ulogu u patogenezi aterosklerotskih oboljenja, kao što su akutni infarkt miokarda i akutni ishemijski moždani udar (129,130).

Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) predstavlja glavni inhibitor endogene fibrinolitičke aktivnosti tako što se vezuje za tkivni aktivator plazminogena (tPA), zajedno formirajući neaktivan kompleks (131) i od suštinske je važnosti za regulaciju fibrinolitičkog sistema. Interakcija između primarnog medijatora fibrinolize- tPA i njegovog inhibitora- PAI-1 direktno reguliše stvaranje ili razgradnju tromba (Slika 5) (132).

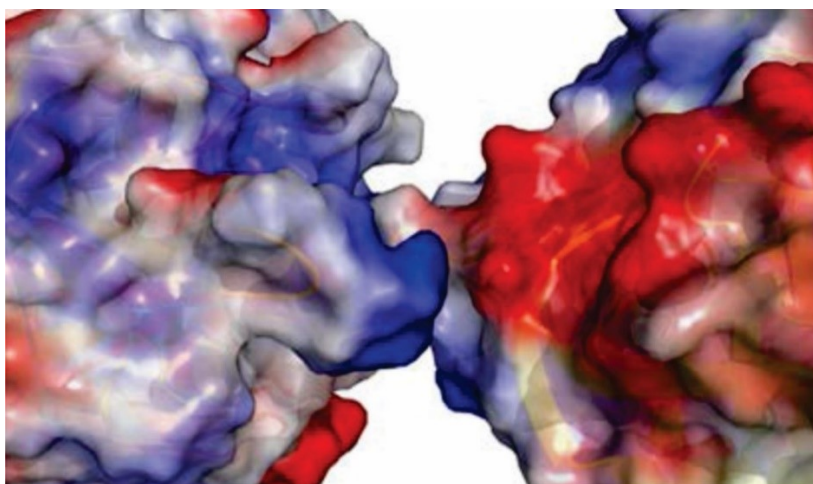
PAI-1 pripada superfamiliji inhibitora serinskih proteaza (serpinska superfamilija). Sintetiše se u aktivnom obliku, ali se u cirkulaciji spontano prevodi u inaktivni oblik sa polu-životom od jednog do dva sata u fiziološkim uslovima (133). PAI-1 se stvara u brojnim organima i ćelijama, uključujući jetru, slezinu, adipocite, endotelne ćelije, dok su astrociti glavni izvor PAI-1 u moždanom tkivu. Njegova sinteza je regulisana od strane nekoliko faktora kao što su insulin, lipidi status, nivo glukoze, endotoksina i inflamatornih citokina (134). PAI-1 molekul sadrži tri moguća mesta glikozilacije. Stanja različite glikozilacije mogu da utiču na stabilnost aktivnog oblika PAI-1, dok glikolizirani PAI-1 ima jaču inhibitornu aktivnost na tPA u odnosu na neglikolizirani PAI-1 (135). Eksperimentalne studije na miševima su pokazale da PAI-1, otpušten od strane astrocita, može smanjiti ekscitotoksičnost i smrt neurona ograničavanjem prekomerne aktivnosti tPA u parenhimu mozga (136), a dodatno može uticati na aktivnost KMB direktno ojačavajući okludentne veze između ćelija (137). Ova saznanja još uvek nisu potvrđena u humanoj populaciji.

Kao jedan od centralnih molekula u patogenezi i progresiji različitih vaskularnih oboljenja koja nastaju formiranjem tromba, između ostalih i IMU, i kao glavni endogeni inhibitor tPA, PAI-1 bi mogao biti povezan sa efikasnošću reperfuzije i rizikom od HT nakon terapije rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena kod pacijenata sa IMU. RtPA dovodi do značajnog povećanja nivoa plazmina u krvi što dovodi do povećanja produkata razgradnje fibrina uz propratno smanjenje koncentracije fibrinogena i α_2 -antiplazmina u plazmi. Smanjenje nivoa plazminogena i povećani nivoi PAI-1 ograničavaju efekte rtPA terapije. Koncentracija PAI-1 u novoformiranom trombu su i do nekoliko hiljada puta veće u odnosu na njegove koncentracije u fiziološkim uslovima i tako dovoljne

da inhibiraju rtPA doze korišćene za trobolizu (138). U plazmi, rtPA se nalazi u slobodnom obliku, ali i vezan za određene proteine plazme, među kojima i za PAI-1 (Slika 9). Na ovaj način, ovi proteini mogu značajno uticati na volumen distribucije, klirens i metabolizam rtPA (66). PAI-1 se vezuje preko svog centralnog dela za aktivno mesto na rtPA tako što negativno naelektrisana pukotina na PAI-1 molekulu direktno ulazi u pozitivno naelektrisanu petlju koju formiraju aminokiseline²⁹⁶⁻³⁰² unutar rtPA (Slika 10) (93).



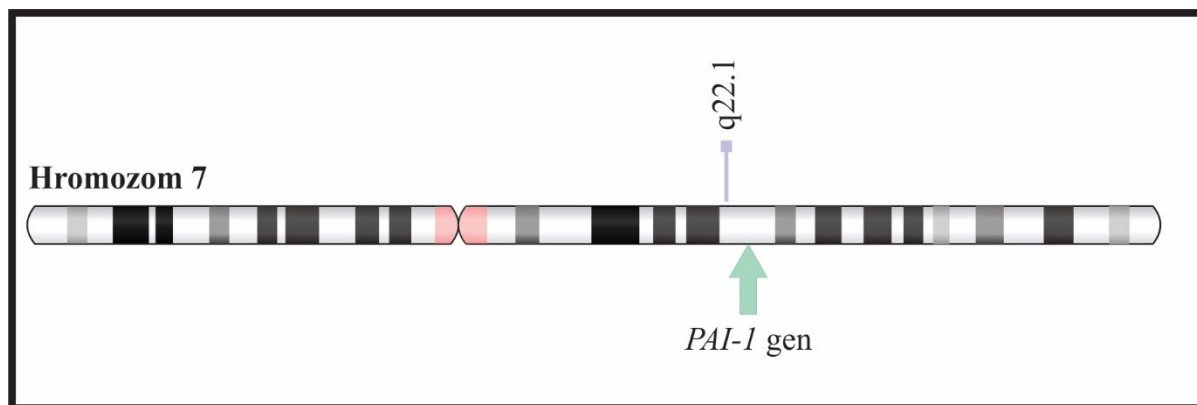
Slika 9. Shematski prikaz interakcije PAI-1 i rtPA u lumenu krvnog suda



Slika 10. Trodimenzionalni prikaz vezivanja rtPA (levo) i PAI-1 (desno) (93)

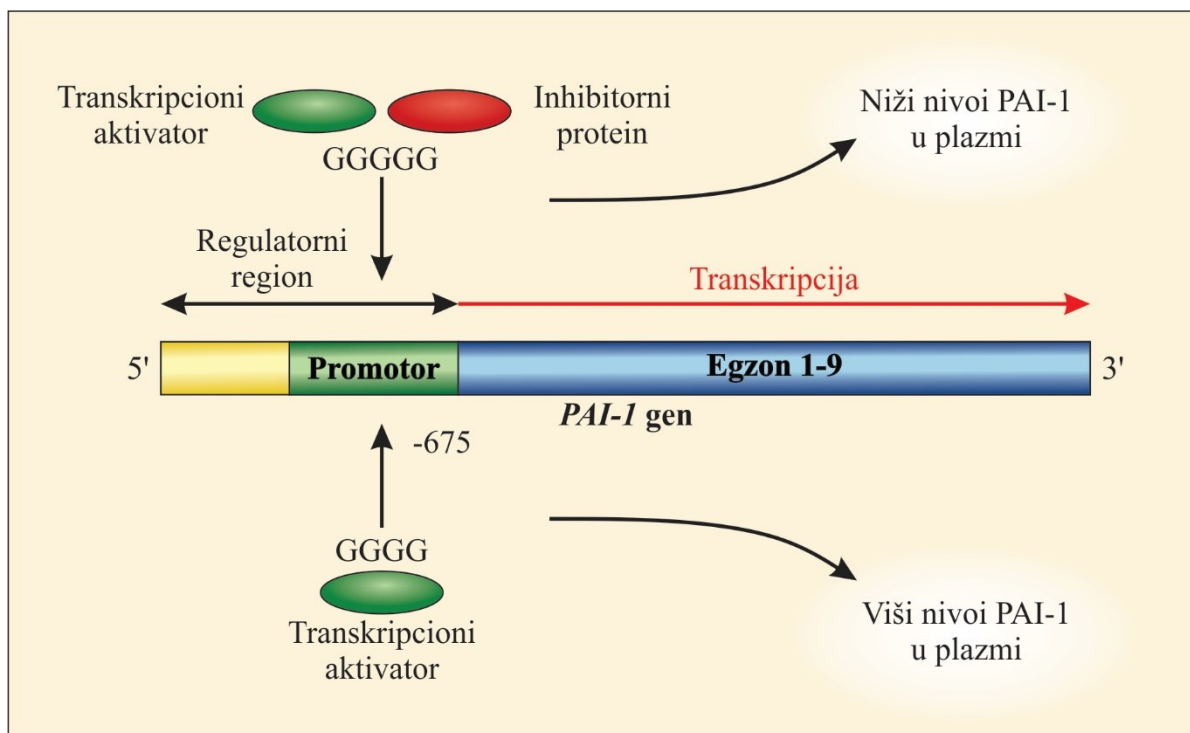
PAI-1 je kodiran *PAI-1* genom smeštenim na 7. hromozomu u regionu q21.3–q22 (Slika 11) (139). Veličine je 12,2 kilobaze (kb) i sadrži devet egzona i osam introna (140). Opisano je nekoliko

polimorfizama unutar *PAI-1* gena koji utiču na nivo PAI-1, od kojih je -675 4G/5G polimorfizam (rs1799889) najviše proučavan.



Slika 11. Shematski izgled hromozoma 7 i položaj *PAI-1* gena (modifikovano). (Slika dostupna na <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINE1#location>)

Inserciono-delecioni polimorfizam jednog nukleotida guanina (G) na -675 mestu u promotorskom regionu *PAI-1* gena (4G/5G) direktno utiče na nivo transkripcije gena, a posledično i na nivo PAI-1 u plazmi. 5G alelska forma se sastoji od pet nukleotida G, dok 4G ima sekvencu od četiri G na -675 bp uzvodno od početka transkripcije. Obe alelne forme sadrže mesta za vezivanje aktivatora transkripcije, ali 5G alelna varijanta vezuje i aktivatore i sadrži dodatno mesto vezivanja represornog inhibitorynog proteina, odsutnog u 4G alelskoj formi, što vodi smanjenom transkripcionom odgovoru kod 5G alela (141,142). Kao rezultat, 4G alelna varijanta dovodi do veće ekspresije *PAI-1* gena u odnosu na 5G varijantu, proizvodi i do šest puta više informacione RNK (iRNK) u *in vitro* uslovima i povezana je sa višim nivoima PAI-1 u plazmi (Slika 12) (142).



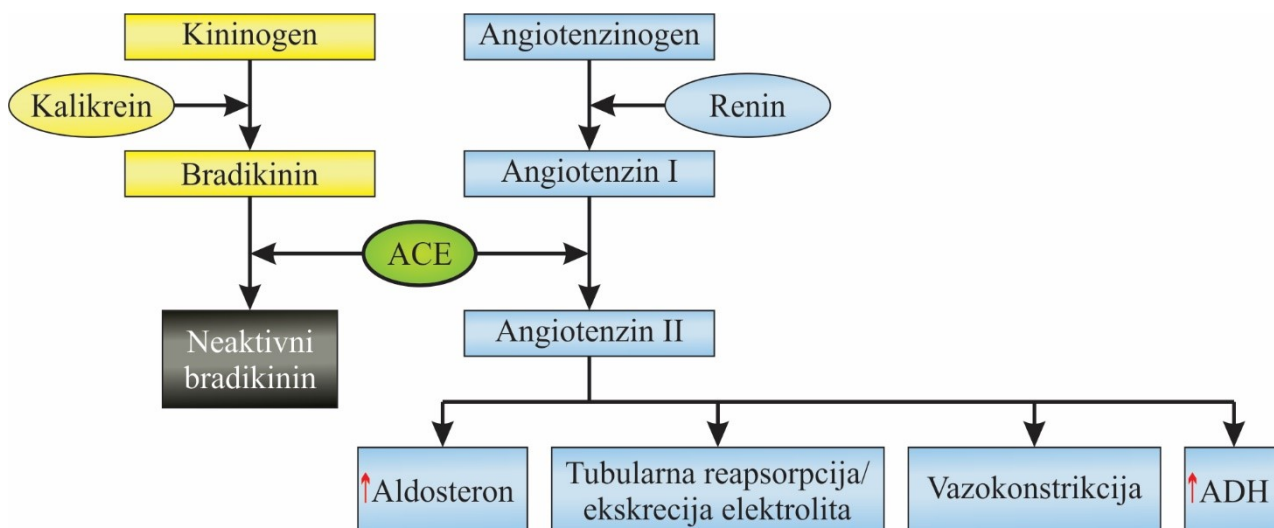
Slika 12. Shematski prikaz 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena (modifikovano) (143)

1.3.3. Struktura, funkcija i polimorfizmi ACE gena

Sistem renin-angiotenzin je deo hormonske signalizacije, a angiotenzin konvertujući enzim (ACE) predstavlja značajan enzim u renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) i kinin-kalikrein sistemu (144). ACE ima značajnu ulogu u vaskularnom remodelovanju, aterosklerozi, razvoju hipertenzije i cerebrovaskularnih bolesti, uključujući ishemijski moždani udar (145–147).

Angiotenzin konvertujući enzim spada u grupu Zn^{2+} zavisnih metalopeptidaza, nalazi se u serumu, ali je široko rasprostranjen i na površini endotelnih i epitelnih ćelija, gde katalizuje hidrolizu dipeptida His-Leu na karboksilnom kraju velikog broja oligopeptida (148). Najvažniju katalitičku aktivnost ACE ostvaruje prilikom prevođenja neaktivnog angiotenzina I u aktivni angiotenzin II koji direktno učestvuje u regulaciji tonusa krvnih sudova (149). Angiotenzin I nastaje od prekursora angiotenzinogena (sintetisanog u jetri), koji nastaje delovanjem renina, enzima sekretovanog iz jukstaglomerularnih ćelija bubrega kao odgovor na smanjene glomerularnog protoka, smanjenje Na^+ , ili usled β -adrenergičke stimulacije. Aktivacija angiotenzina I od strane ACE, ne dovodi samo do aktivacije angiotenzina II i posledične vazokonstrikcije preko interakcije angiotenzin II- AT receptora na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, već podstiče i lučenje aldosterona (reguliše homeostazu vode i elektrolita) iz kore nadbubrežne žlezde (150). Navedeni efekti direktno dovode do povećanja količine tečnosti u krvi, nadoknađujući gubitak volumena i dovode do povećanja krvnog pritiska (Slika 13) (151).

ACE ima veoma važnu ulogu i u kinin-kalikrein sistemu. U ovom sistemu ACE metaboliše bradikinin, snažni vazodilatator, pretvarajući ga u inaktivni oblik. Angiotenzin konvertujući enzim, dakle, ima prominentnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska i preko ovog puta, takođe. Bradikinin se formira iz kininogena aktivacijom preoteaze kalikrein, a inaktivira se delovanjem ACE (Slika 13) (152). U ostale produkte delovanja ACE spadaju gonadotropin oslobađajući hormon (GnRH), suptanca P, neurotenzin, ali njegova uloga ovde nije u potpunosti jasna (153). ACE je inicijalno izolovan iz plazme, ali u velikim koncentracijama se nalazi i u bubrezima, plućima, testisma (154).



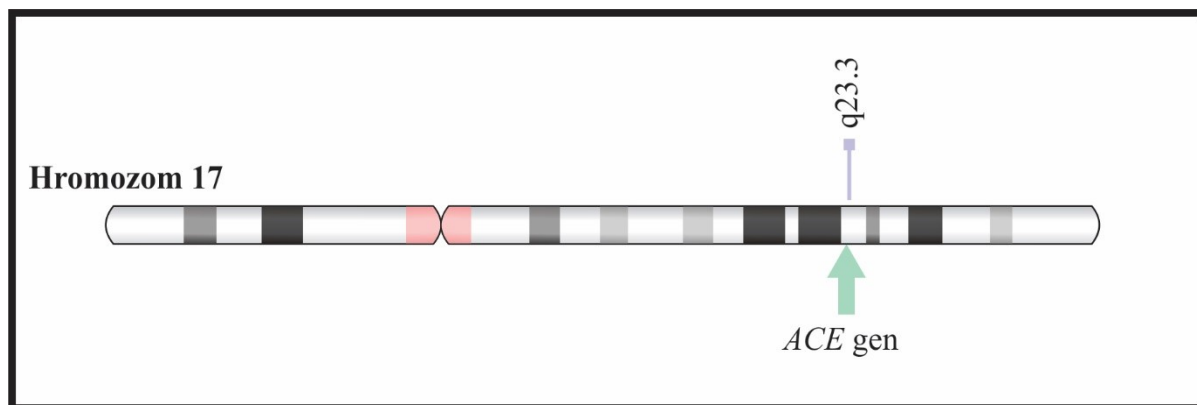
Slika 13. Shematski prikaz uloge ACE u renin-angiotenzin-aldosteron i kinin-kalikrein sistemu

Istraživanja su ukazala da su koncentracije ACE u plazmi ustaljene prilikom više uzastopnih merenja kod istog pojedinca, ali su primećene velike interindividualne razlike (155). Ovo sugerise da je dugoročna kontrola nivoa ACE u plazmi najverovatnije genskog porekla.

Gen za ACE smešten je na dugom kraku hromozoma 17 (17q23), veličine je 21 kb i sadrži 26 egzona i 25 introna (Slika 14). Do danas je poznato više od 160 polimorfizama unutar *ACE* gena, većina kao SNP varijante. Samo 34 polimorfizama smešteno je u kodirajućim regionima ovog gena, dok 18 predstavljaju *missense* mutacije (zamena jedne aminokiseline drugom) (151).

U 16. intronu *ACE* gena nalazi se funkcionalni inserciono/delecioni (I/D) polimorfizam koji direktno utiče na nivo ACE, a posredno i na nivo angiotenzina II u cirkulaciji i aktivnost pojedinih endogenih fibrinolitičkih faktora (156). Insercioni alel (I) ima Alu sekvencu od 287 bp koja kod delecionog alela (D) izostaje. Vrednosti ACE u serumu su približno dva puta veće kod osoba D/D genotipa u odnosu na osobe I/I genotipa. Osobe sa I/D genotipom su imale srednje vrednosti ACE u plazmi, ukazujući na kodominantnost I i D alela (157). Alel D, ne samo da je povezan sa višim nivoima ACE u serumu, posledično i angiotenzina II, već i sa višim vrednostima PAI-1, dok je u

homozigotnom obliku povezan sa smanjenim koncentracijama fibrinogena i faktora koagulacije VII i X, što ukazuje na mogući antikoagulantni efekat ovog polimorfizma (158). Angiotenzin II dovodi do povećane sinteze PAI-1 u glatkim mišićnim i endotelnim ćelijama (159). PAI-1 je jedan od osnovnih inhibitora fibrinolize, osnovnog mehanizma delovanja rtPA terapije. Preko ovih endogenih fibrinolitičkih faktora, moguć je uticaj I/D polimorfizma *ACE* gena na efikasnost i bezbednost primenjene rtPA terapije nakon IMU (158,160,161).



Slika 14. Shematski izgled hromozoma 17 i položaj *ACE* gena (modifikovano). (Slika dostupna na <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ACE>)

1.3.4. Struktura, funkcija i polimorfizmi gena za matriks metaloproteinaze

Matriks metaloproteinaze (MMP) pripadaju familiji Zn^{2+} zavisnih endopeptidaza, koje imaju ulogu u remodelovanju i razgradnji brojnih proteina vanćelijskog matriksa (VCM) i bazalne membrane (BM). Remodelujući vanćelijski matriks, MMP su uključene u fiziološke procese embrionalnog rasta i razvoja, angiogeneze, migracije primordijalnih germinativnih ćelija, regeneraciji i reparaciji tkiva, ali i u brojne patološke procese (162), između ostalih i IMU (163). MMP mogu da utiču i na aktivnost molekula na površini ćelija, i na taj način na različite intracelularne signalne puteve (164). Ravnoteža između MMP i njihovih tkivnih inhibitora (engl. Tissue inhibitor of metalloproteinases- TIMP) je veoma značajna. Narušavanje ove ravnoteže dovodi do nekontrolisane aktivnosti matriks metaloproteinaza i razgradnje proteina vanćelijskog matriksa u različitim patološkim stanjima (162), a kod IMU dovodi do narušavanja krvno-moždane barijere što za posledicu može imati hemoragijske komplikacije (165).

Familija matriks metaloproteinaza je veoma homogena i sastoji se od najmanje 25 enzima široko rasprostranjenih u brojnim humanim tkivima. Enzimi unutar MMP familije imaju oko 40% istu primarnu strukturu i sličnu strukturu jezgra (166). Sve matriks metaloproteinaze su izgrađene od tri domena: N-terminalnog domena, katalitičkog domena i C-terminalnog domena. Kod najvećeg

broja MMP, N-terminalni domen sačinjen je od oko 80 aminokiselina i ima ulogu u održavanju enzima u inaktivnom obliku. Katalitički domen se sastoji od oko 170 aminokiselina. Unutar katalitičkog mesta nalazi se Zn^{2+} -vezujući region koji povezan sa metioninom gradi metioninsku petlju. Katalitički domen sadrži dva mesta za vezivanje Zn^{2+} i tri Ca^{2+} -vezujuća mesta. Joni cinka su posebno važni za katalitičku aktivnost MMP, dok su joni kalcijuma neophodni za stabilizaciju katalitičkog domena. Katalitički domen je preko fleksibilnog zglobnog regiona, bogatog prolinom, povezan za C-terminalni domen. Dužina zglobnog regiona značajno varira u broju aminokiselina kod različitih matriks metaloproteinaza i njegova tačna uloga nije u potpunosti ispitana. C-terminalni domen (hemopeksin-sličan domen) sačinjen je od oko 200 aminokiselina, strukturno sličnih proteinima iz porodice hemopeksina, sa relativno velikom površinom za protein-protein interakciju. Matriks metaloproteinaze se sintetišu u različitim ćelijama kao proenzimi, čime se izbegava hidroliza intracelularnih proteina. Aktivacija MMP se vrši ekstracelularno, proteolitičkim uklanjanjem N-terminalnog domena serin proteazom- plazminom (pod kontrolom plazminogena i aktivatora plazminogena), ali i drugih proteaza. Aktivacija matriks metaloproteinaza predstavlja osnovni nivo regulacije MMP, ali pored nje, za regulaciju MMP su od izuzetne važnosti TIMP i α_2 -makroglobulin, glavni inhibitor matriks metaloproteinaza u serumu. Jedini izuzetak gde se direktno stvaraju aktivne forme enzima su membranske matriks metaloproteinaze (MT-MMP) (163,166–168).

Podela matriks metaloproteinaza se najčešće bazira u odnosu na specifičnost supstrata, ili njihove strukturne sličnosti. Na osnovu ovoga, sve matriks metaloproteinaze se mogu podeliti na:

1. Kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13);
2. Želatinaze (MMP-2, MMP-9);
3. Stromelizine (MMP-3, MMP-10);
4. Matrilizine (MMP-7);
5. Membranske MMP (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25);
6. Ostale MMP (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-23) (163,169).

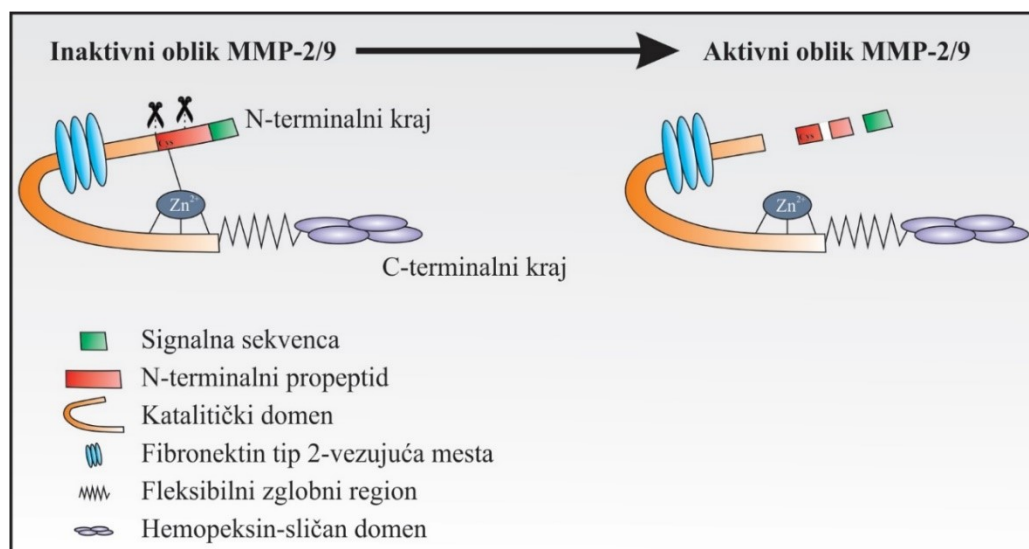
1.3.4.1. Struktura, funkcija i polimorfizmi MMP-2 i MMP-9 gena

Matriks metaloproteinaza 2 (MMP-2) i matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9) spadaju u grupu želatinaza i iako pripadaju velikoj familiji matriks metaloproteinaza sa dosta sličnosti sa ostalim MMP, kako u strukturi, tako i u enzimskoj aktivnosti, ove želatinaze imaju svoje osobenosti.

Želatinaza A je drugi naziv za matriks metaloproteinazu 2. Ulazi u sastav bazalne membrane, veličine je 72 kDa i primarna uloga joj je da vrši hidrolizu kolagena tip IV, ali i kolegana tipa V, VII, X, XIV, kao i fibronektina i elastina. Pored toga, MMP-2 razgrađuje i insulinu-slične faktore rasta,

koji imaju snažan uticaj na ćelijsku proliferaciju i inhibiciju apoptoze (170,171). Matriks metaloproteinaza 9 se naziva i želatinaza B. Veličine je 92 kDa, a primarno razgrađuje kolagen tip IV i V, ali i aktivira brojne proinflamatorne citokine (faktor nekroze tumora α - TNF α i interleukin 1 β – IL-1 β) (163).

Slično kao i ostale matriks metaloproteinaze, i želatinaze se sintetisu unutarćelijski u inaktivnom obliku. Sačinjene su od N-terminalnog domena unutar kog se nalaze cisteinski ostataci, katalitičkog domena sa jonima cinka, zglobnog regiona i C-terminalnog domena. Preko cisteinskih ostataka, N-terminalni domen je povezan sa katalitičkim domenom, onemogućavajući njihovu intracelularnu aktivaciju. Pored prisustva Zn²⁺ u katalitičkom domenu, u njemu se, kod želatinaza, nalaze i tri fibronektin tip II-vezujuća mesta, što ih izdvaja od drugih MMP. Aktivacija želatinaza započinje oksidacijom cisteinskih ostataka i dovodi do konformacijske izmene polipeptida koja sada omogućava njihovu proteolitičku aktivaciju. Proteoliza zimogena se dešava na dva mesta: unutar N-terminalnog domena i na mestu spoja N-terminalnog i katalitičkog domena (Slika 15) (168).



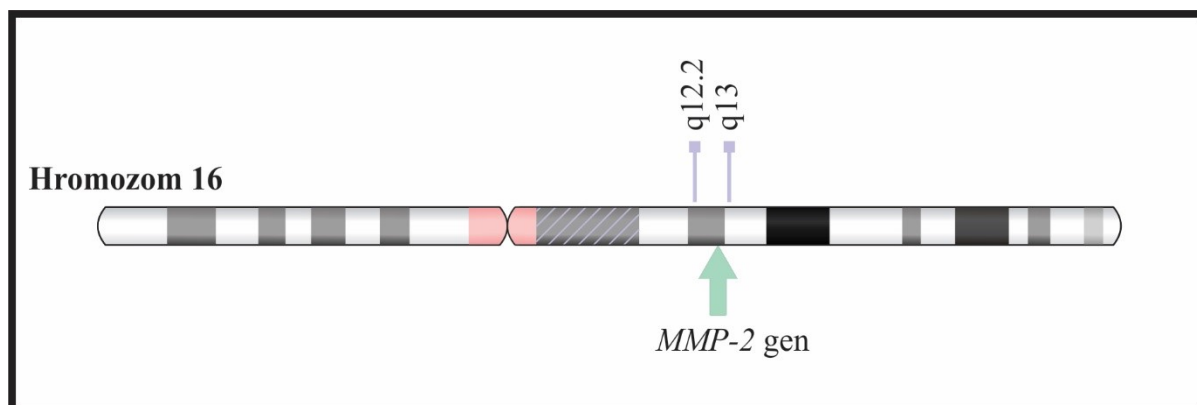
Slika 15. Aktivacija želatinaza (modifikovano) (168)

Pokazano je da su matriks metaloproteinaze uključene u kompleksnu patofiziologiju IMU, ali i javljanja komplikacija u vidu hemoragijske transformacije kod pacijenata lečenih rtPA terapijom. Sazrevanje i ruptura aterosklerotskog plaka, narušavanje krvno-moždane barijere, formiranje edema su neki od mehanizama preko kojih MMP učestvuju u patogenezi IMU (172). Nakon IMU, izmenjena je ekspresija i aktivacija MMP. Proinflamatorni citokini, oslobođeni tokom ishemije, stimulišu lokalnu produkciju MMP, posebno MMP-2, čiji su povećani nivoi, najvećim delom, sekretovani iz astrocita. Sa druge strane, visoki nivoi MMP-9, tokom ishemije, povezani su sa migracijom granulocita iz cirkulacije u region inflamacije i njihovom degranulacijom (31,173).

RtPA povećava rizik od HT nakon ishemijskog moždanog udara preko brojnih mehanizama vezivajući se za receptore na površini ćelija. Ovakva interakcija dovodi do povećanja nivoa MMP-2, MMP-3 i najviše MMP-9. RtPA se vezuje i aktivira proteazni receptor tip 1 i povećava ekspresiju MMP-9 preko NFκB (engl. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) transkripcionog faktora. Interakcija rtPA i lipoproteinskog receptora (engl. lipoprotein receptor protein- LRP) na površini endotelnih ćelija je još jedan mehanizam preko kog rtPA povećava ekspresiju MMP-9, ali i MMP-3. Vezivajući se za PDGF-C (engl. Platelet-derived growth factor C) receptor na površini astrocita, rtPA dovodi do povećane sinteze MMP-2. Rekombinovani tkivni aktivator plazmonogena stimulise i neutrofilnu degranulaciju i oslobađanje brojnih proteaza u cirkulaciju, između ostalih i MMP-9 (85,174,175). Prekomerno i produženo oslobađanje ovih enzima vodi dodatnom oštećenju moždanog parenhima (176) preko razgradnje kolagena tip IV, laminina i fibonektina, osnovnih komponenti KMB (173). Pokazano je da su u prva 24h nakon IMU koncentracije MMP-2 i njenog tkivnog inhibitora (TIMP-2) najveće, dok koncentracije MMP-9 i njenog tkivnog inhibitora (TIMP-1) dostižu pik nakon 48h (173).

Iako rana reperfuzija smanjuje rizik od nastanka HT (85), ne tako retko, dolazi do razvoja rane hemoragijske transformacije. Rana HT se javlja kao rezultat uspostavljanja recirkulacije usled pomeranja krvnog ugruška, što dovodi do reperfuzije preko leptomeningealnih anastomoza (177). Sa druge strane, odložena reperfuzija povećava rizik od hemoragijske transformacije. ROS, MMP-9 iz neutrofila i MMP-2 iz astrocita imaju najvažniju ulogu u ranom oštećenju krvno-moždane barijere i pojavi HT. Sa druge strane, vaskularno remodelovanje od strane matriks metaloproteinaza iz mozga i drugih proteaza, ROS i neuroinflamacija doprinose kasnijem oštećenju krvno-moždane barijere i javljanja hemoragijske transformacije (85).

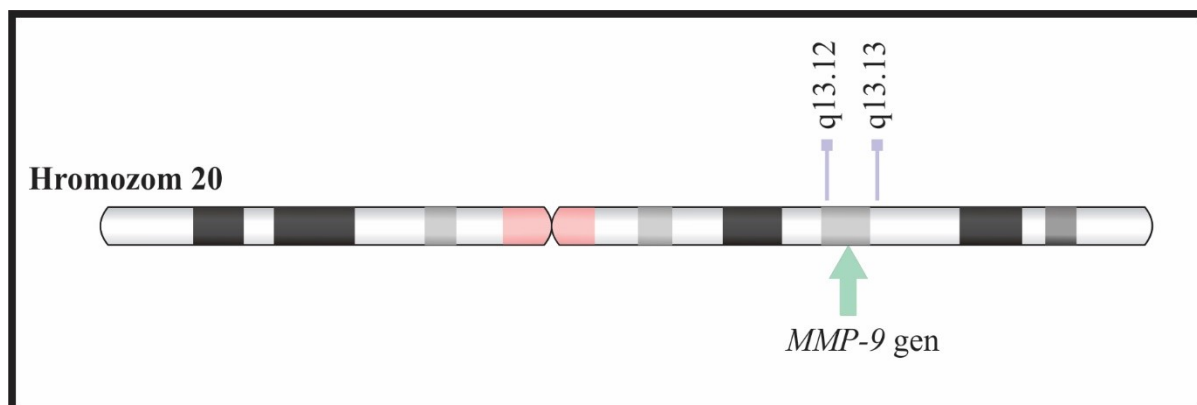
Matriks metaloproteinaza 2 je kodirana *MMP-2* genom smeštenom na dugom kraku hromozoma 16 (16q13) (Slika 16). U okviru ovog gena, dužine 17 kb, nalazi se 13 egzona različitih veličina (110 -901 bp) i 12 introna veličina od 175 - 4350 bp (178). Unutar *MMP-2* gena opisano je 24 SNP varijanti, od kojih se šest nalazi unutar promotora (179).



Slika 16. Shematski izgled hromozoma 16 i položaj *MMP-2* gena (modifikovano). (Slika dostupna na <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MMP2>)

Promotor *MMP-2* gena sadrži AP-2 (engl. Activating protein 2), p53, Sp-1 (engl. Specificity protein 1) i Sp-3 (engl. Specificity protein 3) mesta za vezivanje transkripcionih faktora. Polimorfne genske varijante u *MMP-2* regionu promotora mogu uticati na ekspresiju gena (180). Četiri od šest promotorskih polimorfizama predstavljaju i polimorfizme od najvišeg interesa (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T). Polimorfizam -1575 G/A utiče na vezivanje receptora estrogena, a karakteriše ga tranzicija guanina (G) u adenin (A) na poziciji -1575 uzvodno od mesta početka transkripcije. Alel A pomenutog polimorfizma je povezan sa većom aktivnošću promotora i većom stopom transkripcije (181). Kao produkt funkcionalnih -1306 C/T i -735 C/T SNP varijanti nastaju dva izoformna oblika *MMP-2* enzima. U oba navedena polimorfizma dolazi do supstitucije citozina (C) timinom (T). Ranije *in vitro* studije su ukazale da supstitucija baza u -735 C/T polimorfizmu utiče na stepen transkripcije *MMP-2* gena. Druge studije su potvrdile da je tranzicija C u T kod oba polimorfizma povezana sa smanjenom genskom ekspresijom usled ukidanja Sp1 mesta za koje se vezuju transkripcioni faktori (182). Polimorfizam -1306 C/T smešten je unutar CCACC sekvence Sp1-vezujućeg mesta, pa C alelna varijanta dovodi do 1,6 puta veće genske ekspresije u poređenju sa T alelnom varijantom (179). Polimorfna varijanta -790 T/G dovodi do trasverzije T u G. Lokalizovana je u obrnutom GATA-1 elementu (CTATCT) i smatra se da je jedino ovaj polimorfizam nefunkcionalan (179).

Matriks metaloproteinazu 9 je produkt *MMP-9* gena lokalizovanom na 20. hromozomu u regionu 20q11.2-q13.1 (Slika 17) i sastoji se od 13 egzona i 12 introna (183). Unutar *MMP-9* gena opisano je nekoliko SNP varijanti koje mogu dovesti do izmenjene funkcije *MMP-9* enzima i na taj način uticati na remodelovanje vanćelijskog matriksa.



Slika 17. Shematski izgled hromozoma 20 i položaj *MMP-9* gena (modifikovano). (Slika dostupna na <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MMP9>)

Polimorfizam -1562 C/T (rs3918242) je jedna od SNP varijanti *MMP-9* gena, koji sadrži mesto za vezivanje inhibitornih transkripcionih faktora na poziciji -1562. Tranzicija C u T dovodi do ukidanja ovog mesta i prekida vezivanja inhibitornih transkripcionih faktora što posledično vodi većoj promotorskoj aktivnosti T alelne varijante (184). Ovo potvrđuju i viši nivoi *MMP-9* u plazmi kod osoba TT genotipa -1562 C/T polimorfizma (185,186). Imajući u vidu da su studije pokazale da se radi o funkcionalnom polimorfizmu koji utiče na nivo *MMP-9* u plazmi, moguća je povezanost ovog polimorfizma i odgovora na rtPA terapiju kod pacijenata sa IMU, kao i javljanja HT nakon primene gore pomenute terapije.

1.3.5. Struktura, funkcija i polimorfizmi *TIMP-2* gena

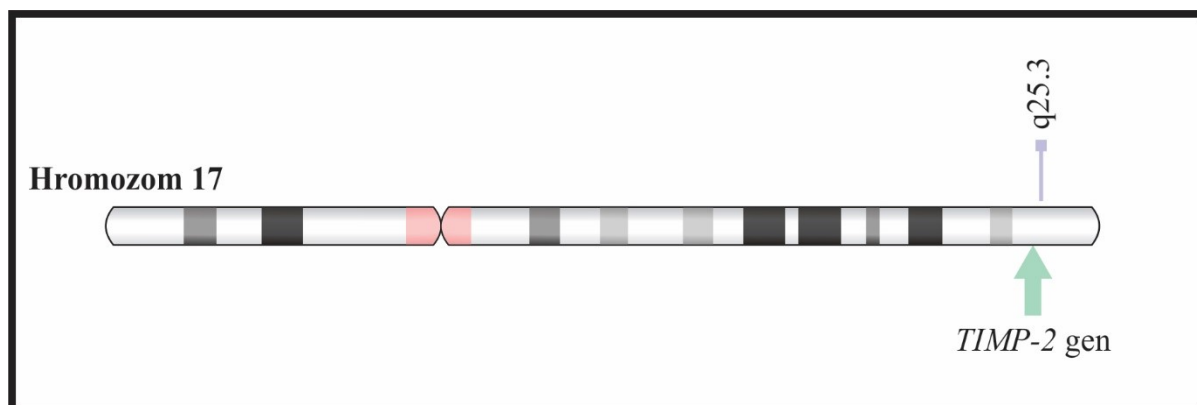
Tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza zajedno sa *MMP* imaju značajnu ulogu u fiziološkom održavanju i reorganizaciji vanćelijskog matriksa.

TIMP protein se sastoji od N-terminalnog i C-terminalnog domena. Dve trećine proteina se sastoji od velikog N-terminalnog domena izgrađenog od oko 125 aminokiselina preko koga *TIMP* inhibira matriks metaloproteinaze. Ostatak polipeptida čini manji, C-terminalni domen, sačinjen od oko 65 aminokiselina. Domeni su povezani sa po tri unakrsne disulfidne veze, dok su međusobno razdvojeni kratkim spejserom između šestog i sedmog cisteina u zreom tkivnom inhibitoru matriks metaloproteinaza koji ograničava fleksibilnost između domena (187). Do sada je izolovano četiri tipa *TIMP* proteina (*TIMP-1* – *TIMP-4*) (188). Koncentracija *TIMP*-a u tkivima povećana je tokom fiziološkog remodelovanja u embriogenezi i održavanja vanćelijskog matriksa, ali i tokom brojnih patoloških stanja koja dovode do oštećenja *VCM* (189). Četiri različita *TIMP* proteina međusobno se razlikuju prema tipu kompleksa koji formiraju preko C-terminalnog domena sa *MMP*. Tako se *TIMP*-

2 čvrsto vezuje za neaktivni oblik MMP-2 zajedno sa membranskim MMP (MT-MMP) i formira važan kompleks neophodan za aktivaciju MMP-2 na površini ćelije.

Zapravo, odnos između MMP-2 i TIMP-2 ne funkcioniše na klasičan način na principu inhibitor/supstrat. Veza između MMP-2 i TIMP-2 zavisi od koncentracije ova dva proteina. U uslovima niske koncentracije TIMP-2, preko C-terminalnog domena, TIMP-2 se nekovalentnim vezama vezuje istovremeno za MT1-MMP i za hemopeksin-sličan domen unutar MMP-2. Na ovaj način formira se kompleks koji dovodi do aktivacije MMP-2 na površini ćelije. Sa druge strane, visoka koncentracija TIMP-2, dovodi do vezivanja MMP-2 i TIMP-2 preko N-terminalnog domena i na taj način se stvara MMP-2/TIMP-2 inhibicioni kompleks (190,191). Odnos između MMP-2 i TIMP-2 je unikatan i zbog toga mnogi fiziološki, ali i patološki procesi zavise od ravnoteže ova dva proteina.

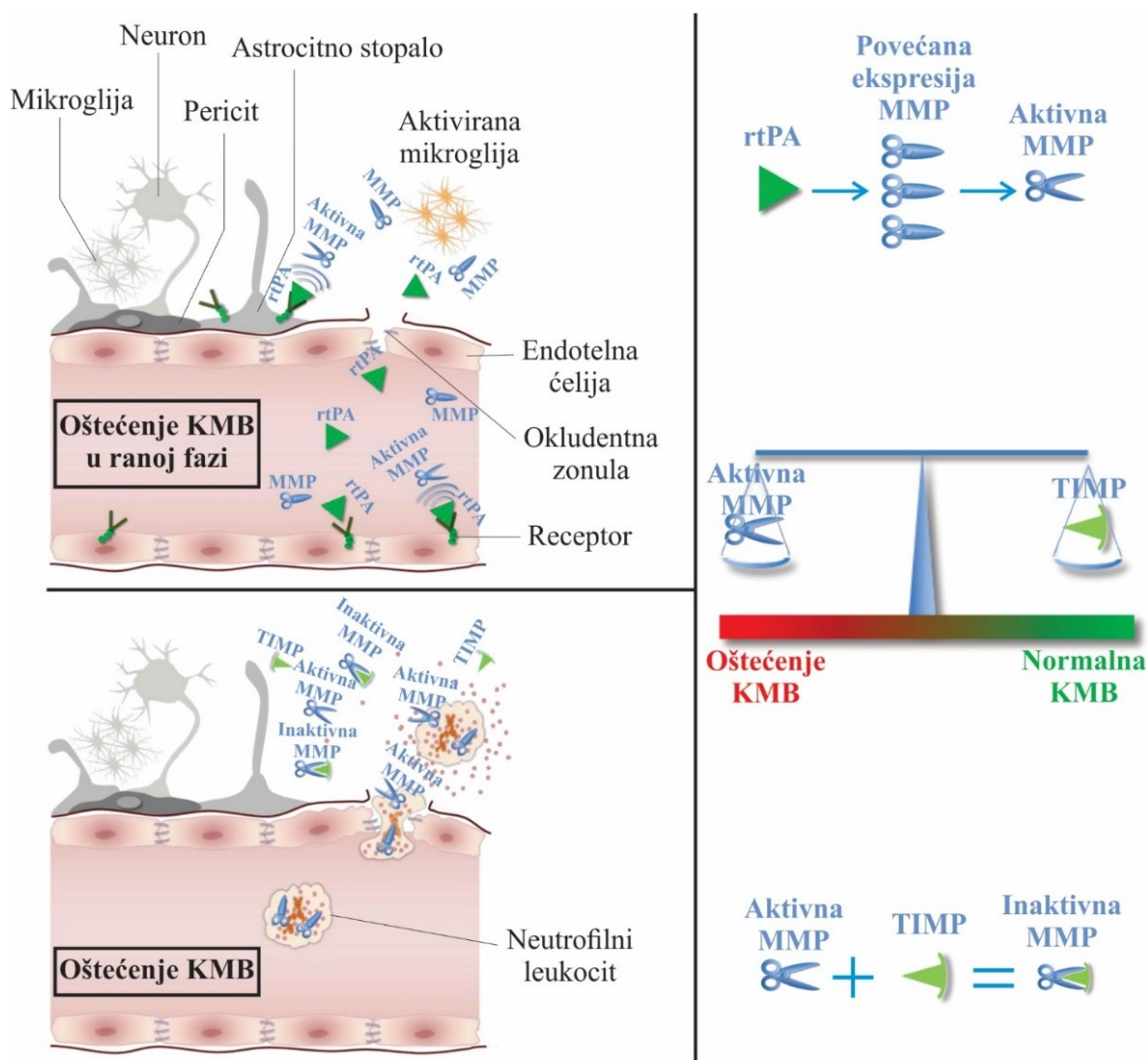
TIMP-2 protein je kodiran istoimenim genom, smeštenim na dugom kraku hromozoma 17 (17q25.3) (Slika 18). *TIMP-2* gen je veličine je 72,4 kb i sastoji se od pet egzona međusobno razdvojenih sa četiri introna (192).



Slika 18. Shematski izgled hromozoma 17 i položaj *TIMP-2* gena (modifikovano). (Slika dostupna na <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP2>)

Izmene u ekspresiji *TIMP-2* gena utiču na nivo TIMP-2, a posledično na aktivnost MMP-2, ali i drugih MMP u serumu, a potencijalno mogu biti povezane sa povećanim rizikom od IMU i javalnja HT (173). Kao posledica neravnoteže između MMP-2 i TIMP-2 kod određenih cerebrovaskularnih bolesti, može doći do razgradnje i disfunkcije zida krvnog suda, stvaranja moždane aneurizme, poremećaja KMB, destabilizacije aterosklerotičnog plaka (193), ali i transformacije cerebralne ishemije u HT nakon rtPA terapije (194).

Kod rtPA-posredovane neutrofilne degranulacije u moždanom tkivu nakon IMU i oslobađanja MMP i drugih proteaza, neravnoteža između TIMP i proteaza iz neutrofilnih granula može dovesti do ireverzibilnih oštećenja moždanog parenhima (174). Sa druge strane, uporedo sa pikom neutrofilne degranulacije, uočena je visoka koncentracija TIMP, predstavljajući mogući protektivni odgovor na povećanu koncentraciju sekretovanih MMP (Slika 19) (176). Međutim, različiti polimorfizmi *TIMP-2* gena mogu dovesti do strukturnih promena u TIMP-2 proteinu, ili uticati na njegovu transkripciju i dovesti do sinergističkog dejstva TIMP-2 i MMP, bržeg narušavanja krvno-moždane barijere i većeg rizika od HT nakon IMU (173).



Slika 19. Oštećenje krvno-moždane barijere nakon IMU lečenog rtPA; Ravnoteža između matriks metaloproteinaza (MMP) i njihovih tkivnih inhibitora (TIMP) (modifikovano) (194)

Unutar *TIMP-2* gena nalazi se više polimorfizama. U promotoru *TIMP-2* gena utvrđena je funkcionalna SNP varijanta (-418 G/C) koja nakon transverzije G u C ukida mesto za vezivanje Sp-

1 transkripcionog faktora. Sp-1 se vezuje za sekvencu DNK prisutnu u brojnim ćelijama i povećava transkripcionu aktivnost gena unutar kojih se nalazi CCACC blok. Dodatno, Sp-1 je povezan sa NF- κ B transkripcionim faktorom koji pojačava transkripciju gena kao odgovor na inflamaciju. Sp-1 i NF- κ B deluju sinergistički na stepen transkripcije, stoga bilo kakve promene u interakciji Sp-1 i DNK mogu da dovedu do izmene genske ekspresije (195). C alelska varijanta -418 G/C polimorfizma ukida Sp-vezujuće mesto što vodi smanjenju transkripcione aktivnosti *TIMP-2* gena (192,196).

Studije su ukazale da -303 C/T polimorfna varijanta, smeštena unutar 3. egzona *TIMP-2* gena, ne utiče na ekspresiju gena samostalno, međutim postoje dokazi da je u asocijaciji sa drugim *TIMP-2* polimorfizmima ovaj SNP funkcionalan (197).

Izmene u ekspresiji mogu da dovedu do različitih nivoa *TIMP-2* u serumu i utiču na ravnotežu *TIMP-2* i MMP, a posledično i pojavu rtPA indukovane HT kod pacijenata sa IMU.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Naše istraživanje je sprovedeno sa ciljem da se kod osoba sa ishemijskim moždanim udarom, a koji su lečeni intravenskom trombolitičkom terapijom:

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

3. MATERIJAL I METODE

3.1. DIZAJN STUDIJE

Istraživanje je dizajnirano po tipu hibridne panel studije, koja predstavlja kombinaciju 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 koji je lečen rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena.

3.2. ISPITANICI

U studiju je uključeno 166 konsektivna pacijenta sa IMU lečenih rtPA terapijom u Specijalnoj bolnici za cerebrovaskularne bolesti „Sveti Sava” u Beogradu u periodu od avgusta 2016. godine do avgusta 2018. godine. Veličina uzorka (broj ispitanika) formirana je na osnovu godišnje dinamike osoba sa IMU lečenih rtPA terapijom u ovoj ustanovi.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bili su postavljena dijagnoza IMU i ordinirana rtPA terapija, kao i uzrast stariji od 18 godina.

Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije su bili postavljena dijagnoza hemorgijskog moždanog udara ili urađena trombektomija nakon trombolitičke terapije (kod pet pacijenata). Takođe, iz studije su isključeni svi pacijenti koji nisu dali pismeni pristanak za učešće u istraživanju.

Po prijemu, svakom pacijentu je uzeta anamneza, obavljen neurološki i CT pregled endokranijuma, izmeren sistolni i dijastoli krvni pritisak i uzeta krv za laboratorijske analize. Takođe, određivan je neurološki deficit merljiv po NIHSS skali (engl. National Institutes of Health Stroke Scale). NIHSS skala se bazira na proceni neurološkog deficita nakon IMU posmatrajući stanje svesti pacijenta, postojanje ekstraokularnih i vidnih ispada, slabost facijalne muskulature, motoriku gornjih i donjih ekstremiteta, prisutnost ataksije, poremećaj senzibiliteta, govora ili postojanje fenomena neglekta. Svaki od gore navedenih parametara se skorira od 0 do 2, od 0 do 3, ili od 0 do 4 u zavisnosti o kom sistemu se radi. Odsustvo simptoma, odnosno normalna funkcija određena je skorom 0, dok je maksimalan NIHSS skor 42 (1). NIHSS procena je obavljena i 24h nakon primljene rtPA terapije i

po otpustu iz bolnice s ciljem da se proceni da li postoji promena u neurološkom statusu. Svim pacijentima je određena i težina IMU na osnovu inicijalnog NIHSS skora (Tabela 4) (198).

Tabela 4. Težina moždanog udara

NIHSS skor	
0-4	Lak IMU
5-15	Umeren IMU
16-20	Umeren do težak IMU
21-42	Težak IMU

Nakon prijemne ambulante, svi pacijenti sa ispunjenim kriterijumima za rtPA terapiju (1), prebačeni su u Jedinicu za moždani udar, gde im je ordinirana navedena terapija. Drugog dana nakon hospitalizacije, pored laboratorijskih analiza urađenih po prijemu (glukoza, urea, kreatinin, Na⁺, K⁺, INR, apTT), svim pacijentima urađene su i dodatne laboratorijske analize (holesterol, trigliceridi, alanin amino-transferaza - ALT, aspartat amino-transferaza - AST). Za sve ispitanike prikupljeni su sledeći podaci: starost, pol, faktori rizika (hipertenzija, dijabetes melitus, atrijalna fibrilacija, ishemijska bolest srca, srčana insuficijencija, periferna arterijska bolest, pušenje), kao i podaci o nekom od prethodnih neželjenih ishemijskih događaja (TIA, IMU i AIM).

Tokom hospitalizacije praćena je pojava sledećih neželjenih reakcija nakon trombolitičke terapije: simptomatske intracerebralne hemoragije, hemoragijske transformacije, sistemskog krvarenja, alergijske reakcije, epileptičkog napada, agitacije, intrahospitalne infekcije, ali i letalnog ishoda.

Kontrolni CT snimak obavljen je rutinski svim pacijentima 24h nakon trombolitičke terapije. Prisustvo hemoragijske transformacije na kontrolnom CT snimku definisano je u skladu sa ECASS II kriterijumima (88). U slučaju naglog pogoršanja neurološkog stanja, kontrolni CT snimak je hitno urađen. Prisustvo sICH definisano je u skladu sa ECASS III kriterijumima (89). Kontrolnim, ili hitnim CT snimkom je registrovano prisustvo i drugih intrakranijalnih hemoragija koje su se proširile iz ishemičnih hemoragija (intraventrikularna krvarenja, SAH).

Sistemsko krvarenje je definisano kao bilo koje ekstrakranijalno krvarenje, koje se javilo nakon rtPA terapije, a da pre terapije nije postojalo.

Pojava agitacije podrazumeva epizode raznolikih psihomotornih fenomena, nakon trombolitičke terapije, različitog vremena trajanja, kod pacijenata koji nikada ranije ništa slično nisu

imali i kod kojih je ispitivanjem isključen drugi uzrok pojave ovakve izmene ponašanja (metabolički poremećaj, infekcija i sl.).

Epileptički napad je definisan kao generalizovani ili parcijalni napad, nakon trombolitičke terapije kod pacijenata koji nikada ranije ništa slično nisu imali.

Alergija na rtPA je registrovana kao pojava urtikarije, ospe, svraba i drugo, neposredno nakon ili u toku primene trombolitičke terapije.

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. MRS je skala globalo korišćena za procenu funkcionalnog oporavka kod pacijenata nakon IMU. MRS se bazira na subjektivnoj proceni neurologa o stanju pacijenta u odnosu na funkcionalno stanje pre IMU, a ne u odnosu na izvođenje specifičnih zadataka tokom pregleda (199). Rankin skala je prvi put formirana 1957. godine, a zatim modifikovana 1988. godine od strane Warlow i saradnika. Iako ne postoji idealna skala za procenu ishoda nakon IMU, prednosti mRS zbog koje je u samom vrhu određivanja funkcionalnog oporavka nakon IMU u svetu su to što obuhvata celokupan opseg simptoma- od stanja bez ijednog zaostalog simptoma IMU, do smrtnog ishoda (Tabela 5). Uprkos činjenici da je mRS skala jednostavna za korišćenje i razumevanje od strane neurologa, ali i pacijenata, subjektivnost je najveća mana ove skale (200).

Efikasnost rtPA terapije je procenjivana na osnovu povoljnog funkcionalnog oporavka, definisanog mRS skorom 0 ili 1, tri meseca nakon IMU (201).

Tabela 5. Modifikovan Rankin skor skala

Skor	
0	Bez simptoma
1	Nema značajne onesposobljenosti, pacijent može da obavlja sve uobičajene aktivnosti uprkos postojanju blagih simptoma
2	Blagi stepen onesposobljenosti, pacijent je sposoban da se brine o sopstvenim potrebama bez pomoći, ali ne i da obavlja sve aktivnosti kao pre IMU
3	Srednji stepen onesposobljenosti, pacijent zahteva malo pomoći, samostalno pokretan
4	Umereno teška onesposobljenost, nemogućnost obavljanja sopstvenih potreba i samostalnog hoda
5	Težak stepen onesposobljenosti, pacijent ima inkontinenciju, zahteva stalnu negu i nepokretan je
6	Smrtni ishod

Promene mRS na otpustu i tri meseca nakon IMU smo koristili za procenu funkcionalnog oporavka pacijenta, kao i efekta rtPA terapije. Dobar oporavak je označen skorovima 0 i 1, dok su skorovi veći od 2 označavali loš oporavak tri meseca nakon IMU (202). Ishod lečenja rtPA terapije, procenjivan preko mRS skale tri meseca nakon IMU, zabeležen je kod 162 pacijenata.

Svakom pacijentu je uzet uzorak od 5mL venske krvi u vakutaner sa antikoagulansima (natrijum-citrat, etilendiamintetraacetatna kiselina - EDTA) 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).

3.3. METODE

3.3.1. Izolacija molekula DNK

Sva molekularno-genetička ispitivanja obavljena su u laboratorijama Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Totalna genomska DNK izolovana je iz leukocita periferne krvi metodom isoljavanja (engl. Salting out) po Milleru (203). Iako se u poslednjoj deceniji za potrebe izolacije DNK koriste različiti komercijalni setovi- kitovi, metoda isoljavanja je i dalje često u upotrebi.

Postupak izolacije DNK metodom isoljavanja je podeljen na dva dana. Prvi dan izolacije započinje 20-minutnom inkubacijom 5 ml venske krvi sa antikoagulansima i 5 ml pufera za lizu (0,32 M saharoza, 10 mM Tris HCl, 1% TRITON x 100,5 mM MgCl₂) na temperaturi od 4°C. Po isteku inkubacije, sve zajedno se centrifugira na 2000 rmp 15 minuta, nakon čega se supernatant odlije. Dobijeni talog se ispira sa 5-10 ml fiziološkog pufera (0,075 M NaCl, 0,025 M EDTA pH=8), po potrebi nekoliko puta, sve dok ne postane bele boje. Nakon svakog ispiranja, smešu je potrebno centrifugirati 15 minuta na 2000 rmp. Po završetku poslednjeg ispiranja, supernatant se odliava, dok se talogu, koji je ostao na dnu epruvete, doda 3 ml pufera A (10 mM TRIS HCl #, 400 ml NaCl, 2 mM EDTA pH=8), 200 µl 10% SDS i 50 µl rastvora proteinaze K (10 mg/ml). Potrebno je uzorak dobro resuspendovati i ostaviti u termostatu na 37°C preko noći.

Drugi dan izolacije počinje tako što se rastvoru doda 1 ml 6 M NaCl (značajno povećava rastvorljivost DNK), a potom epruveta snažno izmućka. Rastvor je potrebno ponovo centrifugirati na 3000 rmp 15 minuta, kako bi se proteini istaložili. Po završetku centrifugiranja, supernatant se prebacuje u čistu epruvetu. Ovaj proces precipitacije proteina potrebno je obaviti još dva puta, nakon čega se supernatant prebacuje u čistu graduisanu epruvetu. Pažljivo se očitava volumen supernatanta i dodaje ista zapremina izopropanola. Smeša se meša okretanjem dok se ne uoči DNK precipitat izgleda beličastog končića. Staklenim štapićima DNK končići se pokupe, a zatim drže potopljenim 30 sekundi u 70% alkoholu. Nakon isteka ovog vremena, štapići sa DNK se ostavljaju da se suše na sobnoj temperaturi 30-60 minuta. Po završetku sušenja, DNK se rastvara u 300 µl vode za injekcije (203).

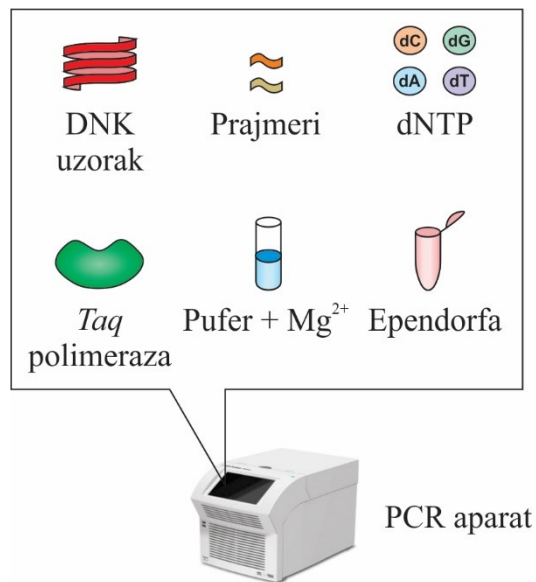
Koncentracija i kvalitet izolovane DNK određeni su spektrofotometrijom na $\lambda=260\text{nm}$ za DNK i $\lambda=280\text{nm}$ za rezidualne proteine. Odnos apsorbancija na $\lambda=260\text{nm}$ i $\lambda=280\text{nm}$ ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$)

daje informaciju o čistoći dobijenog uzorka. Ukoliko je odnos apsorbancija između 1,8-2,0 uzorak je visoke čistoće.

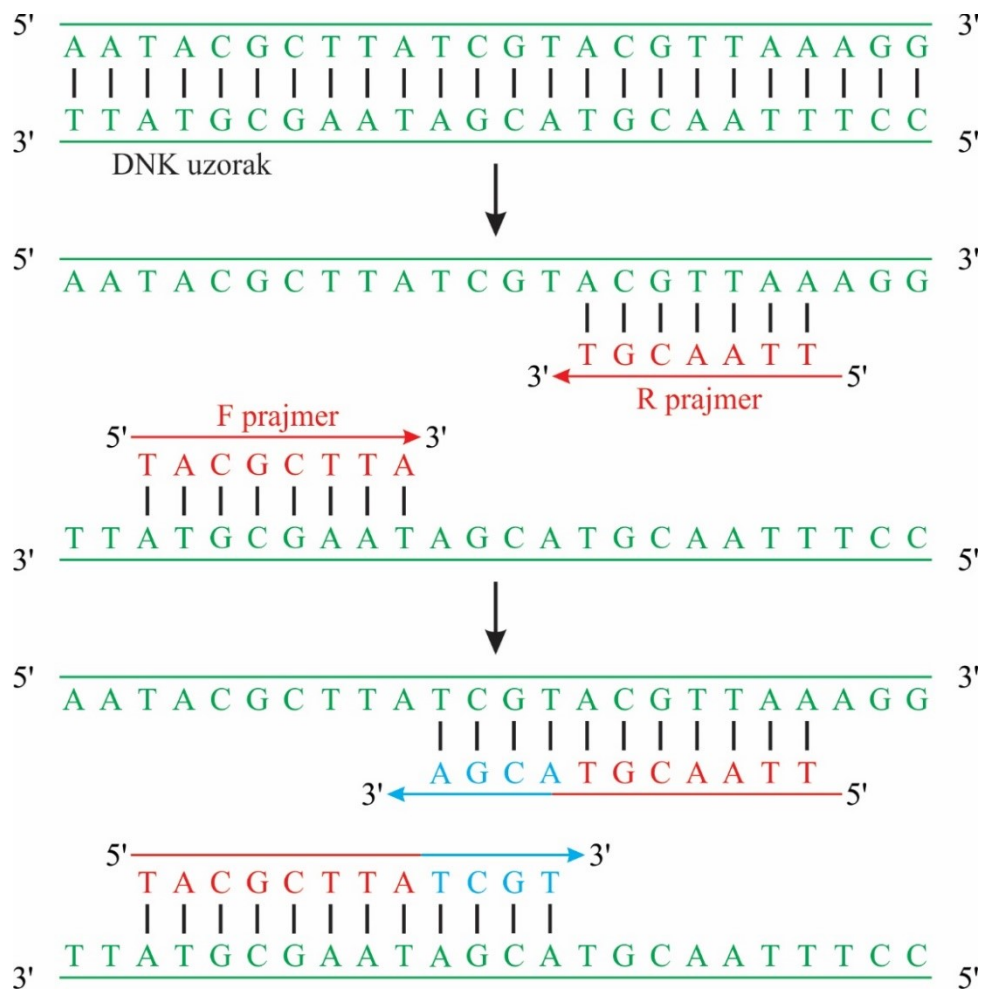
3.3.2. Određivanje genotipova polimorfizama 4G/5G PAI-1 (rs1799889), -735 C/T MMP-2 (rs2285053) i -1562 C/T MMP-9 (rs 3918242) gena

U slučaju PAI-1 (rs1799889), MMP-2 (rs2285053) i MMP-9 (rs 3918242) gena, genotipovi su određeni reakcijom lančane polimerizacije - polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata (engl. Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis - PCR–RFLP).

Reakcija lančane polimerizacije (PCR metoda) je molekularno-genetička metoda, nastala 1985. godine, kojom se *in vitro* umnožavaju željeni segmenti DNK molekula, a zasniva se na principu replikacije. U narednim godinama protokoli za PCR metodu su modifikovani i prošireni, ali tek kada je 1988. godine otkrivena termostabilna *Taq* polimeraza, izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*, PCR metoda se značajno pojednostavila i automatizovala. U sastav PCR smeše, pored DNK molekula, ulaze i *Taq* polimeraza, pufer, Mg^{2+} , prajmeri i slobodni nukleotidi u vidu dezoksinukleozid-trifosfata (dNTP) (Slika 20). *Taq* polimeraza, enzim koji vrši dodavanje nukleotida tj. sintezu novog lanca, otporna je na visoke temperature neophodne za denaturaciju molekula DNK (raskidanje vodoničnih veza i razdvajanje dva komplementarna lanca DNK), jedan od koraka PCR metode, kao i na visoke temperature potrebne za specifično vezivanje prajmera. Za potrebe PCR metode neophodan je pufer (engl. buffer) koji obezbeđuje idealne uslove *Taq* polimerazi, najčešće su od istog proizvođača i dolaze u kompletu. Pufer održava konstantu pH vrednost i jonski sastav PCR smeše. Joni magnezijuma obezbeđuju stabilnost lanaca DNK molekula nakon raskidanja vodiničnih veza i katalizuju ugradnju nukleotida u rastući lanac. Prajmeri su specijalno dizajnirani jednolančani nizovi nukleotida komplementarni regionima DNK od interesa, ograničavaju deo DNK molekula koji treba da bude amplifikovan i obično se sastoje od 18-38 nukleotida. U PCR reakciji prajmeri imaju ulogu početnice na koju *Taq* polimeraza dodaje komplementarne nukleotide. Za svaku PCR analizu, potrebna su dva prajmera- prednji (engl. forward- F) koji se vezuje za 3'-5' lanac na početku mesta koji je potrebno umnožiti, i drugi prajmer- reverzni (engl. reverse- R) koji se vezuje za 5'-3' lanac na mestu koji označava završetak željenog segmenta DNK (Slika 21).



Slika 20. Sastav smeše za PCR reakciju



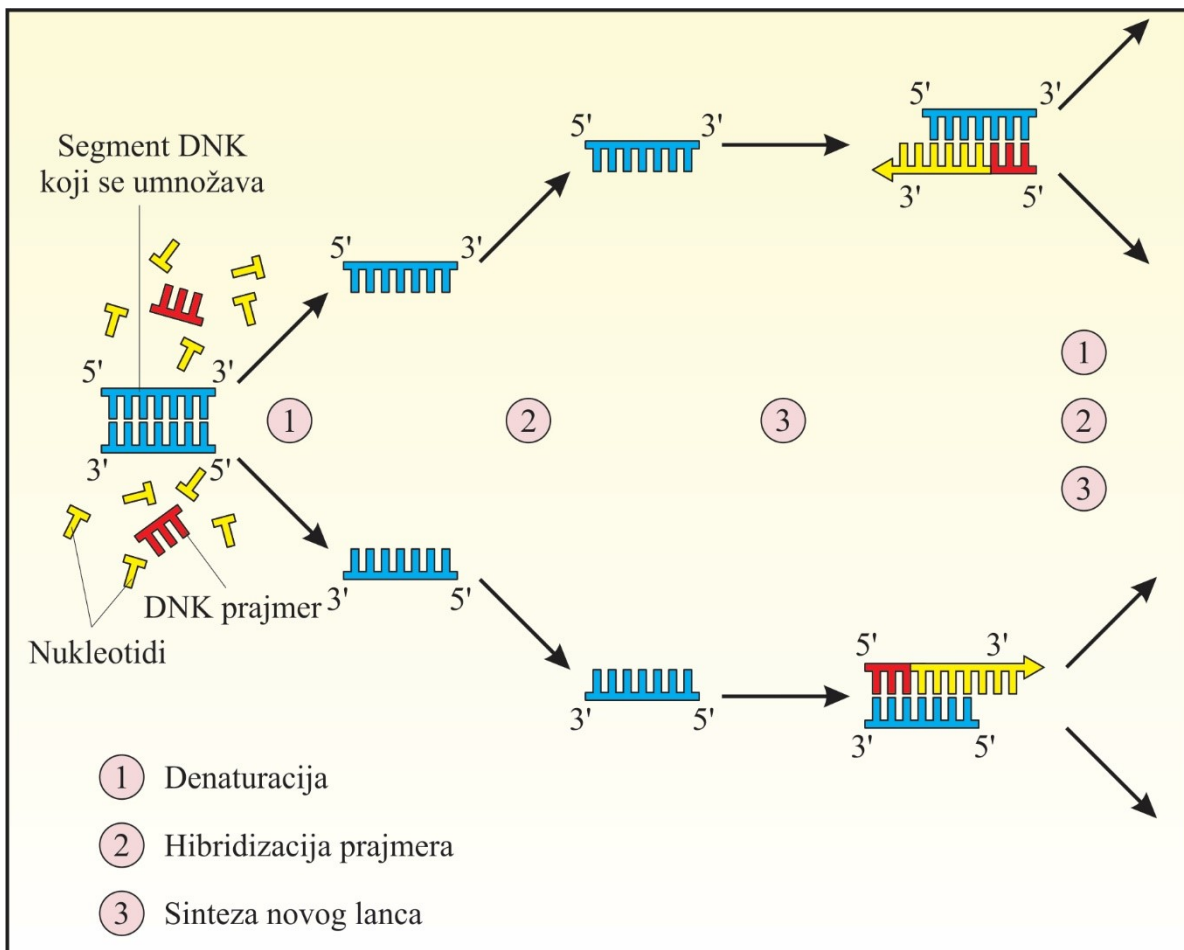
Slika 21. Vezivanje F i R prajmera tokom PCR reakcije

PCR metoda započinje inicijalnom denaturacijom na 94°C - 96°C u trajanju od pet minuta pri kojoj se *Taq* polimeraza aktivira. Zatim slede tri osnovna koraka PCR metode koja se ponavljaju određeni broj ciklusa, svaki put duplirajući broj umnoženih segmenata DNK molekula. To su:

1. denaturacija molekula DNK pri dejstvu visokih temperatura (94°C - 96°C),
2. hibridizacija prajmera (engl. annealing) - vezivanja prajmera za komplementarne target sekvence na temperaturama 50°C-70°C (u zavisnosti od sekvence prajmera),
3. elongacija lanca (sinteza novog lanca) - *Taq* polimeraza se vezuje za prajmere i počinje da dodaje nukleotide jedan po jedan simultano čitajući matricu i poštujući pravilo komplementarnosti na temperaturi od 72°C, optimalnoj za *Taq* polimerazu (Slika 22).

Broj ciklusa zavisi od broja željenih umnožaka DNK molekula. Broj kopija željene sekvence DNK se može odrediti formulom 2^n , gde n predstavlja broj ciklusa. Broj kopija ciljne DNK sekvence raste eksponencijalno. Broj ciklusa je najčešće između 25 i 40, gde je 25 ciklusa granična vrednost kojom se stvori dovoljan broj kopija koji se mogu uočiti nakon gel-elektroforeze i bojenja. Na ovaj način, nakon PCR metode, dobija se umnoženi segment DNK molekula u nekoliko miliona, pa čak i milijardi kopija nazvanih PCR produkti, a koji se nakon gel-elektroforeze i bojenja odgovarajućim bojama mogu vizuelizovati na transiluminatoru (204,205).

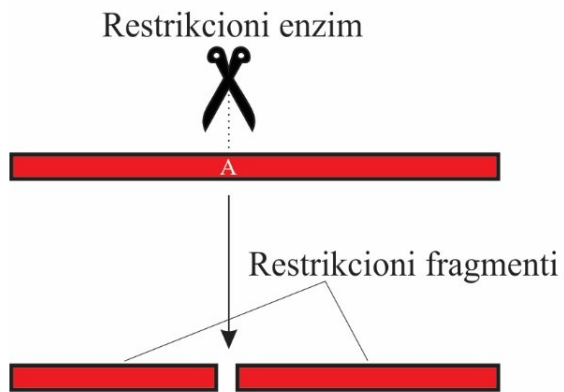
PCR metoda je veoma elegantna i jednostavna, a njeni rezultati su izuzetno značajni i korisni. Svestranost PCR metode učinila ju je jednom od najčešće korišćenih metoda u molekularnoj dijagnostici različite etiologije, od genetike, preko onkologije, do virusologije i detekcije različitih mikrobnih organizama.



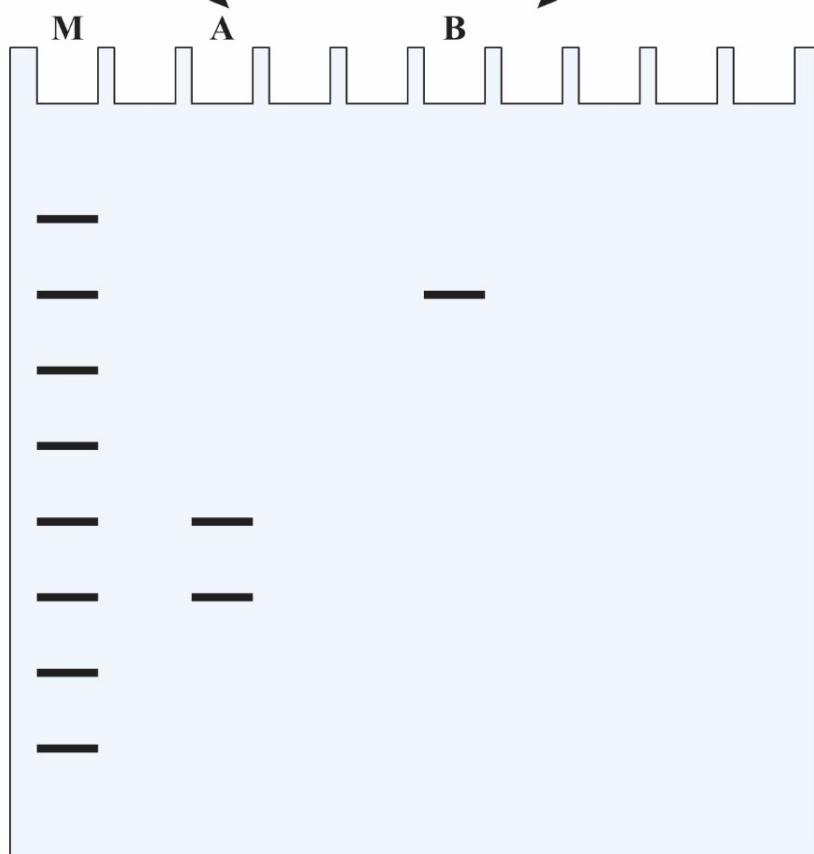
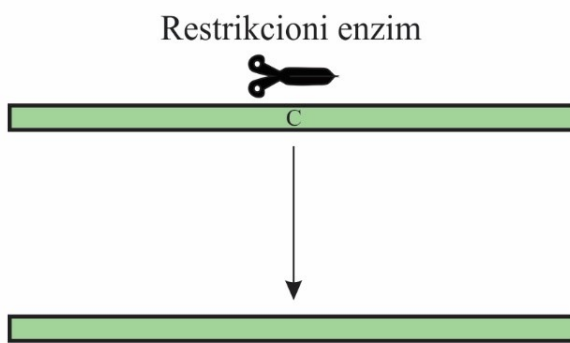
Slika 22. Shematski prikaz PCR reakcije

Regione gena koje smo analizirali i amplifikovali PCR metodom izlagali smo, zatim, delovanju odgovarajućih restrikcionih endonukleaza RFLP metodom, pri čemu su se aleli, na ovaj način detektovani, razlikovali po prisustvu, ili odsustvu restrikcionog mesta za odgovarajući enzim. PCR–RFLP je jednostavna metoda kojom se otkrivaju polimorfizmi ili mutacije. RFLP se bazira na endonukleaznom isecanju PCR produkata u tačno definisanim regionima (restrikcionim mestima) formirajući na taj način restrikcione fragmente (Slika 23). Iz bakterijskih ćelija su izolovane i nazvane restrikcione endonukleaze koje na PCR produktima specifično prepoznaju palindromske sekvence (ista sekvenca nukleotida kada se čita u 5'- 3' smeru i na 5'-3' i na 3'-5' lancu) što je najčešće i mesto njihove digestije (206).

DNK uзорak - osoba A



DNK uзорak - osoba B



Slika 23. Shematski prikaz delovanja restrikcioni enzima i izgled gela nakon gel elektroforeze

Za sve gore navedene polimorfizme, PCR metoda je urađena u aparatu SureCycler 8800 Agilent Technologies.

Reakciona PCR smeša za jedan uзорak, zapremine 25 μ l, prikazana je u Tabeli 6.

Tabela 6. Sastav reakcione PCR smeše

<i>Sastojak</i>	Količina
<i>Ampulirana H₂O</i>	17,85 µl
<i>10 x pufer B</i>	2,5 µl
<i>25 mM rastvor MgCl₂</i>	2 µl
<i>10 mM rastvor dNTP</i>	0,25 µl
<i>F prajmer (10 nmol/µl)</i>	0,4 µl
<i>R prajmer (10 nmol/µl)</i>	0,4 µl
<i>5 U/µl FIREPol[®] Taq polimeraza</i>	0,1µl
<i>DNK (100 ng/µl)</i>	1,5 µl

Rezultati sečenja restrikcionim endonukleazama su posle gel-elektroforetskog razdvajanja i bojenja sybr[®] safe DNA gel-stain bojom (Invitrogen) analizirani na 8% poliakrilamidnim gelovima (Tabela 7) prosvetljenim na UV transiluminatoru (ETX-F20.M, Vilber).

Tabela 7. Sastav smeše 8% poliakrilamidnog gela

<i>Sastojak</i>	Količina
<i>H₂O</i>	6 ml
<i>TBE x 5</i>	2 ml
<i>akril-amid (40%)</i>	2 ml
<i>APS (10%)</i>	70 µl
<i>TEMED</i>	13 µl

3.3.2.1. Analiza 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena (rs1799889)

Genotipovi 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena (rs1799889) određeni su PCR-RFLP metodom. Prajmeri korišćeni u PCR reakciji ograničavaju region od 99 bp. Sekvenca prajmera je:

- F prajmer: 5'-CAC AGA AGT CTG GCC ACGT-3',
- R prajmer: 5-CCA ACA GAG GAC TCT TGG TCT-3'.

PCR metoda se sastojala iz sledećih koraka:

- Početna denaturacija od tri minuta na 95°C;
- 32 ciklusa od tri koraka:
 1. denaturacija jedan minut na 94°C,
 2. hibridizacija prajmera jedan minut na 60°C,
 3. ekstenzija prajmera i DNK polimerizacija jedan minut na 72°C;
- završna ekstenzija na 72°C sedam minuta.

Umnoženi deo *PAI-1* gena dužine je 99 bp. Po završetku umnožavanja, vršena je restrikcija PCR produkata *BseI* restrikcionim enzimom koji specifično prepoznaje sekvencu 5'...CCNNNNN↓NNGG...3', gde N predstavlja bilo koji od četiri nukleotida. Nakon restrikcije od 30 minuta na 37°C u termostatu, uzorci su analizirani vertikalnom gel-elektroforezom. Sastav restrikcione smeše za jedan uzorak predstavljen je u tabeli 8.

Tabela 8. Sastav restrikcione smeše za 4G/5G polimorfizam *PAI-1* gena

<i>Sastojak</i>	<i>Količina</i>
<i>Ampulirana H₂O</i>	8 ml
<i>Pufer</i>	1,4 µl
<i>Enzim BseI (U)</i>	0,6 µl
<i>PCR produkt (µg)</i>	5 µl

Restrikciono mesto za *BseI* enzim je odsutno kod osoba sa 4G alelnim oblikom. Kod osoba sa 5G alelom, *BseI* enzim je sekao PCR produkte na restrikcione produkte od 70 bp, 28 bp i 1 bp. Analizom gela, može se uočiti jedna traka od 98 bp koja odgovara genotipu 4G/4G, ili jedna traka od 70 bp koja odgovara genotipu 5G/5G. Ukoliko je osoba heterozigot, genotipa 4G/5G, na gelu se vide trake od 98 bp i 70 bp.

3.3.2.2. Analiza -735 C/T polimorfizma MMP-2 gena (rs2285053)

Za analizu genotipova polimorfizma -735 C/T MMP-2 gena (rs2285053) PCR-RFLP metodom korišćeni su prajmeri koji umnožavaju region od 391 bp. Sekvence prajmera neophodnih za ovu reakciju su sledeće:

- F prajmer: 5'-GGA TTC TTG GCT TGG CGC AGG-3',
- R prajmer: 5'-GGG GGC TGG GTA AAA TGA GGG TG-3'.

PCR metoda se sastojala iz sledećih koraka:

- Početna denaturacija od pet minuta na 95°C;
- 35 ciklusa od tri koraka:
 1. denaturacija pola minuta na 95°C,
 2. hibridizacija prajmera 45 s na 67°C,
 3. ekstenzija prajmera i DNK polimerizacija jedan minut na 72°C;
- završna ekstenzija na 72°C sedam minuta.

Po završetku umnožavanja, produkt reakcije tretiran je *HinfI* restrikcionim enzimom preko noći na 37°C u termostatu. Sastav restrikcione smeše, po uzorku, predstavljen je u tabeli 9.

Tabela 9. Sastav restrikcione smeše za -735 C/T polimorfizam MMP-2 gena

Sastojak	Količina
<i>Ampulirana H₂O</i>	8 ml
<i>Pufer</i>	1,4 µl
<i>Enzim HinfI (U)</i>	0,6 µl
<i>PCR produkt (µg)</i>	5 µl

Nakon završene digesije, uzorci su analizirani vertikalnom gel-elektroforezom. *HinfI* enzim prepoznaje restrikciono mesto 5'...G↓ANTC... 3'. Izostanak restrikcionog mesta ukazivao je na C alel i davao fragment veličine 391 bp. Restrikciono mesto je prisutno u slučaju prisustva T alela, pri čemu se dobijaju produkti veličine 338 bp i 53 bp. Kod osoba sa CC genotipom, na gelu se uočava samo jedna traka veličine 391 bp. Osobe heterozigoti su imale dve trake od 391 bp i 338 bp.

3.3.2.3. Analiza polimorfizma -1562 C/T MMP-9 gena (rs 3918242)

PCR-RFLP metodom određivani su genotipovi -1562 C/T polimorfizma *MMP-9* gena (rs 3918242). Produkti PCR reakcije su sečeni *SphI* restrikcionim enzimom.

Prajmeri korišćeni u PCR reakciji imali su sledeće sekvence:

- F prajmer: 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3',
- R prajmer: 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3'.

PCR metoda se sastojala iz sledećih koraka:

- Početna denaturacija od deset minuta na 95°C;
- 35 ciklusa od tri koraka:
 1. denaturacija 45 s na 95°C,
 2. hibridizacija prajmera 45 s na 60°C,
 3. ekstenzija prajmera i DNK polimerizacija 45 s na 72°C;
- završna ekstenzija na 72°C sedam minuta.

PCR produkti se inkubiraju u restrikcionoj smeši zajedno sa restrikcionim enzimom *SphI* na 37°C preko noći u termostatu. Sastav restrikcione smeše predstavljen je u tabeli 10. *SphI* enzim prepoznaje restrikciono mesto 5'... GCATG ↓C... 3' i seče PCR produkt veličine 435 bp na restrikcione produkte veličine 247 bp i 188 bp, ukoliko je prisutan T alel. Kod C alela, restrikciono mesto izostaje, pa se kod osoba CC genotipa može uočiti samo jedna traka veličine 435 bp.

Tabela 10. Sastav restrikcione smeše za -1562 C/T polimorfizam *MMP-9* gena

<i>Sastojak</i>	<i>Količina</i>
<i>Ampulirana H₂O</i>	9 ml
<i>Pufer</i>	1,6 μ
<i>Enzim BselI (U)</i>	0,4 μl
<i>PCR produkt (μg)</i>	4 μl

3.3.3. Određivanje genotipova I/D polimorfizma ACE gena (rs4646994)

Polimorfizam rs4646994 ACE gena predstavlja inserciono/delecionu varijantu ovog gena. Analiza ovog polimorfizma vršena je PCR metodom. Sekvenca korišćenih prajmera je:

- F: 5'-CTG GAC ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3',
- R: 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'.

PCR uslovi su bili:

- početna denaturacije od pet minuta na 94°C,
- 35 ciklusa od tri koraka:
 1. denaturacija pola minuta na 94°C,
 2. hibridizacija prajmera 30 s na 63°C,
 3. ekstenzija prajmera i DNK polimerizacija pola minuta na 72°C;
- završna ekstenzija na 72°C sedam minuta.

Nakon završene PCR reakcije, PCR produkti su direktno puštani na vertikalnu gel-elektroforezu. Unutar umnoženog dela ACE gena veličine 490 bp prisutna je Alu sekvenca od 278 bp, što na gelu odgovara I alelu. Izostanak Alu sekvence odgovara D alelu, pa produkti PCR reakcije imaju 203 bp.

3.3.4. Određivanje genotipova polimorfizama -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864) MMP-2 i -303 C/T (rs2277698) i -418 G/C (rs8179090) TIMP-2 gena

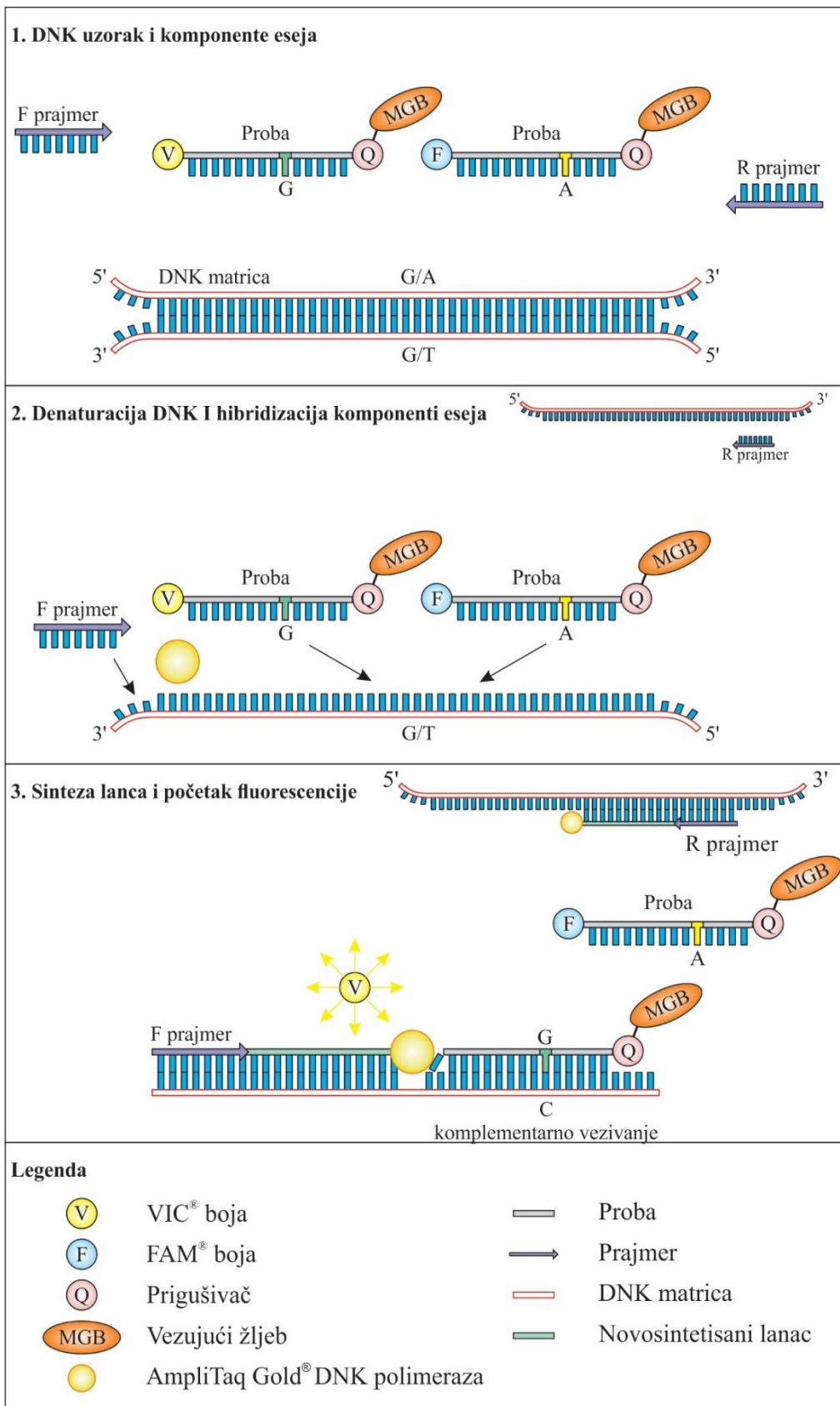
Genotipizacija polimorfizama unutar TIMP-2 (rs2277698 i rs8179090) i MMP-2 gena (rs243866, rs243865, rs243864) izvršena je metodom lančane polimerizacije u realnom vremenu (engl. Real-time Polymerase Chain Reaction – *real-time* PCR) na aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Za ove analize korišćene su specijalno dizajnirane TaqMan probe (TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, Foster City, SAD).

Real-time PCR metoda se drugačije naziva i kvantitativna PCR metoda. Dinamika DNK umožavanja se prati detekcijom fluorescentnih signala, koji su direktno srazmerni količinom stvorenih PCR produkata po završetku svakog PCR ciklusa u realnom vremenu. Alel-specifične oligonukleotidne probe, pored prajmera, sastavni su deo smeše za *Real-time* PCR metodu. Ove probe su na svom 5' kraju označene različitim fluorescentnim bojama (tzv. reporter boje – VIC, FAM). Sa druge strane, na 3' kraju probe je prisutan prigušivač (engl. *quencher*) koji blokira impuls

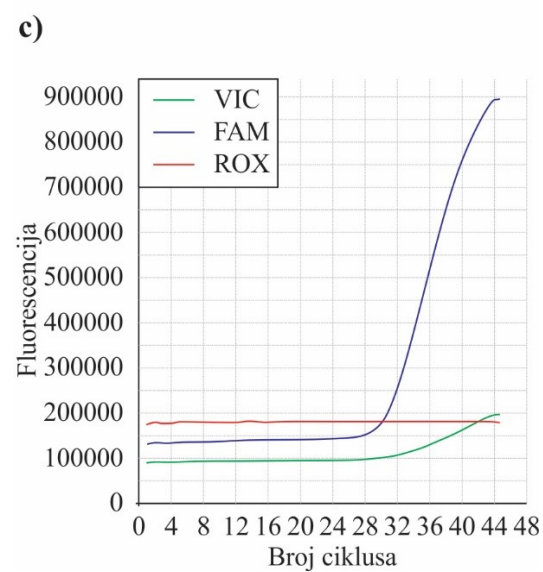
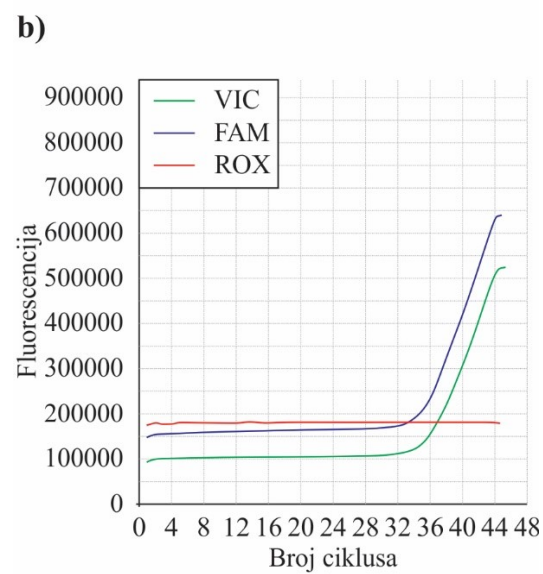
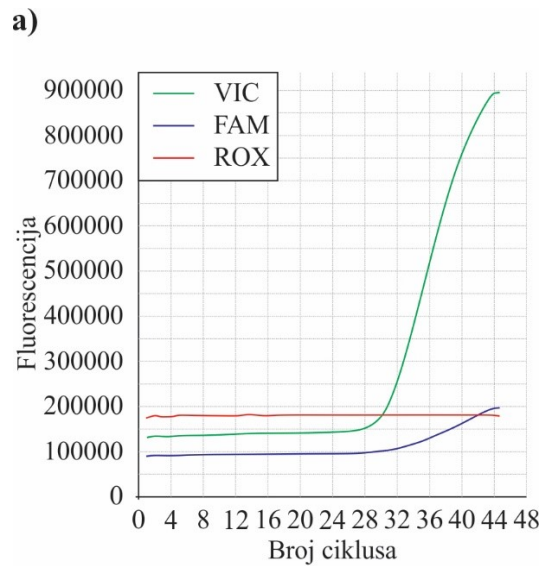
fluorescencije. *Real-time* PCR metoda se sastoji od početne 10-minutne denaturacije na 95°C tokom koje se aktivira *Taq* polimeraza i serije temperaturnih promena koje se ponavljaju 25 - 50 ciklusa. Svaki ciklus se sastoji od dva stadijuma koja se ponavljaju:

1. Denaturacije (na oko 95°C) u trajanju od jednog minuta
2. Vezivanja prajmera (50°C - 60°C) i proba i elongacije lanca.

Tokom hibridizacije, pored prajmera, za target sekvencu DNK, vezuje se i jedna proba. S obzirom da *Taq* polimeraza ima 5' - 3' egzonukleaznu aktivnost, u fazi elongacije, ona uklanja nukleotid na 5' kraju probe. Za ovaj nukleotid je vezana fluorescentna boja, pa njegovim uklanjanjem dolazi do razdvajanja reportera i prigušivača i reporter počinje da emituje fluorescenciju, koja se detektuje optičkim instrumentima unutar aparata (Slika 24). Fluorescentne probe razlikuju se po boji (VIC i FAM) i u sekvenci (na mestu bazne supstitucije). Nakon što se *Real-time* PCR reakcija završi, u zavisnosti od intenziteta fluorescencije, može se odrediti genotip. Izrazito uvećanje samo jedne boje ukazuje na homozigotnu varijantu. Ukoliko su se relativno jednako emitovale fluorescencije obe boje, reč je o heterozigotu (Slika 25) (207,208).



Slika 24. Shematski prikaz PCR reakcije u realnom vremenu



Slika 25. Izgled rezultata PCR reakcije u realnom vremenu. Slike a) i c) predstavljaju homozigote za različite alelne varijante; slika b) heterozigot

3.3.4.1. *Analiza polimorfizma -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864) MMP-2 i -418 G/C (rs8179090) i -303 C/T (rs2277698) TIMP-2 gena*

Analiza polimorfizma -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864) *MMP-2* i -418 G/C (rs8179090) i -303 C/T (rs2277698) *TIMP-2* gena određena je *real-time* PCR metodom. Za sve polimorfizme korišćene su specijalno dizajnirane TaqMan probe, dok je sastav reakcione smeše, zapremine 13 µl, po jednom uzorku, za sve polimorfizme predstavljen u tabeli 11.

Tabela 11. Sastav reakcione smeše za PCR metodu u realnom vremenu

Sastojak	Količina
<i>Ampulirana H₂O</i>	5,125 µl
<i>TaqMan Universal Master Mix</i>	6,25 µl
<i>Assay</i>	0,625 µl
<i>DNK</i>	1 µl

Uslovi *real-time* PCR metode, za sve polimorfizme, su bili sledeći:

- početna denaturacija i aktivacija *Taq* polimeraze deset minuta na 95°C,
- 40 ciklusa od dva koraka:
 1. denaturacija 15 s na 92°C,
 2. hibridizacija i ekstenzija prajmera i DNK polimerizacija jedan minut na 60°C,
- završna ekstenzija na 72°C jedan minut.

Kod polimorfizma -1575 G/A (rs243866) *MMP-2* gena, VIC boja odgovarala je A alelu, dok je FAM boja odgovarala G alelu.

Kod polimorfizma -1306 C/T (rs243865) *MMP-2* gena, VIC boja odgovarala je C alelu, dok je FAM boja odgovarala T alelu.

Kod polimorfizma -790 T/G (rs243864) *MMP-2* gena, VIC boja odgovarala je G alelu, dok je FAM boja odgovarala T alelu.

Kod polimorfizma -418 G/C (rs8179090) *TIMP-2* gena, VIC boja odgovarala je C alelu, dok je FAM boja odgovarala G alelu.

Kod polimorfizma -303 C/T (rs2277698) *TIMP-2* gena, VIC boja odgovarala je C alelu, dok je FAM boja odgovarala T alelu.

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Na osnovu urađenih genskih analiza utvrđene su apsolutne učestalosti alela i genotipova. Mere deskriptivne statistike - mere centralne tendencije i mere varijabiliteta, tabeliranje i grafičko prikazivanje korišćene su u opisivanju podataka. U statističkoj analizi podataka korišćene su parametarske i neparametarske statističke metode, u zavisnosti od tipa raspodele. Analiza varijanse, studentov T-test i Kruskal-Wallis-ov test su upotrebljeni za procenu značajnosti razlike apsolutnih vrednosti za kontinuirana obeležja, a hi-kvadrat (χ^2) test za kategorijalne varijable. Sve varijable koje su se pokazale značajnim su zatim uvršćene u multivarijantu logističku regresionu analizu sa lošim ishodom kao ishodom varijablom. Statistička obrada podataka urađena je SPSS softverom 22.0 (SPSS, Chicago, IL, USA, 2009). Analiza haplotipova *MMP-2* gena je obavljena koristeći Haploview softver 4.0. koristeći Gabriel et al. metodu (209).

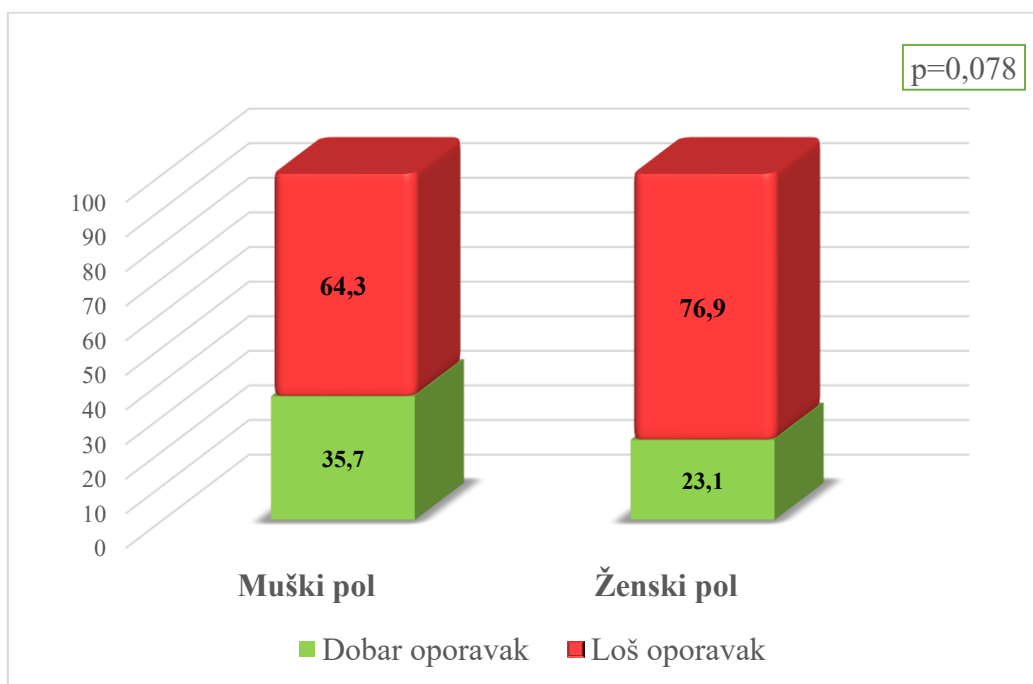
P vrednosti $< 0,05$ su izabrane kao statistički značajne.

4. REZULTATI

U našu studiju uključeno je 166 konsektivna pacijenta sa ishemijskim moždanim udarom lečenih rtPA terapijom. Od ukupnog broja pacijenata, njih četvoro (2,47%) nisu završili period praćenja (engl. follow-up) od tri meseca, što je prihvatljivo za kohortne studije i ne može uticati na validnost naših rezultata (210).

Od 166 pacijenta, nešto više od polovine, činili su pacijenti muškog pola i to njih 88 (53,0%), dok je 78 (47,0%) pacijenata bilo ženskog pola. Prosečna starost pacijenata bila je $72,05 \pm 10,10$ godina. Najmlađi pacijent imao je 18, dok je najstariji imao 92 godine. Osobe ženskog pola bile su u proseku starije ($74,36 \pm 8,62$) od osoba muškog pola ($70,00 \pm 10,90$), što predstavlja statistički značajnu razliku ($p=0,005$).

Dobar oporavak nakon rtPA terapije, na osnovu mRS, zabeležen je kod 48 (28,9%) pacijenata, dok je loš oporavak imalo 114 (68,7%) pacijenata, među kojima je 35 (21,1%) pacijenata završilo smrtnim ishodom. Nešto više od polovine svih smrtnih ishoda (51,4%) činila je intrahospitalna smrt, zabeležena kod 18 (10,8%) pacijenata. Dobar oporavak je češće registrovan kod pacijenata muškog pola, ali razlika u oporavku između polova nije dostigla statističku značajnost ($p=0,078$) (Grafikon 1). Prosečna starost osoba koje su imale dobar oporavak bila je $68,25 \pm 13,62$ godina, što je statistički značajno manja u odnosu na pacijente sa lošim oporavkom, čija je prosečna starost bila $73,49 \pm 7,88$ ($p=0,003$).



Grafikon 1. Oporavak pacijenata nakon rtPA u odnosu na pol izražen u %

Hipertenzija, kao najčešći pridruženi komorbiditet, bila je prisutna kod 160 (96,4%) pacijenta, dok je ishemijsku bolest srca imao 51 (30,7%) pacijent. Kod 24 (14,5%) pacijenata ovo je bio ponovljeni IMU. Socio-demografske karakteristike, stil života, pridruženi komorbiditeti, kao i lična istorija vaskularnih ishemijskih događaja predstavljeni su u tabeli 12.

Tabela 12. Oporavak pacijenata u odnosu na socio-demografske karakteristike, stil života, pridružene komorbiditete i ličnu istoriju vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Varijabla	Svi uključeni pacijenti N (%)	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
Pol (muški)	88 (53,0)	30 (62,5)	54 (47,4)	0,078
Starost ($\bar{x}\pm SD$)	72,05±10,10	68,25±13,62	73,49±7,88	0,003
Kardiovaskularni komorbiditeti				
Hipertenzija	160 (96,4)	45 (93,8)	112 (98,2)	0,131
Atrijalna fibrilacija	45 (27,1)	13 (27,1)	32 (28,1)	0,898
Dijabetes melitus	43 (25,9)	12 (25,0)	29 (25,4)	0,953
Ishemijska bolest srca	51 (30,7)	10 (21,3)	40 (35,1)	0,085
Srčana insuficijencija	20 (12,0)	2 (4,2)	17 (14,9)	0,052
Periferna arterijska bolest	7 (4,2)	2 (4,2)	5 (4,4)	0,950
Pušački status				
Pušači ili ex-pušači	68 (41,0)	16 (33,3)	50 (43,9)	0,213
Lična istorija bolesti				
Prethodni IMU	24 (14,5)	5 (10,4)	18 (15,8)	0,371
Prethodni TIA	20 (12,0)	7 (14,6)	11 (9,6)	0,362
Prethodni AIM	10 (6,0)	2 (4,3)	8 (7,0)	0,509

Oporavak pacijenata sa IMU lečenih trombolitičkom terapijom u odnosu na neurološke nalaze i laboratorijske i kliničke parametre pacijenata na prijemu i tokom hospitalizacije predstavljen je u tabeli 13.

Tabela 13. Oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA u odnosu na neurološke nalaze i laboratorijske parametre pacijenata na prijemu i tokom hospitalizacije

Varijabla	Svi uključeni pacijenti ($\bar{x}\pm SD$)	Dobar oporavak ($\bar{x}\pm SD$)	Loš oporavak ($\bar{x}\pm SD$)	p vrednost
Neurološki nalaz				
NIHSS na prijemu	12,23±4,99	9,63±3,73	13,32±5,05	<0,001
NIHSS nakon 24h	9,13±5,29	5,35±2,59	10,74±5,33	<0,001
NIHSS na otpustu	7,07±5,41	3,21±2,06	8,67±5,57	<0,001
mRS na otpustu	3,22±1,77	1,79±1,22	3,83±1,62	<0,001
Klinički i laboratorijski parametri na prijemu				
Sistolni krvni pritisak	158,02±26,69	155,21±27,38	159,75±26,38	0,324
Dijastolni krvni pritisak	87,93±11,52	87,19±12,46	88,79±10,84	0,413
Nivo glukoze	7,53±2,88	7,30±2,07	7,59±3,16	0,548
INR	1,13±0,18	1,13±0,24	1,13±0,15	0,841
aPTT	26,45±4,19	26,86±5,17	26,30±3,77	0,469
Urea	7,45±2,55	7,17±3,08	7,62±2,27	0,313
Kreatinin	104,04±29,13	106,54±38,12	102,93±24,77	0,480
Na ⁺	140,31±2,96	139,78±2,79	140,46±3,03	0,190
K ⁺	4,55±8,34	3,93±0,39	4,83±10,04	0,536
Trombociti	215,58±60,12	212,17±53,83	216,54±63,49	0,681
Biohemijski parametri prvog dana				
Ukupni holesterol	4,96±1,26	4,93±1,31	4,99±1,23	0,780
LDL holesterol	4,39±0,93	4,56±0,68	4,32±1,06	0,575
HDL holesterol	1,52±0,60	1,42±0,30	1,60±0,69	0,094
Trigliceridi	2,19±0,93	1,55±0,93	2,49±0,75	0,553
AST	23,67±14,57	20,37±6,54	23,88±11,95	0,072
ALT	24,07 ±19,55	22,86±13,89	23,15±15,79	0,918

Prosečan NIHSS na prijemu je bio 12,23±4,99 (opseg 4-25), 24h nakon rtPA 9,13±5,29 (opseg 1-25), a 7,07±5,41 (opseg 0-25) na otpustu iz bolnice. Postoji visoko statistički značajna razlika u vrednosti NIHSS na prijemu, 24h nakon rtPA i na otpustu iz bolnice između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom ($p<0,001$). Prosečan mRS na otpustu bio je 3,22±1,77 (opseg 0-6), dok je tri meseca nakon izlaska iz bolnice iznosio 3,08±2,04 (opseg 0-6).

Svakom pacijentu određena je i težina IMU prema inicijalnom NIHSS skor. Rezultati su prikazana u tabeli 14.

Tabela 14. Oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA u odnosu na težinu IMU

Težina IMU	NIHSS skor	Svi uključeni pacijenti N (%)	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
Lak IMU	0-4	1 (0,6)	1 (100)	0 (0)	<0,001
Umeren IMU	5-15	120 (72,3)	44 (37,6)	73 (62,4)	
Umeren do težak IMU	16-20	31 (18,7)	3 (9,7)	28 (90,3)	
Težak IMU	21-42	14 (8,4)	0 (0)	13 (100)	

Najveći broj pacijenata, njih 120 (72,3%), imalo je umeren IMU, dok je samo jedan (0,6%) pacijent imao lak IMU. Postoji visoko statistički značajna razlika u težinu IMU između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom ($p < 0,001$). Oporavak pacijenata je u obrnutoj korelaciji sa težinom IMU tj. sa težinom IMU statistički značajno opada verovatnoća za dobar oporavak.

Hemoragijska transformacija, bila je najčešći neželjeni događaj koji se javio kod 30 (18,1%) pacijenata, ali nije uticala na njihov oporavak ($p = 0,245$). Ni nakon podele hemoragijske transformacije na podgrupe, nije uočena statistički značajna razlika između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom ($p = 0,482$) (Tabela 15).

Tabela 15. Oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA u odnosu na intrakranijalni hemoragijski neželjeni događaj nakon trombolitičke terapije

Intakranijalni hemoragijski neželjeni događaji	Svi uključeni pacijenti N (%)	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
Hemoragijska transformacija ukupno	30 (18,1)	6 (12,5)	23 (20,2)	0,245
Hemoragijski infarkt tip 1	7 (4,2)	2 (4,2)	4 (3,5)	0,482
Hemoragijski infarkt tip 2	9 (5,4)	2 (4,2)	7 (6,1)	
Parenhimski hematoma tip 1	7 (4,2)	2 (4,2)	5 (4,4)	
Parenhimski hematoma tip 2	7 (4,2)	0 (0,0)	7 (6,1)	
sICH	9 (9,1)	0 (0)	9 (9,1)	0,043
Ostale intrakranijalne hemoragije	7 (4,2)	1 (14,3)	6 (85,7)	0,363

Simptomatska intrakranijalna hemoragija (sICH) je najozbiljnija komplikacija trombolitičke terapije. sICH je razvilo devet (9,1%) pacijenata koji su imali loš oporavak, pa je razlika između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom u ispoljavanju sICH statistički značajna ($p = 0,043$). Od devet pacijenata sa sICH, kod sedam (77,8%) pacijenata je zabeležena intrahospitalna smrt.

Imajući u vidu da su svi pacijenti sa parenhimskim hematomom tip 2 (PH-2) imali loš oporavak, detaljnija analiza rezultata nije ukazala na statistički značajnu povezanost pojave PH-2 sa lošim oporavkom pacijenata nakon IMU lečenog rtPA, ali sa trendom ka dostizanju značajnosti

($p=0,079$). Ni nakon grupisanja HT u kategorije hemoragijskih infarkta naspram parenhimskih hematoma, nije uočena statistička značajnost u odnosu na oporavak pacijenata ($p=0,389$).

Oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA u odnosu na ostale komplikacije trombolitičke terapije predstavljen je u tabeli 16.

Tabela 16. Oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA u odnosu na ostale neželjene događaje trombolitičke terapije

Neželjeni događaji	Svi uključeni pacijenti N (%)	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
Sistemska krvarenje	4 (2,4)	0 (0,0)	4 (3,5)	0,189
Intrahospitalna infekcija	22 (13,3)	7 (14,6)	15 (13,2)	0,809
Agitacija	9 (5,4)	1 (2,1)	8 (7,0)	0,211
Epileptički napad	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,9)	0,515
Alergijska reakcija na rtPA	4 (2,4)	1 (2,1)	3 (2,6)	0,837

Intrahospitalna infekcija zabeležena je kod 22 (13,3%) pacijenta, ali bez značaja za oporavak pacijenta. Takođe, epileptički napad zabeležen je kod jednog (0,6%) pacijenta i nije uticao na oporavak ($p=0,515$).

Nakon što se statistička značajnost za sICH i težinu IMU u odnosu na oporavak pacijenata nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom izgubila u univarijantnoj logističkoj regresionoj analizi, multivarijantna logistička regresiona analiza sa lošim oporavkom kao ishodnom varijablom uključila je starost, NIHSS skor na prijemu, 24h nakon rtPA i na otpustu kao i mRS na otpustu kao kovarijate. Rezultati multivarijantne logističke regresione analize pokazuju da starost pacijenta ($p=0,01$, OR: 1,06; 95% CI: 1,014 – 1,110) i NIHSS skor 24h nakon trombolitičke terapije ($p=0,028$; OR:1,29; 95% CI: 1,02 – 1,61) značajno utiču na oporavak pacijenata nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom. Sa svakim povećanjem godine života i NIHSS skora, povećavala se verovatnoća za lošiji oporavak pacijenta nakon IMU lečenim rtPA. Rezultati multivarijante logističke regresije sa lošim oporavkom kao ishodnom varijablom predstavljeni su u tabeli 17.

Tabela 17. Multivarijanta logistička regresiona analiza sa lošim oporavkom nakon rtPA kao ishodnom varijablom

Karakteristika	B	p vrednost	OR (95% CI)
Starost (u godinama)	0,060	0,010	1,06 (1,01-1,11)
NIHSS prijem	-0,056	0,425	0,87 (0,72-1,04)
NIHSS 24h nakon rtPA	0,252	0,028	1,29 (1,02-1,61)
NIHSS otpust	0,047	0,755	1,00 (0,73-1,38)
mRS otpust	0,463	0,087	1,70 (0,95-3,04)

4.1. REZULTATI MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA

Molekularno-genetička ispitivanja polimorfizama *PAI-1* 4G/5G (rs1799889), *ACE* I/D (rs4646994), *MMP-2* -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864), -735 C/T (rs2285053), *MMP-9* -1562 C/T (rs3918242) i *TIMP-2* -418 G/C (rs8179090) i -303 C/T (rs2277698) urađena su kod svih 166 pacijenata.

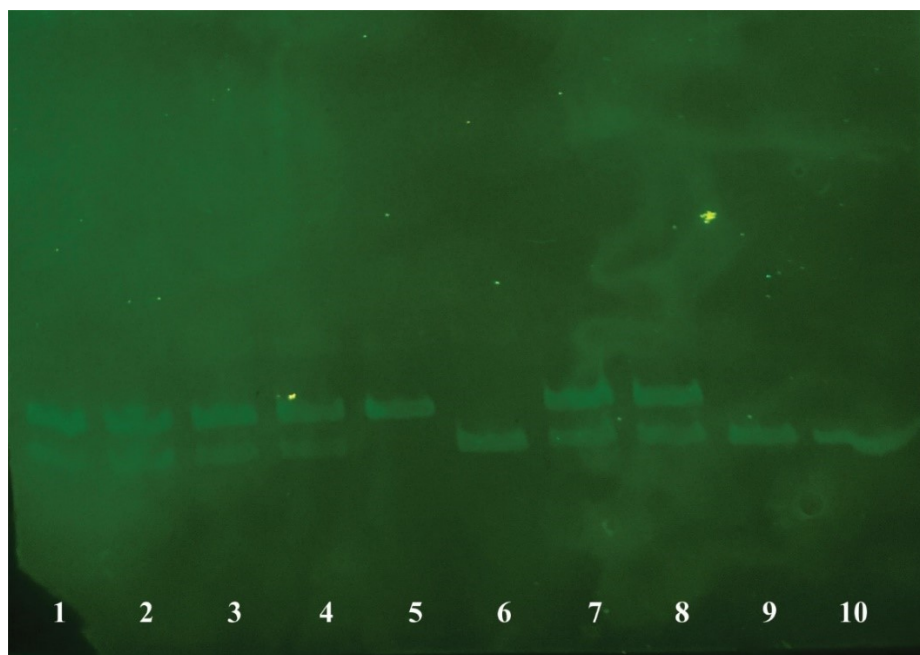
Dobijene učestalosti genotipova u izabranim polimorfizmima su u saglasnosti sa prethodno saopštenim učestalostima genotipova u NCBI bazi (engl. The National Center for Biotechnology Information- NCBI).

Asocijacije ispitivanih polimorfizama i efikasnosti rtPA terapije utvrđivane su na osnovu funkcionalnog oporavka pacijenata koristeći mRS skor tri meseca nakon IMU.

Nismo uočili odstupanje od Hardi-Vajnbergove raznoteže unutar ispitivanih polimorfizama.

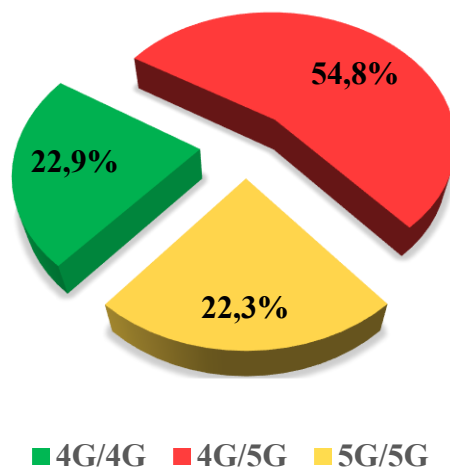
4.1.1. Rezultati ispitivanja *PAI-1* 4G/5G (rs1799889) polimorfizma

Izgled *PAI-1* 4G/5G genotipova na 8% poliakrilamidnom gelu predstavljen je na slici 26.



Slika 26. *PAI-1* 4G/5G polimorfizam – izgled traka na gelu nakon *BselI* digestije PCR produkata (kolone 1-4, 7, 8 - pacijenti sa 4G/5G genotipom; kolona 5 - pacijent sa 4G/4G genotipom; kolone 6, 9, 10 - pacijenti sa 5G/5G genotipom)

Za ispitivani 4G/5G polimorfizam *PAI-1* gena, većina pacijenata, njih 91 (54,8%) bili su heterozigoti za analizirani polimorfizam, 37 (22,3%) pacijenta su bili homozigoti za 5G alel, dok je 38 (22,9%) pacijenata imalo 4G/4G genotip. Rezultati su predstavljeni na grafikonu 2. Učestalosti alela su izračunate na osnovu učestalosti genotipova. Učestalost 4G alelne varijante je bila 50,3%, dok je učestalost 5G alela iznosila 49,7%.



Grafikon 2. Učestalost *PAI-1* 4G/5G genotipova kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Učestalosti genotipova i alela *PAI-1* 4G/5G polimorfizma, kao i udruženih genotipova po dominantnom i recesivnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije, prikazan je u tabeli 18.

Tabela 18. Učestalosti genotipova i alela *PAI-1* 4G/5G polimorfizma, kao i udruženih genotipova po dominantnom i recesivnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije

<i>PAI-1</i> 4G/5G	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
4G/4G	15 (31,3)	23 (20,2)	0,306
4G /5G	24 (50,0)	64 (56,1)	
5G/5G	9 (18,7)	27 (23,7)	
4G/4G	15 (31,3)	23 (20,2)	0,129
4G /5G + 5G/5G	33 (68,7)	91 (79,8)	
4G/4G + 4G/5G	39 (81,3)	87 (76,3)	0,490
5G/5G	9 (18,8)	27 (23,7)	
4G alel	54 (56,2)	110 (48,2)	0,223
5G alel	42 (43,8)	118 (51,8)	

Analizom dobijenih rezultata, nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova, kao ni alela *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom nakon IMU lečenog rtPA terapijom. Dobijeni rezultati nisu ukazali ni na postojanje statistički značajne razlike u distribuciji udruženih genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma po dominantnom i recesivnom modelu između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom lečenih rtPA nakon IMU.

U tabeli 19 prikazane su distribucije genotipova za 4G/5G polimorfizam *PAI-1* gena u odnosu na javljanje komplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU.

Tabela 19. Učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenata sa i bez komplikacija trombolitičke terapije

Komplikacija	<i>PAI-1</i> 4G/5G			p vrednost
	4G/4G N (%)	4G/5G N (%)	5G/5G N (%)	
Hemoragijska transformacija				0,611
Da	8 (26,7)	14 (46,7)	8 (26,7)	
Ne	30 (22,1)	77 (56,6)	29 (21,3)	
Simptomatska ICH				0,708
Da	1 (11,1)	6 (66,7)	2 (22,2)	
Ne	31 (23,0)	77 (57,0)	27 (20,0)	
Ostale intrakranijalne hemoragije				0,300
Da	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,9)	
Ne	36 (22,6)	89 (56,0)	34 (21,4)	
Sistemska krvarenje				0,035
Da	0 (0)	1 (25,0)	3 (75,0)	
Ne	38 (23,4)	90 (55,6)	34 (21,0)	
Agitacija				0,047
Da	1 (11,1)	3 (33,3)	5 (55,6)	
Ne	37 (23,6)	88 (56,1)	32 (20,3)	
Epileptički napad				0,173
Da	0 (0)	0 (0)	1 (100,0)	
Ne	38 (23,0)	91 (55,2)	36 (21,8)	
Alergija na primenjenu terapiju				0,369
Da	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	
Ne	36 (22,2)	90 (55,6)	36 (22,2)	

Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenata sa i bez HT nakon IMU lečenog rtPA terapijom ($p=0,611$). Statistički značajna razlika se ne uočava ni u učestalosti genotipova pomenutog polimorfizma između pacijenata sa različitim podtipovima HT (0,920). Dobijeni rezultati nisu ukazali ni na postojanje statistički značajne razlike u distribuciji udruženih genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma po dominantnom i recesivnom modelu između pacijenata sa i bez HT nakon IMU lečenog rtPA terapijom.

Iako se kod samo četiri pacijenta sa IMU lečenih trombolitičkom terapijom razvilo sistemsko krvarenje, postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenata sa i bez sistemskog krvarenja ($p=0,035$). Osobe kod kojih se javilo sistemsko krvarenje statistički značajno češće su imale 5G/5G genotip *PAI-1* 4G/5G polimorfizma ($p=0,035$; OR=11,294; 95% CI 1,13 - 112,04; RR=3,573). Preciznije, osobe 5G/5G genotipa imaju tri i po puta veći rizik da razviju ovu hemoragijsku komplikaciju rtPA u odnosu na osobe 4G/4G i 4G/5G genotipa. Dodatno, uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenata sa i bez agitacije nakon rtPA terapije ($p=0,047$), gde su osobe kod kojih se javila agitacija nakon trombolitičke terapije statistički značajno češće imale 5G/5G genotip ($p=0,027$; OR=4,882; 95% CI 1,24 - 19,23; RR=2,72). Verovatnoća da će se kod osoba 5G/5G genotipa nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom javiti komplikacija ove terapije u vidu agitacije je 2,7 puta veća u odnosu na osobe drugih genotipova ovog polimorfizma.

Anamnestičkim podacima za sve pacijente smo prikupili podatke o prethodnim vaskularnim ishemijskim događajima (IMU, TIA i AIM). Analiza razlike učestalosti genotipova 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena u odnosu na prisustvo prethodnog vaskularnog ishemijskog događaja predstavljena je u tabeli 20.

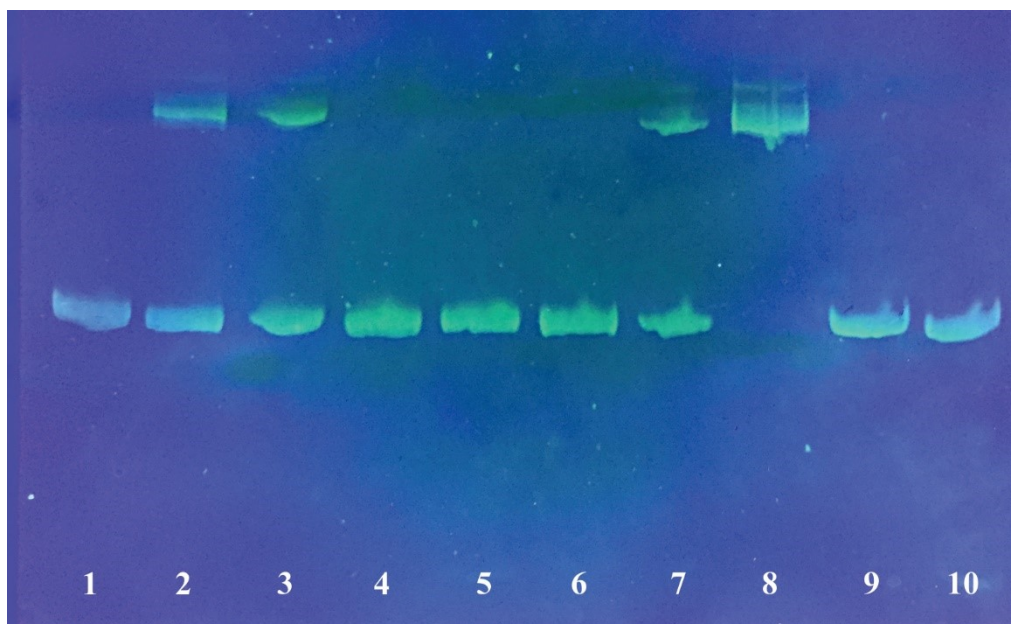
Tabela 20. Učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma u odnosu na javljanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Vaskularni ishemijski događaj		<i>PAI-1</i> 4G/5G			p vrednost
		4G/4G N (%)	4G/5G N (%)	5G/5G N (%)	
Prethodni IMU	Da	2 (8,3)	19 (79,2)	3 (12,5)	0,033
	Ne	36 (25,4)	72 (50,7)	34 (23,9)	
Prethodni TIA	Da	3 (15,0)	14 (70,0)	3 (15,0)	0,347
	Ne	35 (24,0)	77 (52,7)	34 (23,3)	
Prethodni AIM	Da	2 (20,0)	7 (70,0)	1 (10,0)	0,538
	Ne	36 (23,2)	83 (53,5)	36 (23,3)	

Postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenta sa i bez prethodnog IMU ($p=0,033$). Kako je učestalost heterozigota (4G/5G genotip) bila najveća, grupisali smo genotipove ispitivanog polimorfizma. Nakon grupisanja genotipova (4G/5G+5G/5G naspram 4G/4G genotipa), nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između pacijenata sa prethodnim IMU i bez njega ($p=0,084$; OR: 0,27; 95% CI: 0,06 - 1,19). Sa druge strane, nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenta sa i bez prethodnog TIA ili AIM.

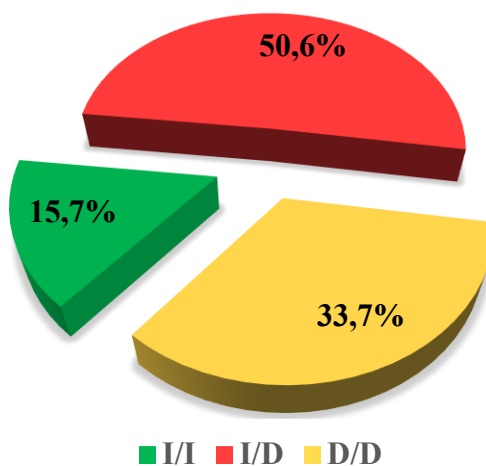
4.1.2. Rezultati ispitivanja ACE I/D (rs4646994) polimorfizama

Izgled ACE I/D genotipova na 8% poliakrilamidnom gelu predstavljen je na slici 27.



Slika 27. ACE I/D polimorfizam – izgled gela nakon razdvajanja i bojenja DNK fragmenata vertikalnom gel-elektroforezom (kolone 1, 4-6, 9 i 10 - pacijenti sa D/D genotipom; kolone 2, 3, 7 - pacijenti sa I/D genotipom; kolona 8 - pacijent sa I/I genotipom)

Kod I/D polimorfizma ACE gena, najmanji broj pacijenata je bio homozigotan za I alel (genotip I/I) i to 26 (15,7%) pacijenata. Pacijenata homozigotnih za D alel (genotip D/D) je bilo 56 (33,7%), dok je hetetrozigota (I/D genotip) bilo najviše, 84 (50,6%) (Grafikon 3). Učestalosti alela su izračunate na osnovu učestalosti genotipova, gde je učestalost I alela iznosila 40,9%, dok je učestalost D alela bila 59,1%.



Grafikon 3. Učestalosti ACE I/D genotipova kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Distribucija genotipova i alela *ACE I/D* polimorfizma, kao i udruženih genotipova po dominantnom i recesivnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije, prikazan je u tabeli 21.

Tabela 21. Učestalosti genotipova i alela *ACE I/D* polimorfizma, kao i udruženih genotipova po dominantnom i recesivnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije

<i>ACE I/D</i>	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
I/I	9 (18,8)	15 (13,2)	0,425
I/D	21 (43,8)	62 (54,4)	
D/D	18 (37,5)	37 (32,5)	
D/D	18 (37,5)	37 (32,5)	0,536
I/I+I/D	30 (62,5)	77 (67,5)	
D/D+I/D	39 (81,3)	99 (86,8)	0,360
I/I	9 (18,8)	15 (13,2)	
I alel	39 (40,6)	92 (40,3)	1,0
D alel	57 (59,4)	136 (59,6)	

Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova, kao ni alela *ACE I/D* polimorfizma između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom. Dodatno smo analizirali distribuciju udruženih genotipova *ACE I/D* polimorfizma po recesivnom i dominantnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata, međutim ni u tim slučajevima statistički značajna razlika nije dostignuta.

Distribucija genotipova *ACE I/D* polimorfizma u odnosu na pojavu hemoragijskih, ali i ostalih komplikacija rtPA terapije kod pacijenata sa IMU prikazane su u tabeli 22.

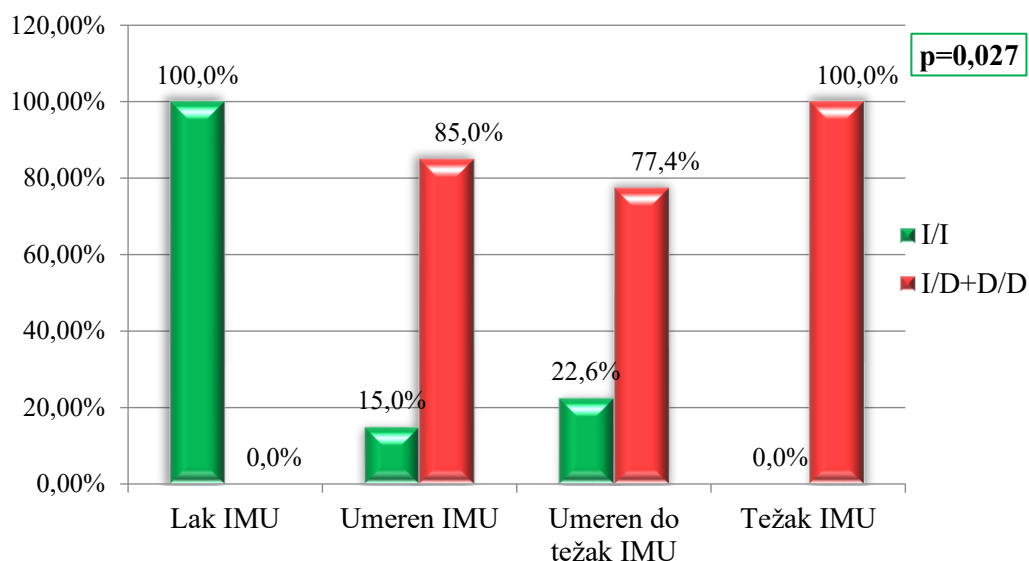
Tabela 22. Učestalosti genotipova *ACE* I/D polimorfizma u odnosu na pojavu komplikacija rtPA terapije kod pacijenata sa IMU

Komplikacija	<i>ACE</i> I/D			p vrednost
	I/I N (%)	I/D N (%)	D/D N (%)	
Hemoragijska transformacija				0,272
Da	7 (23,3)	16 (53,3)	7 (23,3)	
Ne	19 (14,0)	68 (50,0)	49 (36,0)	
Simptomatska ICH				0,672
Da	2 (22,2)	5 (55,6)	2 (22,2)	
Ne	20 (14,8)	67 (49,6)	48 (35,6)	
Ostale intrakranijalne hemoragije				0,938
Da	1 (14,3)	4 (57,1)	2 (28,6)	
Ne	25 (15,7)	80 (50,3)	54 (34,0)	
Sistemske krvarenje				0,018
Da	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	
Ne	26 (16,0)	84 (51,9)	52 (32,1)	
Agitacija				0,711
Da	2 (22,2)	5 (55,6)	2 (22,2)	
Ne	24 (15,3)	79 (50,3)	54 (34,4)	
Epileptički napad				0,612
Da	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)	
Ne	26 (15,8)	83 (50,3)	56 (33,9)	
Alergija na primenjenu terapiju				0,107
Da	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0)	
Ne	24 (14,8)	82 (50,6)	56 (34,6)	

Uprkos maloj učestalosti sistemskog krvarenja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA, uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *ACE* I/D polimorfizma između pacijenata sa i bez sistemskog krvarenja nakon rtPA terapije ($p=0,018$). Svi pacijenti koji su ispoljili sistemsko krvarenje imali su D/D genotip ($p=0,013$; RR=3,038; 95% CI: 2,49 - 3,89). Postoji tri puta veći rizik da će se kod osoba D/D genotipa nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom razviti sistemsko krvarenje u odnosu na druge genotipove ovog polimorfizma.

Sa druge strane, nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *ACE* I/D polimorfizma između pacijenata sa i bez hemoragijske transformacije nakon trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU ($p=0,272$), kao ni između pacijenata sa različitim podtipom hemoragijske transformacije ($p=0,686$). Takođe, nije uočena statistička značajna razlika u učestalosti genotipova pomenutog polimorfizma između pacijenata sa i bez sICH ($p=0,067$). Ni analizom učestalosti udruženih genotipova *ACE* I/D polimorfizma po recesivnom i dominantnom modelu u odnosu na komplikacije rtPA terapije nije zabeležena statistički značajna razlika.

Dodatno smo posmatrali distribuciju genotipova udruženih po recesivnom modelu za *ACE* I/D polimorfizam (I/I genotip naspram I/D+D/D genotipova) u odnosu na težinu IMU. Rezultati su ilustrovani na grafikonu 4.



Grafikon 4. Učestalosti udruženih genotipova po recesivnom modelu za *ACE* I/D polimorfizam u odnosu na težinu IMU

Analizom rezultata prikazanih na grafikonu 4 uočena je statistički značajna razlika u učestalosti udruženih genotipova po recesivnom modelu *ACE* I/D polimorfizma (I/D i D/D genotipovi naspram I/I genotipa) u odnosu na težinu IMU ($p=0,027$). Međutim, iako su svi pacijenti sa teškim IMU imali bar jedan alel D, nakon regresione analize, statistički značajna povezanost D/D genotipa sa težinom IMU nije potvrđena ($p=0,308$; OR=1,49; 95% CI 0,70 - 3,18).

Ispitivanje uticaja genotipova *ACE* I/D polimorfizma na javljanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA predstavljeni su u tabeli 23.

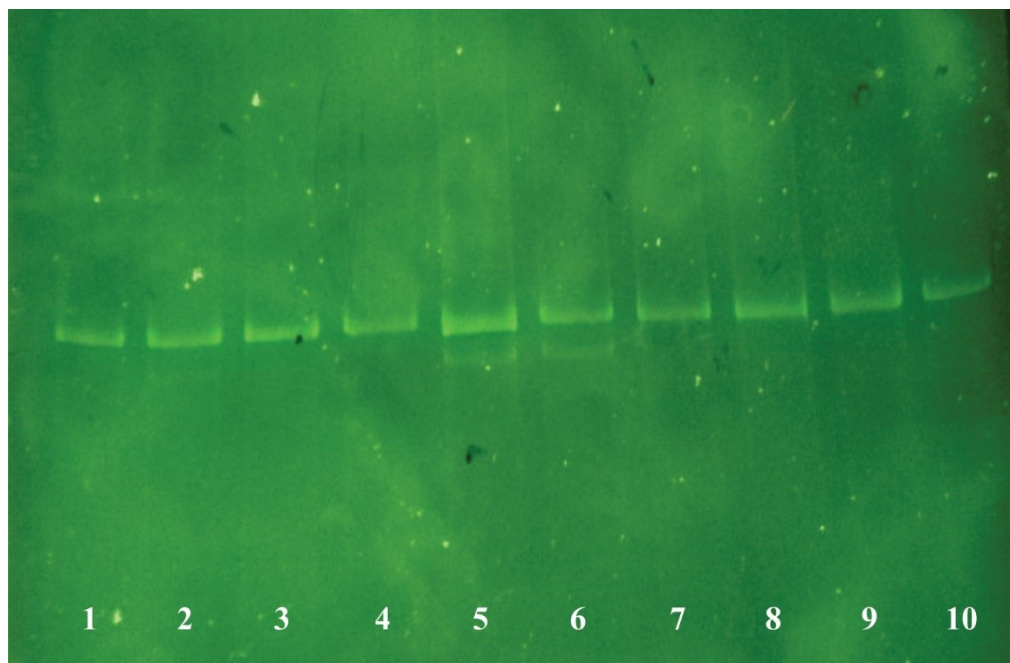
Tabela 23. Učestalost genotipova *ACE* I/D polimorfizma u odnosu na javljanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Vaskularni ishemijski događaj	<i>ACE</i> I/D			p vrednost
	I/I N (%)	I/D N (%)	D/D N (%)	
Prethodni IMU				0,158
Da	5 (20,8)	15 (62,5)	4 (16,7)	
Ne	21 (14,8)	69 (48,6)	52 (36,6)	
Prethodni TIA				0,129
Da	6 (30,0)	7 (35,0)	7 (35,0)	
Ne	20 (13,7)	77 (52,7)	49 (33,6)	
Prethodni AIM				0,650
Da	2 (20,0)	6 (60,0)	2 (20,0)	
Ne	24 (15,5)	78 (50,3)	53 (34,2)	

Rezultati predstavljeni u tabeli 23 ukazuju da nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *ACE* I/D polimorfizma između pacijenata sa prethodnim vaskularnim ishemijskim događajem i bez njega. Statistički značajna razlika nije uočena ni nakon grupisanja genotipova po recesivnom, ni po dominantnom modelu.

4.1.3. *Rezultati ispitivanja polimorfizama -1575 G/A (rs243866), -1306 C/T (rs243865), -790 T/G (rs243864) i -735 C/T (rs2285053) MMP-2 gena*

Izgled *MMP-2* -735 C/T genotipova na 8% poliakrilamidnom gelu predstavljen je na slici 28.



Slika 28. *MMP-2* -735 C/T polimorfizam – izgled gela nakon *HinfI* digestije PCR produkata (kolone 1-4 i 7-10 - pacijenti sa CC genotipom; kolone 5 i 6 - pacijenti sa CT genotipom)

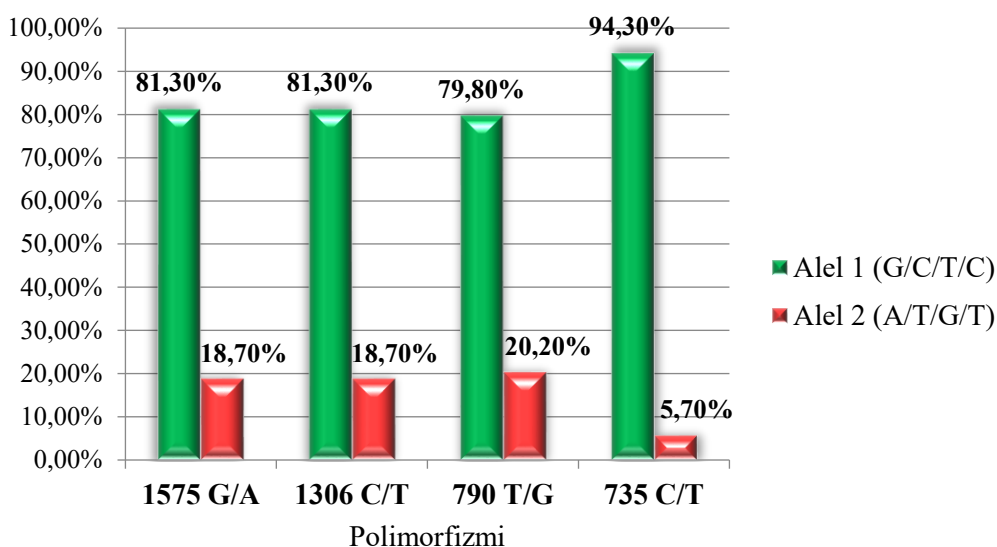
Unutar *MMP-2* gena analizirali smo četiri polimorfizma (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053). Analizirani polimorfizmi nalaze se u linkidž disekvilibrijumu (engl. linkage disequilibrium- LD), pa je za njih dodatno urađena analiza haplotipova.

Za ispitivani *MMP-2* -1575 G/A polimorfizam, najmanji broj pacijenata, njih petoro (3,0%) je bilo homozigotno za ređi alel A (genotip AA). Ukupno 109 (65,7%) pacijenata je bilo GG genotipa. Heterozigota (genotip GA) je bilo 52 (31,3%).

Za ispitivani -1306 C/T polimorfizam, najveći broj pacijenata, njih 109 (65,7%) bilo je homozigotan za C alel (CC genotip), sa druge strane najmanji broj pacijenata, njih petoro (3,0%) je bilo homozigotno za ređi alel T. Ukupno 52 (31,3%) pacijenata su bili heterozigoti (genotip CT).

Za analizirani *MMP-2* -790 T/G polimorfizam, 107 (64,5%) pacijenata su bili homozigoti za alel T (genotip TT). Pacijenata sa TG genotipom je bilo 51 (30,7%), dok je najmanje bilo pacijenata sa GG genotipom, njih 8 (4,8%).

Nijedan pacijent nije bio homozigot za ređi T alel u ispitivanom -735 C/T polimorfizmu *MMP-2* gena. Njih 147 (88,6%) su bili homozigoti za C alel (CC genotip), dok je 19 (11,4%) pacijenata bilo heterozigot (CT genotip) za ispitivani polimorfizam. Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su učestalosti alela za sve polimorfizme i one su prikazane na grafikonu 5.



Grafikon 5. Učestalosti alela u ispitivanim polimorfizmima *MMP-2* gena

Učestalosti alela, pojedinačnih i udruženih genotipova po dominantnom i recesivnom modelu analiziranih polimorfizama *MMP-2* gena u odnosu na oporavak pacijenata nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom prikazani su u tabeli 24.

Tabela 24. Učestalosti genotipova i alela izabranih polimorfizama *MMP-2* gena, kao i učestalosti genotipova udruženih po dominantnom i recesivnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije

<i>MMP-2</i> polimorfizmi	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
-1575 G/A			
GG	31 (64,6)	75 (65,8)	0,875
GA	15 (31,2)	36 (31,6)	
AA	2 (4,2)	3 (2,6)	
GG	17 (35,4)	39 (34,2)	0,883
GA+AA	31 (64,4)	75 (65,8)	
GG+GA	46 (95,8)	111 (97,4)	0,606
AA	2 (4,2)	3 (2,6)	
G alel	77 (80,2)	186 (81,6)	0,876
A alel	19 (19,8)	42 (18,4)	
-1306 C/T			
CC	31 (64,6)	75 (65,8)	0,875
CT	15 (31,2)	36 (31,6)	
TT	2 (4,2)	3 (2,6)	
CC	17 (35,4)	39 (34,2)	0,883
CT+TT	31 (64,4)	75 (65,8)	
CC+CT	46 (95,8)	111 (97,4)	0,606
TT	2 (4,2)	3 (2,6)	
C alel	77 (80,2)	186 (81,6)	0,876
T alel	19 (19,8)	42 (18,4)	
-790 T/G			
TT	31 (64,6)	73 (64,0)	0,859
TG	14 (29,2)	36 (31,6)	
GG	3 (6,3)	3 (6,3)	
TT	31 (64,6)	73 (64,0)	0,947
TG+GG	17 (35,4)	41 (36,0)	
TT+TG	45 (93,8)	5 (95,6)	0,617
GG	3 (6,3)	5 (4,4)	
T alel	76 (79,2)	182 (81,2)	0,758
G alel	20 (20,8)	42 (18,8)	
-735 C/T			
CC	42 (87,5)	101 (88,6)	0,843
CT	6 (12,5)	13 (11,4)	
C alel	90 (93,8)	215 (94,3)	1,0
T alel	6 (6,2)	13 (5,7)	

Interpretacijom dobijenih rezultata za ispitivane polimorfizme *MMP-2* gena utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova, kao ni alela između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom. Razlika se ne uočava ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom ili recesivnom modelu.

Takođe, analizirali smo uticaje genotipova svih ispitivanih polimorfizama *MMP-2* gena u odnosu na pojavu komplikacija trombolitičke terapije.

Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova ni za jedan od ispitivanih polimorfizama *MMP-2* gena između pacijenata sa i bez komplikacija rtPA terapije. Učestalosti genotipova *MMP-2* -1575 G/A i -1306 C/T polimorfizama u odnosu na prisutne komplikacije trombolitičke terapije prikazane su u tabeli 25. U tabeli 26 su prikazane učestalosti genotipova -790 T/G polimorfizma u odnosu na komplikacije izazvane rtPA terapijom, dok su u tabeli 27 predstavljene za -735 C/T polimorfizam. Statistički značajna razlika se ne uočava ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom ili recesivnom modelu ni za jedan polimorfizam.

Tabela 25. Učestalosti genotipova 1575 G/A i -1306 C/T *MMP-2* polimorfizama u odnosu na pojavu komplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU

Komplikacija	<i>MMP-2</i> -1575 G/A / -1306 C/T			p vrednost
	GG/ CC N (%)	GA/CT N (%)	AA/TT N (%)	
Hemoragijska transformacija				
Da	22 (73,3)	8 (26,7)	0 (0)	0,431
Ne	87 (64,0)	44 (32,4)	5 (3,7)	
Simptomatska ICH				
Da	6 (66,7)	3 (33,3)	0 (0)	0,841
Ne	87 (64,4)	43 (31,9)	5 (3,7)	
Ostale intrakranijalne hemoragije				
Da	3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0)	0,308
Ne	106 (66,7)	48 (30,2)	5 (3,1)	
Sistemska krvarenje				
Da	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0,342
Ne	105 (64,8)	52 (32,1)	5 (3,1)	
Agitacija				
Da	7 (77,8)	2 (22,2)	0 (0)	0,687
Ne	102 (65,0)	50 (31,8)	5 (3,2)	
Epileptički napad				
Da	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0,769
Ne	108 (65,5)	52 (31,5)	5 (3,0)	
Alergija na primenjenu terapiju				
Da	1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0)	0,161
Ne	108 (66,7)	49 (30,2)	5 (3,1)	

Dodatnim analizama nije uočena ni statistički značajna razlika u učestalosti genotipova -1575 G/A i -1306 C/T *MMP-2* polimorfizama između pacijenata sa različitim podtipovima hemoragijske transformacije ($p=0,664$). Ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom, odnosno recesivnom modelu nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova pomenutih polimorfizama između pacijenata sa i bez komplikacija trombolitičke terapije nakon IMU.

Sa druge strane, svih sedam pacijanata sa parenhimskih hematomom tip 1 je imalo bar jedan alel A -1575 G/A polimorfizma (GA i AA genotipovi), odnosno T alel -1306 C/T polimorfizma (CT i TT genotipovi), međutim statistička značajnost se nije dostigla ($p=0,051$).

Tabela 26. Učestalosti genotipova *MMP-2* -790 T/G polimorfizma u odnosu na pojavu komplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU

Komplikacija	<i>MMP-2</i> -790 T/G			p vrednost
	TT N (%)	TG N (%)	GG N (%)	
Hemoragijska transformacija				0,531
Da	22 (73,3)	7 (23,3)	1 (3,4)	
Ne	85 (62,5)	44 (32,4)	7 (5,1)	
Simptomatska ICH				0,782
Da	6 (66,7)	3 (33,3)	0 (0)	
Ne	85 (63,0)	43 (31,9)	7 (5,2)	
Ostale intrakranijalne hemoragije				0,281
Da	3 (42,9)	4 (57,1)	0 (0)	
Ne	104 (65,4)	47 (29,6)	8 (5,0)	
Sistemske krvarenje				0,323
Da	4 (100)	0 (0)	0 (0)	
Ne	103 (63,6)	51 (31,5)	8 (4,9)	
Agitacija				0,624
Da	7 (77,8)	2 (22,2)	0 (0)	
Ne	100 (63,7)	49 (31,2)	8 (5,1)	
Epileptički napad				0,758
Da	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	
Ne	106 (64,2)	51 (30,9)	8 (4,8)	
Alergija na primenjenu terapiju				0,084
Da	1 (25,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	
Ne	106 (65,4)	49 (30,2)	7 (4,4)	

Kao i kod prethodna dva ispitivana polimorfizma *MMP-2* gena, ni u slučaju -790 T/G *MMP-2* polimorfizma nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između pacijenata sa različitim podtipovima hemoragijske transformacije ($p=0,467$). Dodatno smo analizirali distribuciju udruženih genotipova *MMP-2* -790 T/G polimorfizma po recesivnom i dominantnom modelu u odnosu na javljanje komplikacija trombolitičke terapije, međutim ni u tim slučajevima statistički značajna razlika nije uočena.

Međutim, postoji statistički značajna razlika u učestalosti grupisanih genotipova po recesivnom modelu *MMP-2* -790 T/G polimorfizma (TT genotip naspram TG+GG genotipova) između pacijenata sa parenhimskim hematoma tip 1 i bez njega ($p=0,045$). Svih sedam pacijenata sa PH-1 imalo je TT genotip ispitivanog polimorfizma, međutim nakon analize odnosa šansi i rizika, ova značajnost se ne potvrđuje.

Tabela 27. Učestalosti genotipova *MMP-2* -735 C/T polimorfizma u odnosu na pojavu komplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU

Komplikacija	<i>MMP-2</i> -735 C/T		p vrednost
	CC N (%)	CT N (%)	
Hemoragijska transformacija			
Da	27 (90,0)	3 (10,0)	0,783
Ne	120 (88,2)	16 (11,8)	
Simptomatska ICH			
Da	9 (100,0)	0 (0)	0,273
Ne	119 (88,1)	16 (11,9)	
Ostale intrakranijalne hemoragije			
Da	7 (100,0)	0 (0)	0,331
Ne	140 (88,1)	19 (11,9)	
Sistemske krvarenje			
Da	3 (75,0)	1 (25,0)	0,389
Ne	144 (88,9)	18 (11,1)	
Agitacija			
Da	7 (77,8)	2 (22,2)	0,296
Ne	140 (89,2)	17 (10,8)	
Epileptički napad			
Da	1 (100,0)	0 (0)	0,718
Ne	146 (88,5)	19 (11,5)	
Alergija na primenjenu terapiju			
Da	4 (100,0)	0 (0)	0,467
Ne	143 (88,3)	19 (11,7)	

Iako su svi pacijenti sa nekom drugom intrakranijalnom hemoragijom, kao i simptomatskom ICH imali CC genotip -735 C/T *MMP-2* polimorfizma, statistička značajna razlika u učestalosti genotipova -735 C/T *MMP-2* polimorfizma između pacijenata sa i bez intrakranijalne hemoragije, kao i između pacijenata sa i bez sICH nije dostignuta ($p=0,331$, $p=0,273$, respektivno). Ne uočava se ni statistički značajna razlika u učestalosti genotipova -735 C/T *MMP-2* polimorfizma između pacijenata sa različitim podtipovima hemoragijske transformacije ($p=0,854$).

Dodatno smo za sve odabrane polimorfizme *MMP-2* gena analizirali distribuciju njihovih genotipova u odnosu na postojanje prethodnog vaskularnog ishemijskog događaja. U tabeli 28

predstavljani su rezultati za -1575 G/A i -1306 C/T *MMP-2* polimorfizme, u tabeli 29 za *MMP-2* -790 T/G polimorfizam, dok su u tabeli 30 za *MMP-2* -735 C/T polimorfizam.

Tabela 28. Distribucija genotipova *MMP-2* -1575 G/A i -1306 C/T polimorfizama u odnosu na postojanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Vaskularni ishemijski događaj		<i>MMP-2</i> -1575 G/A / -1306 C/T			p vrednost
		GG/ CC N (%)	GA/CT N (%)	AA/TT N (%)	
Prethodni IMU					0,002
Da		9 (37,5)	15 (62,5)	0 (0)	
Ne		100 (70,4)	37 (26,1)	5 (3,5)	
Prethodni TIA					0,776
Da		12 (60,0)	7 (35,0)	1 (5,0)	
Ne		97 (66,5)	45 (30,8)	4 (2,7)	
Prethodni AIM					0,839
Da		7 (70,0)	3 (30,0)	0 (0)	
Ne		102 (65,8)	48 (31,0)	5 (3,2)	

Uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova -1575 G/A i -1306 C/T *MMP-2* polimorfizama između pacijenata sa prethodnim ishemijskim moždanim udarom i bez njega ($p=0,002$). Osobe kojima je ovo bio ponovljeni IMU statistički značajno ređe su imale GG genotip -1575 G/A polimorfizma ili CC genotip -1306 C/T polimorfizma ($p=0,003$; OR=0,252; 95% CI 0,102 – 0,620; RR=0,53). Sa druge strane, statistička značajnost nije uočena u učestalosti genotipova -1575 G/A i -1306 C/T *MMP-2* polimorfizama između pacijenata sa i bez prethodnog AIM i TIA, ni nakon grupisanja genotipova po recesivnom, ni po dominantnom modelu.

Tabela 29. Distribucija genotipova *MMP-2* -790 T/G polimorfizma u odnosu na postojanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Vaskularni ishemijski događaj		<i>MMP-2</i> -790 T/G			p vrednost
		TT N (%)	TG N (%)	GG N (%)	
Prethodni IMU					0,026
Da		10 (41,7)	13 (54,2)	1 (4,1)	
Ne		97 (68,3)	38 (26,8)	7 (4,9)	
Prethodni TIA					0,621
Da		11 (55,0)	8 (40,0)	1 (5,0)	
Ne		96 (65,8)	43 (29,5)	7 (4,8)	
Prethodni AIM					0,780
Da		7 (70,0)	3 (30,0)	0 (0)	
Ne		100 (64,5)	48 (30,8)	7 (4,5)	

Postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova -790 T/G *MMP-2* polimorfizma između pacijenata sa i bez prethodnog IMU ($p=0,026$). Osobe koje su imale prethodni IMU statistički značajno ređe su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma ($p=0,019$; OR=0,331; 95% CI 0,136 -

0,803; RR=0,61). Statistička značajnost nije uočena u učestalosti genotipova -790 T/G polimorfizma između pacijenata sa i bez prethodnog AIM i TIA, ni nakon grupisanja genotipova po recesivnom, ni po dominantnom modelu.

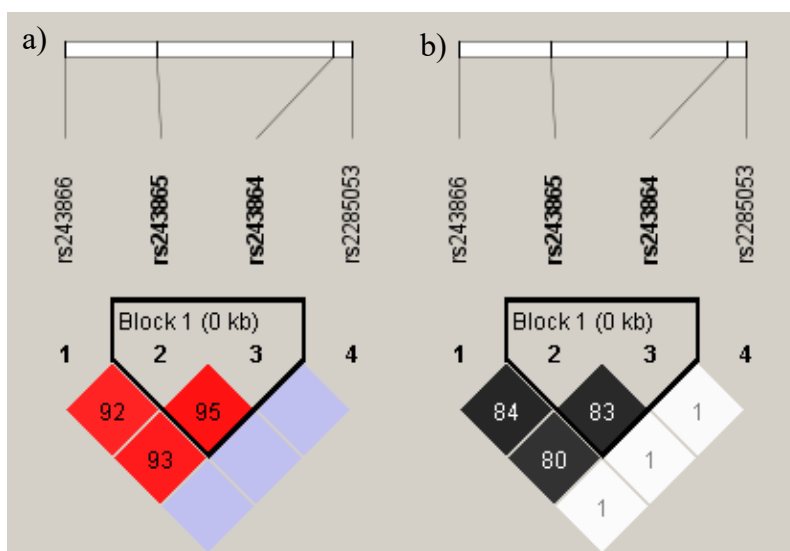
Tabela 30. Distribucija genotipova -735 C/T *MMP-2* polimorfizma u odnosu na postojanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Vaskularni ishemijski događaj		<i>MMP-2</i> -735 C/T		p vrednost
		CC N (%)	CT N (%)	
Prethodni IMU	Da	20 (83,3)	4 (16,7)	0,385
	Ne	127 (89,4)	15 (10,6)	
Prethodni TIA	Da	18 (90,0)	2 (10,0)	0,829
	Ne	129 (88,4)	17 (11,6)	
Prethodni AIM	Da	8 (80,0)	2 (20,0)	0,386
	Ne	138 (89,0)	17 (11,0)	

Rezultati predstavljeni u tabeli 30 ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova *MMP-2* -735 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja, kao ni nakon grupisanja genotipova po recesivnom, ni po dominantnom modelu.

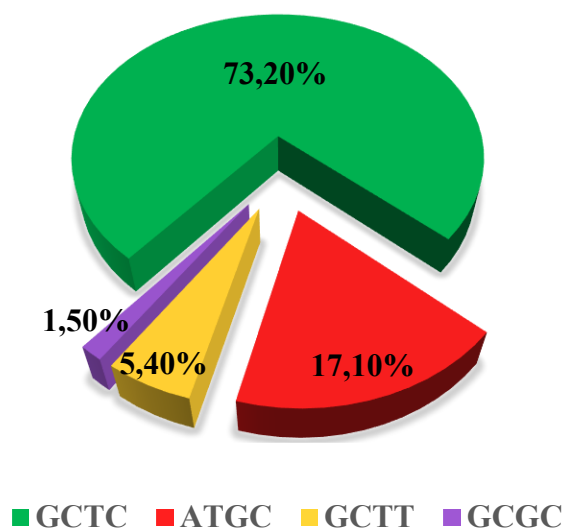
4.1.3.1. Analiza haplotipova izabranih polimorfizama *MMP-2* gena (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053)

S obzirom da se analizirani polimorfizmi *MMP-2* gena nalaze u linkidž disekvilibrirumu, za njih smo dodatno uradili analizu haplotipova. Dobijene D' i r^2 vrednosti predstavljene su na slici 29. Postojanje jakog haplotipskog bloka utvrđeno je između polimorfizama -1306 C/T (rs243865) i -790 T/G (rs243864) *MMP-2* gena koristeći „Confidence intervals LD (Gabriel et al)“ metode. Učestalosti svih analiziranih haplotipova ne odsupaju od Hardi-Vajnbergovog ekvilibrijuma.



Slika 29. Vrednosti a) D' i b) r^2 analiziranih *MMP-2* polimorfizama. a) Intenzitet crvene boje i brojevi u poljima pokazuju vrednosti D' (intenzivno crvena boja označava $D'=100\%$ sa $LOD>2$, smanjenje intenziteta boje ukazuje na smanjenje vrednosti D'). b) Nijanse sive boje i brojevi u poljima pokazuju vrednosti r^2 (tamnije sivo označava veće vrednosti r^2).

Na osnovu dobijenih rezultata vezanih za prisustvo ispitivanih polimorfizama u genu za *MMP-2*, kod ukupno 166 pacijenata sa IMU lečenih rtPA, utvrđeni su haplotipovi i njihova učestalost. Rezultati analize su ilustrovani na grafikonu 6.



Grafikon 6. Haplotipovi i njihova učestalost kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA dobijenih na osnovu analiziranih polimorfizama u genu za *MMP-2*

Za 162 pacijenata smo imali podatke o oporavku tri meseca nakon IMU i za njih je urađena analiza haplotipova. Rezultati su predstavljeni su tabeli 31.

Tabela 31. Učestalosti haplotipova izabranih polimorfizama *MMP-2* gena (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije

Haplotip	Dobar oporavak (%)	Loš oporavak (%)	p vrednost
GCTC	73,5	72,8	0,981
ATGC	19,2	16,2	0,439
GCTT	5,6	5,3	0,725
GCGC	1,0	1,7	0,627
GTGC		1,4	

Analizom rezultata, nismo uočili statistički značajnu razliku u učestalosti haplotipova izabranih polimorfizama *MMP-2* gena između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom.

Rezultati ispitivanja haplotipova polimorfizama *MMP-2* gena (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) u odnosu na pojavu hemoragijskih komplikacija trombolitičke terapije su predstavljeni u tabeli 32.

Tabela 32. Učestalosti haplotipova izabranih polimorfizama *MMP-2* gena (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) u odnosu na hemoragijske komplikacije trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU

Hemoragijske komplikacije rtPA	<i>MMP-2</i> haplotipovi (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053)			
	GCTC (%)	ATGC (%)	GCTT (%)	GCGC (%)
Hemoragijska transformacija (ukupno)				
Da	78,3	13,3	5,0	1,7
Ne	72,0	18,0	5,5	1,5
p vrednost	0,319	0,382	0,875	0,929
Hemoragijski infarkt tip 1				
Da	71,4	21,4	7,1	/
Ne	73,2	16,9	5,3	1,6
p vrednost	0,879	0,664	0,770	0,636
Hemoragijski infarkt tip 2				
Da	83,3	11,1	/	5,6
Ne	72,6	17,5	5,7	1,3
p vrednost	0,317	0,477	0,296	0,159
Parenhimski hematoma tip 1				
Da	87,5	/	12,5	/
Ne	72,3	17,9	5,3	1,6
p vrednost	0,09	0,09	0,77	0,636
Parenhimski hematoma tip 2				
Da	64,3	21,4	7,1	/
Ne	73,6	16,9	5,3	1,6
p vrednost	0,442	0,664	0,77	0,636
sICH				
Da	83,3	16,7	/	/
Ne	72,6	17,2	5,7	1,6
p vrednost	0,478	0,727	0,269	0,565
Ostale intrakranijalne hemoragije				
Da	71,4	28,6	/	/
Ne	73,2	16,6	5,7	1,6
p vrednost	0,879	0,247	0,360	0,636
Sistemska krvarenje				
Da	80,0	/	20,0	/
Ne	72,8	17,6	5,2	1,5
p vrednost	0,354	0,193	0,370	0,723

Analizom rezultata iz tabele 32 uočeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti haplotipova (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) *MMP-2* gena i pojave hemoragijskih komplikacija nakon trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU. Iako je učestalost parenhimskog hematoma tip 1 najveća kod osoba GCTC haplotipa, statistička značajnost nije dostignuta ($p=0,09$).

Dodatno smo izvršili analizu *MMP-2* haplotipova (rs243866, rs243865, rs243864) u odnosu na javljanje parenhimskog hematoma tip 1. Rezultati su predstavljeni u tabeli 33.

Tabela 33. Učestalosti haplotipova izabranih polimorfizama *MMP-2* gena (rs243866, rs243865, rs243864) u odnosu na pojavu parenhimskog hematoma tip 1 nakon trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU

Hemoragijske komplikacije rtPA	<i>MMP-2</i> haplotipovi (rs243866, rs243865, rs243864)		
	GCT (%)	ATG (%)	GCG (%)
Parenhimski hematom tip 1			
Da	100	/	/
Ne	77,6	17,9	1,6
p vrednost	0,046	0,08	0,636

Svi pacijenti kod kojih se formirao parenhimski hematom tip 1, kao komplikacija trombolitičke terapije, imali su GCT haplotip (rs243866, rs243865, rs243864), što je statistički značajno češće u odnosu na pacijente koji nisu razvili ovu hemoragijsku komplikaciju rtPA terapije ($p=0,046$).

Distribucija haplotipova (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) *MMP-2* gena u odnosu na pojavu nehemoragijskih komplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa ishemijskim moždanim udarom predstavljena je u tabeli 34.

Tabela 34. Učestalost haplotipova izabranih polimorfizama *MMP-2* gena (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) u odnosu na pojavu nehemoragijskih komplikacija rtPA terapije kod pacijenata sa IMU

Nehemoragijske komplikacije rtPA	<i>MMP-2</i> haplotipovi (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053)			
	GCTC (%)	ATGC (%)	GCTT (%)	GCGC (%)
Agitacija				
Da	77,8	11,1	11,1	/
Ne	72,9	17,5	5,1	1,6
p vrednost	0,650	0,485	0,272	0,589
Alergija na primenjenu terapiju				
Da	50,0	37,0	0,5	12,5
Ne	73,7	16,6	5,6	1,2
p vrednost	0,134	0,127	0,493	0,011

Analiza podataka iz tabele 34 pokazala je da su osobe kod kojih se razvila alergijska reakcija na rtPA statistički značajno češće imale GCGC haplotip ($p=0,011$).

Zbog malih učestalosti, analiza uticaja haplotipova (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) *MMP-2* gena na pojavu epileptičkih napada nakon rtPA terapije nije urađena.

Sprovedena je i dodatna analiza haplotipova (rs243866, rs243865, rs243864) *MMP-2* gena u odnosu na pojavu alergijske reakcije nakon rtPA. Rezultati su napisani u tabeli 35.

Tabela 35. Učestalost haplotipova izabranih polimorfizama *MMP-2* gena (rs243866, rs243865, rs243864) u odnosu na pojavu alergijskih reakcija na trombolitičku terapiju kod pacijenata sa IMU

Nehemoragijske komplikacije rtPA	<i>MMP-2</i> haplotipovi (rs243866, rs243865, rs243864)		
	GCT (%)	ATG (%)	GCG (%)
Alergija na primenjenu terapiju			
Da	50,0	37,5	12,5
Ne	79,3	16,6	1,2
p vrednost	0,046	0,127	0,01

Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da su osobe kod kojih se javila alergijska reakcija nakon trombolitičke terapije statistički značajno češće imale GCG haplotip (rs243866, rs243865, rs243864) *MMP-2* gena ($p=0,01$) i statistički značajno ređe imale GCT haplotip (rs243866, rs243865, rs243864) *MMP-2* gena od osoba bez alergijske reakcije nakon rtPA terapije.

Takođe smo analizirali distribuciju *MMP-2* haplotipova (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) u odnosu na prisustvo prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja (IMU, TIA, AIM) (Tabela 36).

Tabela 36. Učestalost *MMP-2* haplotipova (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053) u odnosu na prisustvo prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja

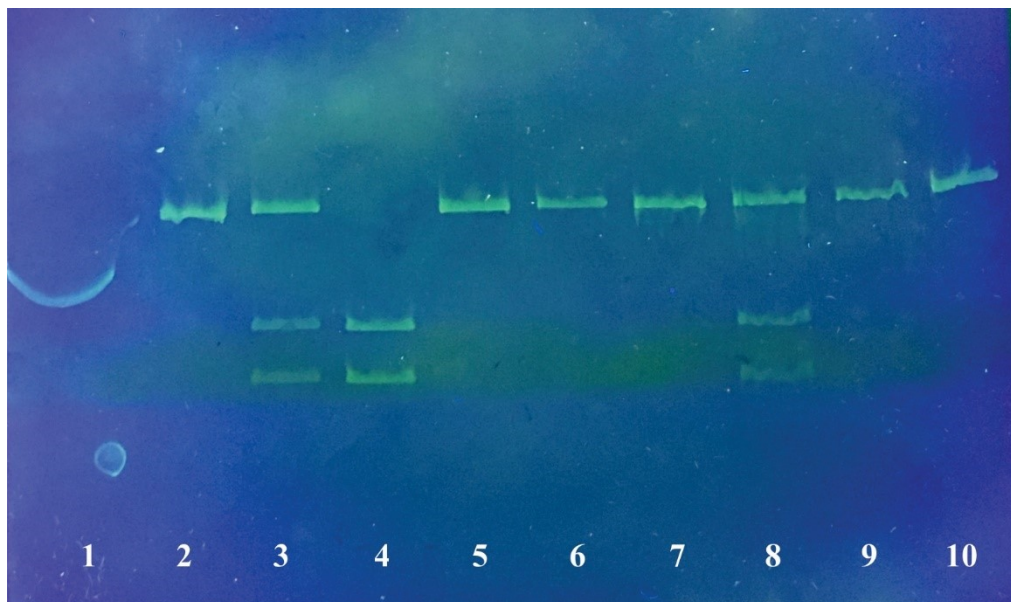
Neželjeni ishemijski događaj	<i>MMP-2</i> haplotipovi (rs243866, rs243865, rs243864, rs2285053)						
	GCTC (%)	ATGC (%)	GCTT (%)	ACGC (%)	GCGC (%)	ATTT (%)	GTGC (%)
Prethodni IMU							
Da	60,4	25,0	6,3	4,2	2,1	2,1	/
Ne	75,3	15,8	5,3	/	1,4	/	1,1
p vrednost	0,029	0,121	0,783		0,703		
Prethodni TIA							
Da	70,0	20,0	5,0	2,5	2,5	/	/
Ne	73,6	16,8	5,5	/	1,4	/	1,0
p vrednost	0,623	0,609	0,901		0,562		
Prethodni AIM							
Da	75,0	15,0	10,0	/	/	/	/
Ne	73,5	17,0	5,2	/	1,3	/	1,0
p vrednost	0,884	0,819	0,365		0,607		

Analizom rezultata predstavljenih u tabeli 36 uočili smo da su pacijenti kojima je ovo bio rekurentni IMU statistički značajno ređe imali GCTC haplotip (75,3% prema 60,4%, $p=0,029$). Sa

druge strane, deluje da je ATGC haplotip faktor rizika za ponovni IMU, ali statistička značajnost se nije dostigla ($p=0,121$).

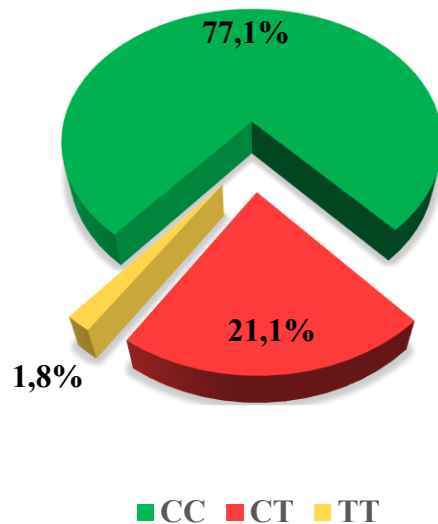
4.1.4. Rezultati ispitivanja *MMP-9* -1562 C/T (*rs3918242*) polimorfizma

Izgled *MMP-9* -1562 C/T genotipova na 8% poliakrilamidnom gelu prikazan je na slici 30.



Slika 30. *MMP-9* -1562 C/T polimorfizam – izgled gela nakon *SphI* digestije PCR produkata (kolone 2, 5-7, 9 i 10 - pacijenti sa CC genotipom; kolone 3 i 8 - pacijenti sa CT genotipom; kolona 4 - pacijent sa TT genotipom)

Kod analiziranog *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma, čak 128 (77,1%) pacijenta su bili homozigoti za C alel (CC genotip). Heterozigota je bilo njih 35 (21,1%) (genotip CT), dok je najmanji broj pacijenata bio homozigotan za T alel, njih troje (1,8%) (Grafikon 7). Na osnovu učestalosti genotipova, odredili smo i učestalosti alela ispitivanog polimorfizma. Učestalost C alelne varijante je bila 87,6%, dok je učestalost T alela iznosila 12,4%.



Grafikon 7. Učestalosti -1562 C/T *MMP-9* genotipova kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Učestalosti alela, pojedinačnih i udruženih genotipova za *MMP-9* -1562 C/T polimorfizam u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA predstavljeni su u tabeli 37.

Tabela 37. Učestalosti genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma, kao i učestalosti udruženih genotipova po dominantnom i recesivnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije

-1562 C/T <i>MMP-9</i>	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
CC	34 (70,8)	91 (79,8)	0,150
CT	14 (29,2)	20 (17,5)	
TT	0 (0)	3 (2,7)	
CC CT+TT	34 (70,8) 14 (29,2)	91 (79,8) 23 (20,2)	0,213
CC+CT TT	48 (100) 0 (0)	111 (97,4) 3 (2,6)	0,257
C alel T alel	82 (85,4) 14 (14,6)	202 (89,8) 23 (10,2)8	0,339

Iako su svi pacijenti sa TT genotipom imali loš oporavak, razlika u učestalosti genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom nije dostigla statističku značajnost ($p=0,150$). Razlika se ne uočava ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom ili recesivnom modelu.

Kao i kod prethodnih polimorfizama, analizirali smo učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma u odnosu na pojavu komplikacija nakon rtPA terapije (Tabela 38), ali i u odnosu na prisustvo prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa ishemijskim moždanim udarom (Tabela 39).

Tabela 38. Učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma u odnosu na pojavu komplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU

Komplikacija	<i>MMP-9</i> -1562 C/T			p vrednost
	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)	
Hemoragijska transformacija				0,428
Da	25 (83,3)	4 (13,3)	1 (3,3)	
Ne	103 (75,7)	31 (22,8)	2 (66,7)	
sICH				0,146
Da	6 (66,7)	2 (22,2)	1 (11,1)	
Ne	102 (75,6)	31 (23,0)	2 (1,4)	
Ostale intrakranijalne hemoragije				0,039
Da	5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)	
Ne	123 (77,4)	34 (21,4)	2 (1,3)	
Sistemske krvarenje				0,948
Da	3 (75,0)	1 (25,0)	0 (0)	
Ne	125 (77,2)	34 (21,0)	3 (1,8)	
Agitacija				0,915
Da	7 (77,8)	2 (22,2)	0 (0)	
Ne	121 (77,1)	33 (21,0)	3 (1,9)	
Epileptički napad				0,861
Da	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	
Ne	127 (77,0)	35 (21,2)	3 (1,8)	
Alergija na primenjenu terapiju				0,544
Da	4 (75,0)	0 (0)	0 (0)	
Ne	124 (76,5)	35 (21,6)	3 (1,9)	

Analizom rezultata iz tabele 38, uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez neke druge intrakranijalne hemoragije ($p=0,039$). Osobe kod kojih se razvila neka druga intrakranijalna hemoragija nakon rtPA terapije statistički značajno češće su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma ($p=0,047$; OR=13,08; 95% CI 1,04-165,09).

Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez sICH ($p=0,146$). Međutim, nakon grupisanja genotipova po dominantnom modelu (TT naspram CC+CT), uočava se statistički značajna razlika u distribuciji genotipova pomenutog polimorfizma između pacijenata sa i bez sICH ($p=0,050$). Osobe kod kojih se javila sICH nakon trombolitičke terapije statistički značajno češće su imale TT genotip *MMP-9* -1562

C/T polimorfizma. Međutim, analiza odnosa šansi i rizika nije potvrdila ovu statističku značajnost ($p=0,097$; $OR=8,31$; $95\% CI 0,68 -101,70$).

Sa druge strane, nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova ispitivanog polimorfizma između pacijenata sa i bez hemoragijske transformacije ($p=0,428$). Statistički značajna razlika se ne uočava ni u učestalosti genotipova pomenutog polimorfizma između pacijenata sa različitim podtipovima HT ($p=0,316$), kao ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom, odnosno recesivnom modelu.

Dodatnim statističkim analizama unutar podgrupa hemoragijske transformacije, uočeno je da postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9 -1562 C/T* polimorfizma između pacijenata sa i bez parenhimskog hematoma tip 2 ($p=0,019$). Osobe sa parenhimskim hematomom tip 2 statistički značajno češće su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma ($p=0,011$; $OR=11,083$; $CI 95\% 1,037-165,094$) u odnosu na pacijente drugih genotipova.

U tabeli 39 su predstavjene distribucije genotipova *MMP-9 -1562 C/T* polimorfizma u odnosu na postojanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA.

Tabela 39. Učestalosti genotipova *MMP-9 -1562 C/T* polimorfizma u odnosu na postojanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

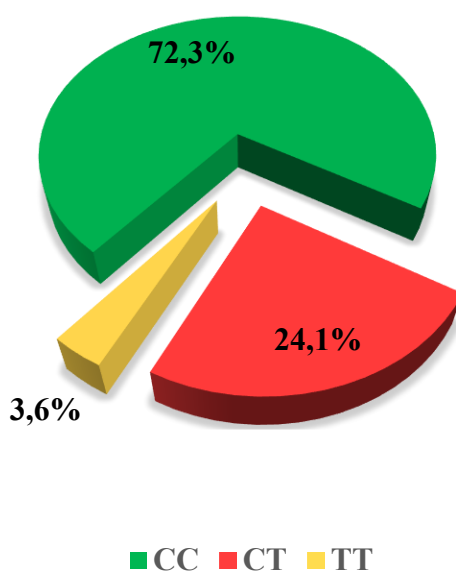
Vaskularni ishemijski događaj	<i>MMP-9 -1562 C/T</i>			p vrednost
	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)	
Prehodni IMU				0,635
Da	20 (83,3)	4 (16,7)	0 (0)	
Ne	108 (76,1)	31 (21,8)	3 (2,1)	
Prehodni TIA				0,231
Da	13 (65,0)	7 (35,0)	0 (0)	
Ne	115 (78,8)	28 (19,2)	3 (2,0)	
Prehodni AIM				0,589
Da	9 (90,0)	1 (10,0)	0 (0)	
Ne	118 (76,1)	34 (21,9)	3 (1,9)	

Analizom rezultata iz tabele 39 nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9 -1562 C/T* polimorfizma između pacijenata sa i bez prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja. Statistička značajnost se ne dostiže ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom, odnosno recesivnom modelu.

4.1.5. Rezultati ispitivanja polimorfizama *TIMP-2* -418 G/C (*rs8179090*) i -303 C/T (*rs2277698*)

Za ispitivani polimorfizam -418 G/C *TIMP-2* gena svih 166 pacijenata je imalo isti genotip (GG). Ovi rezultati su u saglasnosti sa objavljenim učestalostima za ispitivani polimorfizam za evropsku populaciju u NCBI bazi (distribucija G alela u populaciji Evrope je 99%).

Što se tiče *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma, 120 (72,3%) pacijenata su bili homozigoti za C alel (genotip CC). Genotip CT je imalo 40 (24,1%) pacijenata, dok je šest (3,6%) pacijenata bilo homozigotno za ređi alel T (genotip TT) (Grafikon 8). Na osnovu analiziranih genotipova, utvrđene su učestalosti alela za našu studijsku grupu. Učestalost C alela je iznosila 84,3%, dok je učestalost T alela bila 15,7%.



Grafikon 8. Učestalosti *TIMP-2* -303 C/T genotipova kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Za ispitivani polimorfizam analizirali smo uticaj alela, pojedinačnih i udruženih genotipova po recesivnom i dominantnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata nakon IMU lečenog rtPA. Rezultati navedenih analiza predstavljeni su u tabeli 40.

Tabela 40. Distribucija genotipova i alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma, kao i udruženih genotipova po dominantnom i recesivnom modelu u odnosu na oporavak pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije

<i>TIMP-2</i> -303 C/T	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
CC	31 (64,6)	86 (75,4)	0,289
CT	14 (29,2)	25 (21,9)	
TT	3 (6,2)	3 (2,7)	
CC	31 (64,6)	86 (75,4)	0,159
CT+TT	17 (35,4)	28 (24,6)	
CC+CT	45 (93,8)	111 (97,4)	0,265
TT	3 (6,3)	3 (2,6)	
C alel	76 (79,2)	197 (86,4)	0,132
T alel	20 (20,8)	31 (13,6)	

Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma između pacijenata sa dobrim i lošim oporavkom nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom. Razlika se ne uočava ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom ili recesivnom modelu, iako je dobar oporavak zabeležen kod skoro dvostruko više pacijenata koji nisu bili nosioci T alela (CC prema CT+TT) ($p=0,159$).

Ispitali smo distribuciju genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma u odnosu na pojavu komplikacija rtPA terapije kod pacijenata sa IMU (Tabela 41), ali i u odnosu na prethodno javljanje nekog vaskularnog ishemijskog događaja (Tabela 42).

Tabela 41. Učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma u odnosu na pojavu komplikacija trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU

Komplikacija	<i>TIMP-2</i> -303 C/T			p vrednost
	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)	
Hemoragijska transformacija				0,989
Da	22 (73,3)	7 (23,3)	1 (3,3)	
Ne	98 (72,1)	33 (24,3)	5 (3,7)	
sICH				0,560
Da	6 (66,7)	2 (22,2)	1 (11,1)	
Ne	97 (71,9)	33 (24,4)	5 (3,7)	
Ostale intrakranijalne hemoragije				0,120
Da	6 (85,7)	0 (0)	1 (14,3)	
Ne	114 (71,7)	40 (25,2)	5 (3,1)	
Sistemske krvarenje				0,456
Da	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	
Ne	116 (71,6)	40 (24,7)	6 (3,7)	
Agitacija				0,503
Da	8 (88,9)	1 (11,1)	0 (0)	
Ne	112 (71,3)	39 (24,8)	6 (3,9)	
Epileptički napad				0,825
Da	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	
Ne	119 (72,1)	40 (24,2)	6 (3,6)	
Alergija na primenjenu terapiju				0,456
Da	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	
Ne	116 (71,6)	40 (24,7)	6 (3,7)	

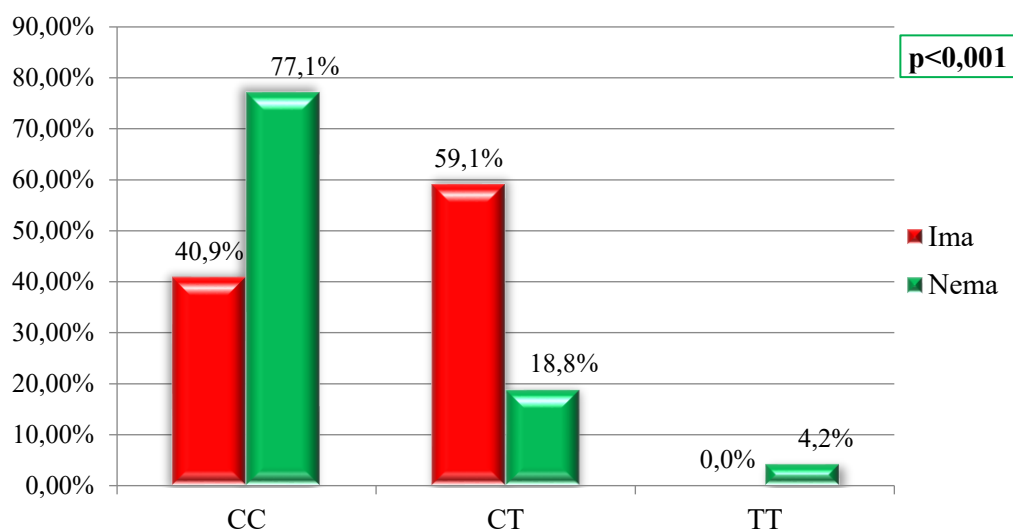
Analizom rezultata predstavljenih u tabeli 41 nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez komplikacija trombolitičke terapije, ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom ili recesivnom modelu.

Tabela 42. Učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma u odnosu na postojanje prethodnih vaskularnih ishemijskih događaja kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Vaskularni ishemijski događaj	<i>TIMP-2</i> -303 C/T			p vrednost
	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)	
Prethodni IMU				0,176
Da	21 (87,8)	3 (12,5)	0 (0)	
Ne	99 (69,7)	37 (26,1)	6 (4,2)	
Prethodni TIA				0,558
Da	16 (80,0)	4 (20,0)	0 (0)	
Ne	104 (71,2)	36 (24,7)	6 (4,1)	
Prethodni AIM				0,438
Da	9 (90,0)	1 (10,0)	0 (0)	
Ne	111 (71,6)	39 (25,2)	5 (3,2)	

Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez prethodnog vaskularnog ishemijskog događaja, čak ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom i recesivnom modelu.

Posmatrali smo i distribuciju genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma u odnosu na pojavu intrahospitalne infekcije kod pacijenata sa IMU lečenih trombolitičkom terapijom. Rezultati su ilustrovani na grafikonu 9.



Grafikon 9. Distribucija genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma u odnosu na pojavu intrahospitalne infekcije kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

Uočena je visoko statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez intrahospitalne infekcije ($p < 0,001$). Učestalost CC genotipa ispitivanog polimorfizma je statistički značajno manja kod osoba koje su imale intrahospitalnu infekciju ($p < 0,001$; OR= 0,206; 95% CI 0,080– 0,524).

4.1.6. Rezultati analize kombinacije genotipova ispitivanih polimorfizama

Dodatno smo analizirali učestalosti udruženih genotipova grupisanih po dominantnom ili recesivnom modelu za po dva polimorfizma u odnosu na oporavak pacijenata nakon IMU lečenog rtPA terapijom, kao i u odnosu na pojavu neželjenih efekata trombolitičke terapije.

4.1.6.1. *Kombinovani genotipovi polimorfizama MMP-2 i TIMP-2 gena*

Uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-2* -1575 G/A i *TIMP-2* -303 C/T polimorfizama između pacijenata sa i bez sistemskog krvarenja nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom ($p=0,030$). Sve osobe sa sistemskim krvarenjem istovremeno su imale GG genotip *MMP-2* -1575 G/A polimorfizma i CC genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma, tj. nosioci ovih genotipova imali su 2,2 puta veći rizik za ispoljavanje sistemskog krvarenja ($p=0,044$; $RR=2,219$). Multivarijanta logistička regresiona analiza sa sistemskim krvarenjem, kao ishodnom varijablom, nije mogla da se izvrši zbog malih učestalosti.

4.1.6.2. *Kombinovani genotipovi polimorfizama MMP-9 i TIMP-2 gena*

Nakon analize gen-gen interakcije između genotipova *MMP-9* i *TIMP-2* gena, čak 60,5% pacijenata sa lošim oporavkom nakon IMU lečenog rtPA istovremeno je imao CC genotip *MMP-9* -1562 C/T i CC genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizama, što je statistički značajno veća učestalost nego kod osoba sa dobrim oporavkom ($p=0,050$). Međutim nakon multivarijantne logističke regresione analize sa lošim oporavkom kao ishodnom varijablom, ova značajnost nije potvrđena ($p=0,123$; $OR=2,04$; 95% CI 0,825 – 5,069).

Dodatnim analizama pronađena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T i *TIMP-2* -303 C/T polimorfizama između pacijenata sa i bez hemoragijske transformacije ($p=0,033$). Hemoragijska transformacija se statistički značajno češće javila kod pacijenata koji su istovremeno imali TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma i TT genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma. Ova statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T i *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama se uočava i između pacijenata sa različitim podtipovima HT gde je visoko statistički značajna ($p<0,001$). Zbog male učestalosti genotipova nije bilo moguće uraditi analizu odnosa šansi i rizika između pacijenata sa i bez hemoragijske transformacije.

Dodatno, uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T i *TIMP-2* -303 C/T polimorfizama između pacijenata sa i bez neke druge intrakranijalne hemoragije (proširena iz ishemičnih hemoragija- intraventrikularna krvarenja ili SAH) nakon rtPA terapije. Pacijenti kod kojih se razvila neka druga intrakranijalna hemoragija nakon rtPA terapije statistički značajno češće su istovremeno imali TT genotip za oba ispitivana polimorfizma ($p<0,001$). Usled malih učestalosti genotipova, nije bilo moguće uraditi analizu odnosa šansi i rizika između pacijenata sa i bez drugih intrakranijalnih hemoragija.

Međutim, uočava su da su pacijenti sa sICH visoko statistički značajno češće istovremeno imali TT genotip oba polimorfizma u odnosu na pacijente koji nisu razvili sICH ($p<0,001$). Zbog

malih učestalosti genotipova, nije bilo moguće uraditi analizu odnosa šansi i rizika između pacijenata sa i bez sICH.

4.1.6.3. *Kombinovani genotipovi polimorfizama MMP-2 i MMP-9 gena*

Sa druge strane pacijenti kod kojih se javilo neko drugo intrakranijalno krvarenje nakon trombolitičke terapije statistički značajno češće su istovremeno imali CC genotip *MMP-2 -735 C/T* polimorfizma i TT genotip *MMP-9 -1562 C/T* ($p=0,011$), međutim analizom odnosa šansi statistička značajnost se nije potvrdila ($p=0,122$; OR=11,36; 95% CI 1,04 -165,09). Takođe, pacijenti kod kojih se razvila sICH statistički značajno češće su imali iste udruže genotipove (CC genotip *MMP-2 -735 C/T* i TT genotip *MMP-9 -1562 C/T* polimorfizma) ($p=0,031$). Međutim, ni ovde nakon analize odnosa šansi ova značajnost nije potvrđena ($p=0,155$; OR=9,69; 95% CI 0,79 - 118,43).

4.2. **REZULTATI INICIJALNE STUDIJE NAKON 16 MESECI ISTRAŽIVANJA**

U inicijalnu studiju preseka koja je obuhvatila prvih 16 meseci istraživanja, uključeno je 94 konsektivna pacijenta sa IMU lečena rtPA terapijom. Jedan pacijent (1,1%) nije završio period praćenja od tri meseca. U studiju je bilo uključeno 48 (51,1%) pacijenata muškog i 46 (48,9%) pacijenata ženskog pola. Prosečna starost pacijenata bila je $70,22 \pm 11,30$ godina (opseg 18-87).

Hipertenzija je bila najčešće udruženo oboljenje koje je registrovano kod 91 (96,8%) pacijenta. Prosečan NIHSS na prijemu je bio $12,5 \pm 5,0$ (opseg 5-25), 24h nakon rtPA iznosio je $9,9 \pm 5,7$ (opseg 1-25), dok je $7,8 \pm 5,9$ (opseg 0-25) bio na otpustu iz bolnice. Prosečan mRS tri meseca nakon izlaska iz bolnice iznosio je $3,2 \pm 2,0$ (opseg 0-6). Nakon tri meseca od IMU, dobar oporavak je postignut kod 26 (28,0%) pacijenata, dok je loš oporavak imalo 67 (72,0%) pacijenta, uključujući 21 letatan ishod (22,6%), od kojih se kod 13 (13,8%) pacijenata radilo o intrahospitalnom smrtnom ishodu.

Hemoragijska transformacija je bila najčešći neželjeni događaj koja se javila kod 15 (16%) pacijenata. Sve kliničke i biohemijske karakteristike pacijenata, kao i kardiovaskularni faktori rizika i neželjeni događaji nakon IMU i rtPA prikazani su u tabeli 43.

Tabela 43. Oporavak pacijenata u odnosu na kliničke i biohemijske karakteristike pacijenata, udruženost kardiovaskularnih faktora rizika, kao i pojave neželjenih efekata IMU i rtPA

Variable	Dobar oporavak	Loš oporavak	p vrednost	Svi pacijenti N (%) / \bar{x} ±SD / opseg
Pacijenti (muški pol)	16 (61,5)	31 (46,3)	0,186	
Starost	64,69±16,39	72,55±7,67	0,002	70,22 ± 11,3 (18– 87)
Kardiovaskularni komorbiditeti				
Hipertenzija	24 (92,3)	67 (100)	0,022	91 (96,8)
Atrijalna fibrilacija	7 (26,9)	19 (28,4)	0,89	26 (27,7)
Dijabetes melitus	6 (23,1)	17 (25,4)	0,818	23 (24,5)
Ishemijska bolest srca	4 (15,4)	20 (29,9)	0,152	24 (25,5)
Srčana insuficijencija	1 (3,8)	11 (16,4)	0,105	12 (12,8)
Periferna arterijska bolest	1 (3,8)	3 (4,5)	0,893	4 (4,3)
Pušački status				
Pušači ili ex-pušači	7 (26,9)	23 (34,3)	0,493	33 (33,1)
Lična istorija bolesti				
Prethodni IMU	2 (7,7)	7 (10,4)	0,687	9 (9,7)
Prethodni TIA	2 (7,7)	4 (6,0)	0,762	6 (6,5)
Prethodni AIM	1 (4,0)	4 (6,0)	0,711	5 (5,3)
NIHSS na prijemu	9,96±3,63	13,55±5,12	<0,001	12,5±5,0 (5–25)
NIHSS nakon 24h	5,73±2,57	11,49±5,81	<0,001	9,9 ± 5,7 (1–25)
NIHSS na otpustu	3,31±2,01	9,51±6,00	<0,001	7,8 ± 5,9 (0–25)
mRS na otpustu				3,2±2,0 (0-6)
Laboratorijski parametri prijem				
SKP	157,12±26,46	164,18±28,22	0,274	161,9 ± 27,7 (100–220)
DKP	86,15±12,03	90,07±11,40	0,146	88,9 ± 11,6 (60–120)
Nivo glukoze	7,33±2,04	7,69±2,73	0,547	7,6 ± 2,6 (4,8–22,2)
INR	1,11±0,21	1,14±0,16	0,463	1,13 ± 0,18 (0,84-1,95)
aPTT	26,37±4,04	26,34±4,02	0,978	26,4 ± 4,0 (19,8–38,3)
Urea	6,50±1,49	7,49±2,00	0,031	7,3 ± 1,9 (4,2–13)
Kreatinin	100,13±16,10	105,52±25,99	0,344	104,1 ± 23,8 (63-194)
Biohemijski parametri 1. dan				
Ukupni holesterol	5,11±1,46	5,08±1,25	0,938	5,1 ± 1,3 (1,5–7,5)
LDL holesterol	4,54±0,62	4,57±0,42	0,906	4,5 ± 0,5 (3,6–5,5)
HDL holesterol	1,45±0,27	1,45±0,28	0,945	1,4 ± 0,3 (1,1–2,0)
Trigliceridi	1,55±1,01	1,50±0,72	0,804	1,5 ± 0,8 (0,4–4,8)
Neželjeni događaji				
Hemoragijska transformacija	1 (3,8)	14 (20,9)	0,045	15 (16)
Sistemska krvarenje	0 (0,0)	3 (4,5)	0,273	3 (3,2)
Intrahospitalna infekcija	4 (15,4)	9 (13,4)	0,808	13 (13,8)
Agitacija	1 (3,8)	4 (6,0)	0,684	5 (5,3)
Alergijska reakcija na rtPA	0 (0,0)	3 (4,5)	0,273	3 (3,2)

Većina pacijenata, njih 44 (46,8%) bili su heterozigoti za *PAI-1* 4G/5G polimorfizam, dok je broj homozigota (4G/4G i 5G/5G) bio isti, po 25 (26,6%) pacijenata. Učestalosti 4G i 5G alela su, takođe, bile iste (50%).

Sa druge strane, 54 (57,4%) pacijenta je bilo heterozigot (I/D genotip) za *ACE* I/D polimorfizam. Devet (9,6%) pacijenata je imalo I/I genotip, dok je 31 (33%) pacijent bio homozigotan za D alel (D/D genotip). D alel je bio češći, sa učestalošću od 61,7%.

Uočena je statistički značajna razlika između pacijenata sa dobim i lošim oporavkom u odnosu na prosečnu starost pacijenata, kao i sa NIHSS skorom na prijemu, 24h nakon rtPA i na otpustu iz bolnice (Tabela 17). Međutim, ova značajnost nije uočena u odnosu na učestalosti genotipove i alela *PAI-1* 4G/5G i *ACE* I/D polimorfizama, što je predstavljeno u tabeli 44.

Tabela 44. Oporavak pacijenata nakon IMU lečenog rtPA u odnosu na genotipove *PAI-1* 4G/5G i *ACE* I/D polimorfizma

	Dobar oporavak N (%)	Loš oporavak N (%)	p vrednost
<i>PAI-1</i> polimorfizam			
4G/4G	9 (34,6)	16 (23,9)	0,530
4G /5G	10 (38,5)	33 (50,0)	
5G/5G	7 (26,9)	18 (27,9)	
<i>ACE</i> I/D polimorfizam			
I/I	0 (0,0)	9 (13,4)	0,100
I/D	15 (57,5)	38 (56,7)	
D/D	11 (42,3)	20 (29,9)	

Nakon multivarijante logističke regresione analize koja je uključila starost, pol, NIHSS skorove na prijemu, 24h nakon rtPA i na otpustu iz bolnice, kao i nivo uree na prijemu, pokazano je da je dobar oporavak nakon rtPA terapije, izražen preko mRS nakon tri meseca od IMU, značajno povezan samo sa starošću pacijenta (OR (95% CI): 1,078 (1,008-1,153), p=0,028) i NIHSS skorom na otpustu iz bolnice (OR (95% CI): 1,511 (1,055-2,164), p=0,024).

Pacijenti sa IMU i 4G/4G genotipom su bili statistički značajno mlađi (67,38±13,83) u odnosu na pacijente sa 4G/5G i 5G/5G genotipom (70,85±8,67) (p=0,021). Razlika je još veća kada smo poredili pacijente sa 4G/4G i 5G/5G genotipom (72,56±9,36) (p=0,006).

Uočena je statistički značajna razlika u javljanju HT između pacijenata koji nisu imali ACE D alel (pacijenti sa I/I genotipom) u poređenju sa pacijentima sa bar jednim D alelom (I/D+D/D genotipovi) (p=0,035) (Tabela 45).

Tabela 45. Distribucija genotipova *PAI-1* 4G/5G i *ACE* I/D polimorfizama u odnosu na pojavu HT kod pacijenata sa IMU nakon rtPA terapije

	HT N (%)	Bez HT N (%)	p vrednost OR (95% CI)
PAI-1 polimorfizam			
4G/4G	5 (5,4)	20 (21,5)	0,721
4G /5G	7 (7,5)	33 (38,7)	
5G/5G	3 (3,2)	18 (27,9)	
ACE I/D polimorfizam			
I/I	4 (4,3)	5 (5,4)	0,074
I/D	7 (7,5)	46 (49,5)	
D/D	4 (4,3)	27 (29,0)	
I/I	4 (4,3)	5 (5,4)	0,035
I/D+ D/D	11 (11,8)	73 (78,5)	

5. DISKUSIJA

Genske varijacije, ne samo da utiču na predispoziciju za ishemijski moždani udar, 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 AIMU u svetu. Uprkos činjenici da samo mali broj pacijenata sa AIMU primi trombolitičku terapiju, pacijenti u terapijskom prozoru za primenu iste, imaju veće dugoročno preživljavanje i niže stope mortaliteta, kao i bolji funkcionalni oporavak nakon IMU (211) i značajno poboljšan kvalitet života nakon IMU (212). Sa druge strane, 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 (89). Razlozi zašto se kod određenog broja pacijenata razvije HT, kao i zašto neki pacijenti bolje, a drugi lošije odgovore na rtPA terapiju su brojni, ali i dalje nisu do kraja razjašnjeni. Poznavanje faktora rizika i patofizioloških mehanizama HT nakon trombolitičke terapije mogu da smanje rizik od nastanka HT kod ovih pacijenata (213). Farmakogenetika, kao nova i savremena disciplina, bazira se na otkrivanju uticaja genetičkih polimorfnih regiona na efikasnost, ali i pojavu neželjenih efekata lekova kod pojedinaca. Njen osnovni cilj je da identifikuje pacijente koji će bolje da odgovore na određenu terapiju (214). 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 su već neke SNP varijante povezane sa odgovorom na rtPA terapiju, tokom same bolesti, ali i javljanjem hemoragijskih komplikacija nakon primljene trombolitičke terapije (215).

U jednoj od ovakvih studija ispitivan je *ApoE* gen i pokazano je da je efikasnost rtPA terapije bila mnogo veća kod osoba *ApoE E2* genotipa (216).

Dva funkcionalna polimorfizma *TAFI* (-1040 C/T- rs1926447) i *PAI-I* (4G/5G- rs1799889) gena ukazala su na značaj gen-gen interakcije jer je kombinacija genotipova (*TAFI* TT homozigoti i osobe sa *PAI-I* 4G alelom) ova dva polimorfizma rezultirala dvostrukim smanjenjem rekanalizacije nakon rtPA terapije (217).

Takođe, V/V genotip V34L polimorfizma *FXIII* gena zajedno sa nižim vrednostima fibrinogena u krvi povezan je sa boljim oporavkom pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom (218).

Polimorfizmi *IL1B* gena (rs1143627 i rs16944), kao i rs1063856 polimorfizam *vWF* gena povezani su sa ranom rekanalizacijom okludirane arterije kod pacijenata sa IMU lečenih rtPA

terapijom. Osobe sa TC haplotipom *IL1B* gena (rs1143627 i rs16944) imale su veće vrednosti IL-1 β u plazmi i visok stepen rekanalizacije jedan sat nakon rtPA administracije. Takođe, uočena je značajna povezanost GG genotipa rs1063856 polimorfizma *vWF* gena i nižih vrednosti faktora koagulacije VIII sa bržom rekanalizacijom kod pacijenata nakon IMU (219).

Imajući ovo u vidu, u našoj studiji smo analizirali uticaj polimorfizama u genima čiji su produkti uključeni u procese fibrinolize (PAI-1 i ACE) i održavanja integriteta vanćelijskog matriksa (MMP-2, MMP-9 i TIMP-2) na oporavak pacijenata nakon IMU lečenih rtPA terapijom, kao i na stepen javljanja hemoragijskih, ali i drugih komplikacija pomenute terapije.

Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) ima značajnu ulogu u fibrinolitičkom sistemu kao jedan od ključnih molekula koji povezuje patogenezu, ali i progresiju vaskularnih ishemijskih događaja (133).

Brojne studije su ispitivale polimorfizme -675 4G/5G, -844 G/A i 11053 T/G *PAI-1* gena najviše sa ciljem ispitivanja rizika za nastanak IMU. Međutim, u studijama asocijacija dobijeni su kontradiktorni rezultati o povezanosti polimorfizama *PAI-1* gena i rizika za nastanak IMU (220).

U poslednjih nekoliko godina 4G/5G polimorfizam *PAI-1* gena je najčešće analiziran *PAI-1* polimorfizam, kako kod različitih cerebrovaskularnih oboljenja, uključujući IMU, tako i kod brojnih drugih oboljenja kao što su infarkt miokarda (221), trombofilije (222), spontani pobačaji (223) i drugi. *PAI-1* 4G/5G polimorfizam je povezan sa nivoom PAI-1 u plazmi, tako što je 4G alelna varijanta u vezi sa višim koncentracijama PAI-1 u plazmi (224). Dodatno, studije *in vivo* su pokazale da osobe homozigoti za 4G alel imaju najviše nivoe PAI-1 u plazmi, dok su kod osoba homozigota za 5G alel ovi nivoi najniži (225). Viši nivoi PAI-1 u plazmi uočeni su kod osoba sa IMU (226), trombozom dubokih vena i AIM (227), ali su povezani i sa lošijim ishodom nakon meningokokne sepse (228) i preeklampsije (229). Razlika u nivoima PAI-1 kod različitih genotipova najizraženija je nekoliko sati, ili dana nakon akutno životno ugrožavajuće bolesti (230).

Povezanost 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena i IMU i dalje je nejasna (134,231). Najveći broj studija koje su analizirale pomenuti polimorfizam *PAI-1* gena i IMU bio je je usmeren na ispitivanje 4G/5G polimorfizma kao faktora rizika za nastanak IMU. Tako su Hu i saradnici ukazali na značajnu povezanost 4G/4G genotipa ovog polimorfizma sa povećanim rizikom za nastanak IMU u populaciji odraslih, ali je ova povezanost izostala u dečjoj populaciji (220). Drugi autori su potvrdili povezanost 4G/4G genotipa sa povećanim rizikom za nastanak IMU (232,233). Međutim, određeni broj studija je pokazao da je pomenuti genotip neutralan, ili čak protektivan za dobijanje IMU (234–236). Hoekstra i saradnici su u svojoj studiji, takođe, ukazali na protektivno dejstvo *PAI-1* 4G alela kod

pacijenata sa IMU, gde je on povezan sa stabilizacijom aterosklerotskog plaka (231). Rezultati naše studije ukazuju da postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova 4G/5G polimorfizma između pacijenata sa i bez prethodnog IMU ($p=0,033$), međutim nismo uspeli da ukažemo na povezanost 4G/4G genotipa sa nastankom ponovljenog IMU ($p=0,084$; OR=0,27; 95% CI: 0,06 - 1,19). Studija koju je sproveo Vergouwen sa saradnicima bavila se ispitivanjem povezanosti *PAI-1* 4G/5G polimorfizma i javljanja cerebralne ishemije, ponovnog krvarenja i oporavka pacijenata nakon SAH. U njihovoj studiji uočena je povezanost između 4G alelne varijante sa većim rizikom za javljanje cerebralne ishemije nakon SAH, kao i lošijeg oporavka pacijenata nakon SAH (224).

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 (237). Do sada su svega tri studije, uključujući našu, spovedene s ciljem ispitivanja povezanosti 4G/5G polimorfizma i efikasnosti rtPA terapije i javljanja rtPA indukovanih hemoragijskih neželjenih efekata. Prva od ovih studija, sprovedena na 165 pacijenata sa IMU, ukazala je na moguću povezanost 4G/4G genotipa sa lošijim oporavkom pacijenata sa IMU lečenih rtPA. U pomenutoj studiji oporavak pacijenata je procenjivan na osnovu mRS skora i stepena rekanalizacije. Sa druge strane, u istoj studiji povezanost genotipova 4G/5G polimorfizma i pojave rtPA indukovane HT je izostala (238). U našoj studiji nismo uspeli da potvrdimo uticaj genotipova, kao ni alela *PAI-1* 4G/5G polimorfizma na oporavak pacijenata nakon IMU meren mRS skorom ($p=0,306$), čak ni nakon grupisanja genotipova po recesivnom modelu (4G/4G prema 4G/5G+5G/5G, $p=0,129$). Takođe, nismo uspeli da pronađemo asocijaciju između genotipova 4G/5G polimorfizma i pojave intrakranijalnih hemoragijskih komplikacija trombolitičke terapije. U drugoj studiji u koju je uključen 131 konsekutivni pacijent nije pronađena veza između genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma i oporavka pacijenata (239). Sa druge strane, Szegedi i saradnici su u ovoj studiji ukazali na značaj 5G/5G genotipa kao nezavisnog faktora rizika za hemoragijsku transformaciju nakon trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU. Uticaj 5G/5G genotipa na pojavu HT u teoriji se može objasniti povezanošću ovog polimorfizma i nivoa PAI-1 u plazmi, gde je 5G alel povezan sa nižim vrednostima PAI-1 u plazmi, pa samim tim smanjenim vezivanjem za rtPA tokom fibrinolize, ali i lokalnim efektom PAI-1 u moždanom parenhimu gde ima ulogu da ograničava preveliku rtPA aktivnost, odnosno niži nivoi PAI-1 manje inhibiraju rtPA aktivnost (239). Iako nismo uspeli da nađemo asocijaciju između genotipova 4G/5G polimorfizma i HT, u našoj studiji smo posmatrali i distribuciju genotipova 4G/5G polimorfizma u odnosu na druge neželjene efekte rtPA terapije, između ostalih pojavu hemoragijskih komplikacija u drugim sistemima organa, gde smo uočili statistički značajnu razliku ($p=0,035$). Osobe kod kojih se javilo sistemsko krvarenje nakon trombolitičke terapije statistički značajno češće su bile 5G/5G

genotipa *PAI-1* 4G/5G polimorfizma ($p=0,035$; $OR=11,294$; 95% CI 1,13 - 112,04; $RR=3,573$). 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. Dobijene rezultate nismo mogli da poredimo sa rezultatima drugih istraživača, jer nijedna studija još nije pratila druga neželjena dejstva rtPA kod IMU, ali su dobijeni rezultati u saglasnosti sa rezultatima Szegedi i saradnika, sa pretpostavkom da isti patofiziološki mehanizmi koji povezuju 5G/5G genotip 4G/5G polimorfizma i HT u njihovoj studiji i ovde dovode do rtPA indukovanog sistemskog krvarenja. Studija koju su sprovedi Huges i saradnici ispitivala je uticaj biomarkera endotelne disfunkcije kao i oštećenje KMB kod pacijenata sa životno-ugrožavajućim oboljenima na pojavu i trajanje delirijuma, gde su uočili da su povišeni nivoi PAI-1 u plazmi povezani sa dužim trajanjem delirijuma kod ovih pacijenata (240). U našoj studiji, uočena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *PAI-1* 4G/5G polimorfizma između pacijenata sa i bez agitacije nakon rtPA terapije ($p=0,047$). Osobe kod kojih se javila agitacija nakon trombolitičke terapije statistički značajno češće su bile 5G/5G genotipa ($p=0,027$; $OR=4,882$; 95% CI 1,24 - 19,23; $RR=2,72$). Uticaj 4G/5G polimorfizma *PAI-1* gena na pojavu agitacije nakon trombolitičke terapije je i dalje potpuno nejasan s obzirom da ne postoji nijedna studija koja je to ispitivala. Iako smo u našoj studiji dobili statistički značajnu povezanost 5G/5G genotipa i pojave agitacije nakon rtPA kod pacijenata sa IMU, ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima Huges i saradnika imajući u vidu da je 5G/5G genotip povezan sa nižim vrednostima PAI-1 u plazmi u odnosu na druge genotipove, a da je u njihovoj studiji pojava i trajanje delirijuma povezano sa višim nivoima PAI-1 u plazmi. Sa druge strane, konačne zaključke ne možemo da donosimo zbog malog broja pacijenata uključenih u studiju. Dodatno, iako je u našoj studiji devet pacijenata imalo agitaciju, delirijum se nije razvio ni kod jednog, što ostavlja mesta za dodatna istraživanja povezanosti ovog polimorfizma i drugih oblika agitacije u budućnosti.

Angiotenzin konvertujući enzim, kao produkt *ACE* gena, uključen je u brojne fiziološke, ali i patološke procese u organizmu (148,150).

Uočena je povezanost *ACE* I/D polimorfizama sa bolestima koronarnih arterija, AIM i nastankom tromboze (241), gde su osobe D/D genotipa češće bile sa kardiovaskularnim događajima u odnosu na osobe I/I genotipa (242). Pored toga, D/D genotip je povezan sa javljanjem leukoarajoze kod pacijenata sa lakunarnim IMU (243). Alel D u homozigotnom stanju dovodi do viših vrednosti ACE u plazmi (244), posledično do smanjene aktivnosti faktora koagulacije VII i X i smanjenog nivoa fibrinogena, što predstavlja osnovu antikoagulantnog efekta. Ovo povećanje nivoa ACE u plazmi dovodi do povećanja angiotenzina II, endotelne disfunkcije i smanjenja nivoa azot-oksida. Niži nivoi NO vode smanjenom vazodilatacijskom odgovoru, koji sa druge strane, igra važnu ulogu u patofiziologiji nastanka IMU (245). Pored ovoga, pozato je da angiotenzin II pogoršava ishemijske

lezije moždanog parenhima nakon IMU tako što povećava stepen oksidativnog stresa i inflamacije (246). Imajući ovo u vidu, moguće je napraviti asocijaciju između *ACE I/D* polimorfizma i stepena oporavka pacijenata nakon IMU, ali i pojavom komplikacija primenjene terapije.

Što se tiče povezanosti *ACE I/D* polimorfizma i IMU, najveći broj studija širom sveta bio je usmeren na ispitivanje *I/D* polimorfizma kao faktora rizika za nastanak IMU. U svojoj studiji, Kalita i saradnici su pokazali da su osobe *D/D* genotipa u većem riziku, ne samo od IMU, već i od hemoragijskog moždanog udara (247). To su potvrdili i kineski naučnici u svojoj metaanalizi 2015. godine, gde su ukazali na povezanost *D/D* genotipa *ACE I/D* polimorfizma i rizika od nastanka IMU kod osoba bele rase (145). Međutim, druge studije nisu uspele da potvrde prethodno navedenu povezanost (158,248). Treba naglasiti da su se ove studije značajno razlikovale prema kriterijumima uključivanja pacijenata, različitih strategija uzorkovanja materijala, genotipizacije i drugo (249) i da su analizirale relativno mali broj ispitanika. U našoj studiji uočili smo statistički značajnu razliku u učestalosti udruženih genotipova po recesivnom modelu *ACE I/D* polimorfizma (*I/D* i *D/D* genotipovi naspram *I/I* genotipa) u odnosu na težinu IMU ($p=0,027$). Dobijeni rezultati se mogu objasniti prethodno pomenutim patofiziološkim mehanizama. Naime, *D* alel preko niza kaskadnih reakcija dovodi do viših vrednosti angiotenzina II koji dodatno pogoršava ishemijske lezije moždanog parenhima nakon IMU. Međutim, iako su u našoj studiji svi pacijenti sa teškim IMU imali bar jedan alel *D*, nakon regresione logističke analize, statistička značajnost za osobe nosioce *D* alela, kao faktora rizika za teži IMU, nije potvrđena ($p=0,308$; $OR= 1,49$; $95\% CI 0,70 - 3,18$). U literaturi nismo mogli da pronađemo studije sa kojima bismo uporedili naše rezultate o povezanosti težine IMU i genotipova *ACE I/D* polimorfizma.

Svega tri studije, uključujući i našu, ispitivale su povezanost *ACE I/D* polimorfizma i oporavak pacijenata nakon IMU. Studija koju su sprovedli Malueka i saradnici analizirala je oporavak pacijenata nakon IMU, ali koji nisu lečeni rtPA terapijom. Njihova studija uključila je 61-og pacijenta i pokazala je da je *D* alel *ACE I/D* polimorfizma povezan sa lošijim funkcionalnim oporavkom pacijenata nakon IMU (250). Sa druge strane, Fernández-Cadenas sa saradnicima je sproveo, pored naše, jedinu studiju u kojoj je ispitivan uticaj *ACE I/D* polimorfizma na funkcionalni oporavak pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom i pojavu hemoragijskih komplikacija nakon pomenute terapije. U ovoj studiji, španski naučnici su pratili povezanost *I/D* polimorfizma i efikasnosti rtPA terapije preko stepena rekanalizacije okludirane arterije na uzorku od 96 pacijenata. Uočena je značajna povezanost *D/D* genotipa sa stepenom rekanalizacije nakon 1h, 6h i 24h od trenutka aplikovanja rtPA (158). Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima naše studije u kojoj nismo mogli da dokažemo povezanost genotipova *ACE I/D* polimorfizma i funkcionalnog oporavka pacijenata nakon IMU merenog preko

mRS skora. Različiti rezultati mogu biti posledica korišćenja različitih metoda za procenu efikasnosti terapije.

Uporedo sa praćenjem efikasnosti terapije, Fernández-Cadenas i saradnici analizirali su i uticaj *ACE I/D* polimorfizma na pojavu hemoragijske transformacije nakon trombolitičke terapije kod pacijenata sa IMU, ali nisu uočili povezanost. U našoj inicijalnoj studiji preseka, na 94 konsektivna pacijenta sa IMU lečenih rtPA, 16% pacijenata je imalo HT, sa statistički značajno češćim javljanjem HT kod pacijenata I/I genotipa u odnosu na pacijente sa I/D ili D/D genotipovima ($p=0,015$) (251). Ovi rezultati su kontradiktorni sa hipotezom da je *ACE D/D* genotip potencijalno povezan sa ICH preko vazokonstrikcije i posledičnog javljanja hipertenzije, ali ova asocijacija još uvek nije potvrđena u evropskoj populaciji (252). Međutim, na kraju naše studije, na većem broju pacijenata, nismo mogli da potvrdimo povezanost genotipova *ACE I/D* polimorfizma i javljanja rtPA indukovane HT ($p=0,272$). Statistički značajna povezanost nije uočena ni između pacijenata sa različitim podtipom hemoragijske transformacije ($p=0,686$), a ni kada smo posmatrali povezanost pomenutog polimorfizma u odnosu na pojavu sICH ($p=0,672$). Imajući ovo u vidu, nijedna studija do sada nije uspela da pronađe asocijaciju između *ACE I/D* genotipova i javljanja HT nakon rtPA (95). Sa druge strane, u našoj studiji smo uočili statistički značajnu povezanost između *ACE I/D* polimorfizma i sistemskog krvarenja, kao još jedne komplikacije rtPA terapije ($p=0,018$). Svi pacijenti koji su ispoljili sistemsko krvarenje imali su D/D genotip ($p=0,013$; RR=3,038; 95% CI: 2,49 - 3,89). 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 (252). Naši rezultati su ukazali da postoji tri puta veći rizik da će se kod osoba D/D genotipa nakon IMU lečenog trombolitičkom terapijom razviti sistemsko krvarenje u odnosu na druge genotipove, međutim imajući u vidu niske učestalosti, potrebne su dodatne studije da ovo potvrde.

Ravnoteža između matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora jedan je od ključnih faktora za održavanje integriteta vanćelijskog matriksa, ali i krvno-moždane barijere (162). Promene aktivnosti MMP i TIMP mogu dovesti do narušavanja njihovog balansa, posledičnog oštećenja vanćelijskog matriksa i javljanja različitih patoloških stanja. Njihova neravnoteža dovodi i do oštećenja krvno-moždane barijere i predstavlja jedan od deklanširajućih faktora za javljanje hemoragijske transformacije nakon ishemijskog moždanog udara (168).

Matriks metaloptroteinaze su produkti *MMP* gena, smeštenih na različitim hromozomima. U literaturi, ispitivanje polimorfizama *MMP* gena i njihovog uticaja na gensku ekspresiju i povezanost sa različitim oboljenjima je sve više u žiži interesovanja. Do sada je opisano više različitih *MMP* polimorfizama povezanih sa povećanom incidencijom karcinoma (253,254), bolestima arterijskih krvnih sudova (255) i drugim oboljenjima. SNP varijante u promotorima i kodirajućim regionima *MMP* gena mogu rezultirati različitom genskom ekspresijom kod pojedinaca (256), ali i različitim oporavkom nakon terapije (257).

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 (163,258,259).

Povećana ekspresija *MMP-2* uočena je u brojnim inflamatornim i imunolškim oboljenjima (260). Nekoliko studija na miševima je pokazalo da želatinaze imaju značajnu ulogu u neuroinflamaciji (261), dok su povećani nivoi *MMP-2* uočeni u serumu pacijenata sa IMU (262), kao i kod pacijenata sa vaskularnom demencijom (263). Dodatno, literaturni podaci ukazuju i da povećana ekspresija *MMP-2* gena povećava rizik od IMU (264). Studija sprovedena u Nemačkoj ukazala je na povezanost alela pet polimorfizama *MMP-2* gena (rs1030868- alel T, rs2241145- alel C, rs2287074- alel A, rs2287076- alel C i rs7201- alel C) sa povećanim rizikom od lakunarnih IMU (265).

Studija koju su sproveli Nie i saradnici ispitivala je dve SNP varijante (-735 C/T i -1306 C/T) *MMP-2* i jednu SNP varijantu (-1562 C/T) *MMP-9* gena. U njihovoj studiji uočeno je da su C alelna varijanta i CC genotip *MMP-2* -735 C/T polimorfizma, kao i T alelna varijanta i TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama povezani sa jedan i po puta većim rizikom od javljanja IMU. Međutim, nisu uspeli da dokažu povezanost alela i genotipova *MMP-2* -1306 C/T polimorfizma i rizika od IMU (259). Ovi rezultati se mogu objasniti hipotezom da su C alelna varijanta *MMP-2* -735 C/T i T alelna varijanta *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma povezani sa većom ekspresijom *MMP-2*, odnosno *MMP-9* gena (182,184) i posledično višim nivoima *MMP-2* i *MMP-9* u infarktnom tkivu mozga gde mogu da dovedu do razgradnje vanćelijskog matriksa i oštećenja krvno-moždane barijere što rezultira sekundarnim oštećenjem mozga kao posledicom ishemije (266). Suprotno ovim rezultatima, Zhang i saradnici su u svojoj studiji ukazali na povezanost *MMP-2* -735 C/T (T alela i TT genotipa) i -1306 C/T (T alela i CT genotipa) polimorfizama i rizika od IMU (267). Sa druge strane, metaanaliza koju su sproveli Misra i saradnici nije uspela da ukaže na povezanost genotipova *MMP-2* -1306 C/T i *MMP-2* -735 C/T polimorfizama i rizika od IMU (268). Iako naša studija nije direktno istraživala povezanost genotipova odabranih polimorfizama i rizika od IMU, uočili smo statistički značajnu razliku u učestalosti genotipova *MMP-2* -1575 G/A i *MMP-2* -1306 C/T polimorfizama između pacijenata sa i bez prethodnog ishemijskog moždanog udara ($p=0,002$). Osobe koje su imale

prethodni IMU statistički značajno ređe su imale GG genotip *MMP-2* -1575 G/A polimorfizma ili CC genotip *MMP-2* -1306 C/T polimorfizma ($p=0,003$; OR=0,252; 95% CI 0,102 - 0,620; RR=0,53). Takođe, osobe sa rekurentnim IMU statistički značajno ređe su bile TT genotipa *MMP-2* -790 T/G polimorfizma ($p=0,019$; OR=0,331; 95% CI 0,136 - 0,803; RR=0,61). Ova povezanost izostala je kod *MMP-2* -735 C/T polimorfizma. Šarolikost rezultata se može objasniti različitom alelskom distribucijom između osoba različite etničke i rasne pripadnosti, ali nam može ukazati i na potrebu za dodatnim izučavanjima pomenutih polimorfizama na većim uzorcima.

Još jedna studija bavila se ispitivanjem povezanosti polimorfizama unutar *MMP-2* gena i rizika za IMU. U ovoj studiji, uočena je povezanost rs243849 polimorfizma (T alelna varijanta) i povećanog rizika za nastanak IMU, ali i statistički značajnog protektivnog dejstva C alela rs1132896 polimorfizma na nastanak IMU. Sa druge strane, nije uočena povezanost drugih SNP varijanti (rs1132896, rs1053605, rs243849, rs243847, rs243832, rs7201) *MMP-2* gena i rizika od IMU (269).

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 (270–272), dok su podaci o njihovoj povezanosti sa IMU i odgovorom na terapiju veoma oskudni (273).

Alp i saradnici su u svojoj studiji ukazali na statistički značajnu razliku u učestalosti ACGC haplotipa (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T) *MMP-2* gena kod osoba sa ishemijskom bolesti srca u odnosu na kontrolnu grupu (272), dok je GCGC haplotip povezan sa većim rizikom od reumatoidnog artritisa u odnosu na kontrolnu grupu (274). Sa druge strane, GCTT i GTTC haplotipovi su povezani sa manjim rizikom od karcinoma dojke u poređenju sa kontrolnom grupom, što može da sugeriše na njihovo protektivno dejstvo (275). Prilikom pretrage NCBI baze, nismo uspeli da pronađemo nijedan rad koji je ukazao na povezanost haplotipova ispitivanih polimorfizama i rizika od IMU, oporavka nakon IMU ili odgovora na rtPA terapiju. Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajnu povezanost haplotipova polimorfizama (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T) *MMP-2* gena i odgovora na rtPA terapiju kod pacijenata sa IMU, kao ni na pojavu rtPA indukovane HT. Sa druge strane, svi pacijenati kod kojih se razvio parenhimski hematoma tip 1, kao podtip hemorgijske transformacije, 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 ($p=0,046$). Pacijenti kod kojih se nije javila alergija na trombolitičku terapiju statistički značajno češće su imale pomenuti haplotip - GCT ($p=0,046$), dok su osobe sa alergijskom reakcijom na rtPA statistički značajno češće imale GCG haplotip. Dodatno smo posmatrali uticaj haplotipova na prethodno javljanje ishemijskih vaskularnih događaja i uočili smo da su pacijenati sa prethodnim IMU statistički značajno ređe imali GCTC haplotip ($p=0,029$), što može da ukazuje na njegovo protektivno dejstvo

za ponovljeni IMU, dok, sa druge strane, deluje da je ATGC haplotip (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T) *MMP-2* gena faktor rizika za ponovni IMU, ali statistička značajnost se nije dostigla ($p=0,121$).

Brojni polimorfizmi unutar *MMP-9* gena intenzivno su proučavani kod osoba sa IMU, ali sa različitim zaključcima. Veliki broj studija je ukazao na povezanost T alela -1562 C/T (rs3918242) polimorfizma smeštenog u promotoru *MMP-9* gena i rizika od IMU (258,259,268,276–278). Sa druge strane, studije sprovedene u Španiji (186) i Poljskoj (279), ali i druge studije (280,281) nisu uspele da potvrde ovu povezanost. Transverzija A u C SNP rs1056628 polimorfizma *MMP-9* gena utiče na vezivanje miR491-5p i dovodi do njegove povećane ekspresije. Pokazano je da su osobe CC genotipa navedenog polimorfizma u većem riziku od dobijanja IMU (282).

Svega nekoliko studija se bavilo ispitivanjem povezanosti polimorfizama gena za matriks metaloproteinaze i njihovih tkivnih inhibitora i oporavka pacijenata nakon IMU.

Manso sa saradnicima je ispitivala uticaj 20 SNP varijanti *MMP-2* i četiri SNP varijante *MMP-9* gena na funkcionalni oporavak pacijenata nakon hemoragijskog i ishemijskog moždanog udara. U studiju je uključeno 568 pacijenata, a funkcionalni oporavak je procenjivan na osnovu mRS tri meseca nakon MU. Šest SNP polimorfizama *MMP-2* gena, među kojima su i -1575 G/A i -1306 C/T polimorfizmi, značajno su povezani sa oporavkom pacijenata nakon oba tipa moždanog udara, ali značajnost je uočena i samostalno u podgrupi pacijena sa IMU. Takođe, TAT haplotip (rs11643630, rs243866, rs243865) je bio statistički značajno povezan sa oporavkom pacijenata nakon IMU. Međutim samo dve SNP varijante (rs2241145 i rs1992116) *MMP-2* gena su pokazale značajnu povezanost sa oporavkom pacijenata nakon Bonferoni korekcije i to G alel u oba polimorfizma je bio povezan sa statistički značajno boljim oporavkom nakon moždanog udara. Sa druge strane, nijedna od SNP varijanti *MMP-9* gena nije pokazala statistički značajnu povezanost sa oporavkom pacijenata nakon moždanog udara (273).

Studija koju su sprovedeli Inzitari i saradnici analizirala je povezanost nivoa MMP (1-3 i 7- 9) i TIMP (1, 2, 4) u plazmi i oporavka pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom. Studija je uključila 327 pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom, dok su nivoi MMP i TIMP mereni pre terapije i 24h nakon primene rtPA terapije. Jedino su se povišeni cirkulišući nivoi MMP-9 pokazali kao nezavisni prediktor lošeg oporavka pacijenata, pojave hemoragijske transformacije i smrtnog ishoda (283). Povezanost viših nivoa MMP-9 u plazmi i pojave HT nakon IMU je potvrdila i metaanaliza koja je uključila 1492 pacijenta sa IMU (284), ali i druge studije (285). Rezultati MAGIC studije, koja je, takođe, merila nivoe MMP (1-3 i 7- 9) i TIMP (1, 2, 4) u plazmi pre i 24 nakon rtPA, pokazali su da

je samo porast odnosa MMP-9/TIMP-1 i MMP-9/TIMP-2 značajno povezan sa sICH, dok je jedino povećanje MMP-9/TIMP-1 odnosa značajno povezan sa pojavom HT. Dodatno, povećanje odnosa MMP-9/TIMP-2 nije statistički značajno povezano sa javljanjem HT kod pacijenata sa IMU lečenih trombolitičkom terapijom, ali uočeno je da postoji tendencija da se ta statistička značajnost dostigne (194).

Iako većina literaturnih podataka ukazuju da je povećan nivo MMP-9 povezan sa lošijom prognoza kod osoba sa IMU i javljanjem HT, kao i da je koncentracija iRNK MMP-9 prediktor lošeg oporavka i većeg mortaliteta kod pacijenata sa IMU (286), podaci o povezanosti polimorfizma unutar *MMP-9* gena i funkcionalnog ishoda nakon IMU lečenog rtPA i dalje su nejasni, ali i nedovoljno istraženi (273). Pretraživanjem NCBI baze, pronašli smo samo tri studije koje su ispitivale uticaj *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma na javljanje HT nakon IMU, gde su u dve studije pacijenti lečeni rtPA terapijom, dok nismo pronašli nijednu studiju koja je analizirala uticaj pomenutog polimorfizma na oporavak pacijenata nakon rtPA terapije.

Jedna od ovih studija pratila je uticaj *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma u kineskoj populaciji i pokazala da je CC genotip ispitivanog polimorfizma značajno povezan sa pojavom HT kod pacijenata sa IMU u poređenju sa pacijentima CT i TT genotipa (287). Ono što razlikuju ovu studiju od naše je selekcija ispitanika, s obzirom da pacijenti sa IMU u pomenutoj studiji nisu lečeni rtPA terapijom. U našoj studiji, nismo uspeli da uočimo statistički značajnu razliku između genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma i javljanja HT, čak ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom i recesivnom modelu. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Montaner i saradnika (186) i rezultatima Fernández-Cadenas i saradnika (288), koji, takođe, nisu uspeli da pronađu asocijaciju između genotipova pomenutog polimorfizma i javljanja HT kod pacijenata sa IMU lečenim rtPA. Međutim, dodatnim statističkim analizama unutar podgrupa hemoragijske transformacije, uočeno je da postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez parenhimskog hematoma tip 2 ($p=0,019$). Osobe sa parenhimskim hematomom tip 2 statistički značajno češće su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma ($p=0,011$; OR=11,083; CI 95% 1,037 - 165,094). Takođe smo uočili statistički značajnu razliku u učestalosti genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma između pacijenata sa i bez neke druge intrakranijalne hemoragije ($p=0,039$). Osobe kod kojih se razvila neka druga intrakranijalna hemoragija (proširena iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH) nakon rtPA terapije statistički značajno češće su imale TT genotip ispitivanog polimorfizma ($p=0,047$; OR=13,08; 95% CI 1,04 - 165,09). Nakon grupisanja genotipova *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma po dominantnom modelu (TT naspram CC+CT) uočava se i statistički značajna razlika u odnosu na pojavu sICH ($p=0,050$). Osobe kod kojih se razvila sICH, statistički značajno češće su bile TT genotipa. Međutim, analiza odnosa šansi i rizika

nije pokazala statistički značajnu povezanost između TT genotipa *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma i pojave sICH ($p=0,097$; $OR=8,31$; 95% CI 0,68 - 101,70), ali se zadržao trend ka njenom dostizanju. Naši rezultati ukazuju da je TT genotip *MMP-9* -1562 C/T faktor rizika za intrakranijalnu hemoragiju kod pacijenata sa IMU lečenih trombolitičkom terapijom i mogu se objasniti višim nivoima *MMP-9* u plazmi kod osoba TT genotipa *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma (185,186), koji su povezani sa oštećenjem KMB i posledične hemoragije (289).

Pored ovoga, studija iz 2019. godine nije pronašla pojedinačnu povezanost šest SNP varijanti *MMP-9* gena i javljanja HT kod pacijenata sa IMU. Međutim, nakon ispitivanja gen-gen interakcije GMDR (engl. Generalized multifactor dimensionality reduction) metodom, uočeno je sinergističko dejstvo između rs3918242 i rs3787268 polimorfizama *MMP-9* gena, gde kombinacija genotipova ova dva polimorfizma značajno povećava rizik od HT kod pacijenata sa IMU (290).

Unutar *TIMP-2* gena do sada su ispitivani brojni polimorfizmi (291). Pokazana je jasna asocijacija između -418 G/C polimorfizma i stepena genske ekspresije, a posledično i nivoa *TIMP-2* u plazmi, dok su podaci o funkcionalnosti -303 C/T polimorfizma i dalje kontradiktorni (192,196,292).

Polimorfizam *TIMP-2* -418 G/C povezan je sa rizikom od javljanja različitih karcinoma (98,99), aneurizme abdominalne aorte (195), hronične opstruktivne bolesti pluća (295), ali i određenih CVB (296). I *TIMP-2* -303 C/T polimorfizam povezan je sa većom incidencijom javljanja karcinoma (291), dok su ređi aleli oba polimorfizma povezani sa češćim javljanjem primarne ovarijalne insuficijencije u odnosu na kontrolnu grupu (297). Uticaj -418 G/C i -303 C/T polimorfizama *TIMP-2* gena na razvoj navedenih bolesti može se objasniti variranjem nivoa *TIMP-2* u plazmi kao posledice uticaja na različitu gensku ekspresiju ovih SNP varijanti, što potencijalno može dovesti do narušavanja ravnoteže između *MMP* i *TIMP* i delovati na razvoj, ali i egzacerbaciju ovih oboljenja.

Pretraživanjem literature nismo uspeli da pronađemo nijednu studiju koja je ispitivala *TIMP-2* polimorfizme od našeg interesa i IMU. Štaviše, veoma je oskudan i broj studija koje su ispitivale uticaj drugih polimorfizama *TIMP-2* gena na nastanak IMU.

Studija koju su sproveli Guo i saradnici ukazala je da je T alel, u dominantnom modelu, rs4789936 polimorfizma *TIMP-2* gena statistički značajno ređi kod pacijenata sa IMU kao posledice ateroskleroze velikih arterija u poređenju sa kontrolnom grupom. U istoj studiji nije pronađena asocijacija ostalih ispitivanih SNP varijanti *TIMP-2* gena (među kojima je i -303 C/T polimorfizam) čak ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom i recesivnom modelu (193). Studija koju su

sproveli kineski naučnici je ukazala na značajnu povezanost A alela *TIMP-2* -269 C/A polimorfizma i povećane incidencije sICH kod starijih muškaraca, dok je AA genotip *TIMP-2* -261 G/A polimorfizma delovao protektivno kod žena starije životne dobi (298). Rezultati studije sprovedene u Nemačkoj su bili u saglasnosti sa studijom koju su sproveli Guo i saradnici koji su, takođe, ukazali da AA genotip -261 G/A polimorfizma *TIMP-2* gena statistički značajno povećava incidenciju javljanja ICH, uprkos činjenici da nivoi *TIMP-2* u serumu nisu dostigli statističko značajno niže koncentracije od očekivanih (173).

Različite koncentracije *TIMP-2*, nastale usled uticaja ispitivanih SNP varijanti na gensku ekspresiju, mogu dovesti do narušavanja balansa između *TIMP-2* i *MMP-2* koji predstavlja jedan od patofizioloških mehanizama nastanka HT nakon IMU, a posebno nakon IMU lečenog rtPA terapijom ili dovesti do egzarcebacije IMU (194). Međutim, u već pomenutoj studiji, nije pronađena statistički značajna povezanost nivoa *TIMP-2* u plazmi i oporavka pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom ili pojavom HT nakon primene iste (283), dok je druga studija ukazala na tendenciju ka postojanju povezanosti između povećanja odnosa *MMP-9/TIMP-2* i pojave HT kod pacijenata sa IMU lečenih trombolitičkom terapijom (194).

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 nije se bavila nijedna studija uključena u NCBI bazu.

U našoj studiji nismo pronašli statistički značajnu povezanost genotipova, ni alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma i oporavka pacijenata sa IMU lečenih rtPA terapijom, kao ni povezanost ovog polimorfizma sa pojavom rtPA indukovane HT, ili sICH, čak ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom, odnosno recesivnom modelu. Uprkos činjenici da su osobe nosioci T alela (CT+TT genotipovi) imale tendenciju za bolji oporavak, statistička značajnost nije dostignuta ($p=0,159$). Izostanak povezanosti ovog polimorfizma i javljanja HT može se objasniti malim uticajem ispitivanog polimorfizma na ekspresiju gena, ali i činjenicom da je uzorak obuhvaćen u našoj studiji nedovoljno veliki za konačne zaključke.

Međutim, nakon analize gen-gen interakcije između genotipova *TIMP-2* i *MMP-9* gena, čak 60,5% pacijenata sa lošim oporavkom nakon IMU lečenog rtPA istovremeno je imao CC genotip *TIMP-2* -303 C/T i CC genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama, što je predstavljalo statistički značajno veću učestalost nego kod osoba sa dobrim oporavkom ($p=0,050$).

U našoj studiji smo uočili statistički značajnu razliku u učestalosti genotipova *TIMP-2* -303 C/T i *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama između pacijenata sa i bez hemoragijske transformacije

($p=0,033$). 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 ($p<0,001$). Zbog malih učestalosti, analiza odnosa šansi i rizika nije mogla da potvrdi dobijene rezultate. 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 na, još uvek, nerazjašnjen način dovodi do pojačavanja ovog efekta, što rezultira češćom pojavom HT, sICH i drugih hemoragija.

Dodatno smo pratili i pojavu sistemskog krvarenja, kao komplikacije trombolitičke terapije, i uočili da su sve osobe sa sistemskim krvarenjem imale istovremeno GG genotip -790 T/G polimorfizma *MMP-2* gena i CC genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma ($p=0,032$). Ovi rezultati su u suprotnosti u odnosu na naše prethodno navedene rezultate, gde se vidi povezanost TT genotipa *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma i HT. Treba imati u vidu da je ovo prva studija koja se bavila uticajem *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma i pojave komplikacija rtPA terapije kod pacijenata sa IMU i da je broj pacijenata koji su razvili sistemsko krvarenje mali (četiri pacijenta), a uticaj *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma na ekspresiju *TIMP-2* gena nerazjašnjen, tako da, osim mogućnosti da se analizirani polimorfizmi nalaze u vezi sa drugim polimorfizmom, trenutno nije moguće diskutovati ove kontradiktorne rezultate.

Sa druge strane, kod pacijenata koji su istovremeno imali CC genotip *MMP-2* -735 C/T i TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizama, statistički značajno češće se javilo neko drugo intrakranijalno krvarenje ($p=0,011$), kao i sICH ($p=0,031$) u odnosu na pacijente sa drugim udruženim genotipovima, ali detaljnom analizom statistička značajnost nije potvrđena.

Finalno, svih 166 pacijenata u našoj studiji je bilo homozigotno za G alel za ispitivani -418 G/C polimorfizam *TIMP-2* gena. Polimorfizmi -303 C/T i -418 G/C su najviše proučivani polimorfizmi *TIMP-2* gena, pogotovo zajedno, ali i pojedinačno i u kombinaciji sa polimorfizmima *MMP-2* gena. Imajući u vidu povezanosti *TIMP-2* -418 G/C polimorfizma i različitih oboljenja u evropskoj populaciji, smatrali smo da ovaj polimorfizam može da bude potencijalni kandidat za našu studiju, uprkos niskim učestalostima jedne alelne forme. Naime, za razliku od azijske populacije, gde je učestalost G alela *TIMP-2* -418 G/C polimorfizma oko 86%, u evropskoj populaciji je, na osnovu

NCBI baze, ona viša i iznosi oko 99%, s tim što se podaci razlikuju između zemalja. Tako, na primer, u Grčkoj i Nemačkoj učestalosti C alela iznose 2,2%, odnosno 3,6%, respektivno (293). Na osnovu rezultata naše studije možemo pretpostaviti da je u našoj populaciji učestalost C alela -418 G/C polimorfizma *TIMP-2* gena izuzetno niska, iako treba imati u vidu uticaj relativno malog broja analiziranih pacijenata na ovakav rezultat.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima studije, a na osnovu dobijenih rezultata, možemo doneti sledeće zaključke:

1. Učestalosti genotipova i alela kod pacijenata sa ishemijskim moždanim udarom za sve ispitivane polimorfizme su u saglasnosti sa prijavljenim učestalostima u NCBI bazi;
2. Nema razlike u učestalosti genotipova, kao ni alela ispitivanih polimorfizama u odnosu na efikasnost trombolitičke terapije rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena kod pacijenata sa ishemijskim moždanim udarom, ni nakon grupisanja genotipova po dominantnom, ni po recesivnom modelu;
3. 5G/5G genotip *PAI-1* 4G/5G polimorfizma je povezan sa sistemskim krvarenjem, ali i agitacijom, kao komplikacijama trombolitičke terapije;
4. D/D genotip *ACE* I/D polimorfizma je povezan sa sistemskim krvarenjem, kao jednom od komplikacija trombolitičke terapije;
5. GG genotip *MMP-2* -1575 G/A, CC genotip *MMP-2* -1306 C/T ili TT genotip *MMP-2* -790 T/G polimorfizama su ređi kod pacijenata koji su imali prethodni IMU;
6. GCTC haplotip (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G, -735 C/T) *MMP-2* gena je ređi kod pacijenata sa rekurentnim IMU;
7. Osobe sa GCT haplotipom (-1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G) *MMP-2* gena češće su imale parenhimski hematoma tip 1, dok su osobe sa istim haplotipom ređe imale alergijsku reakciju na rtPA;
8. 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 hematoma tip 2;
9. Sve osobe sa sistemskim krvarenjem su istovremeno imale GG genotip *MMP-2* -1575 G/A polimorfizma i CC genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma;
10. Osobe koje su istovremeno imale TT genotip *TIMP-2* -303 C/T polimorfizma i TT genotip *MMP-9* -1562 C/T polimorfizma češće su imale HT, sICH, kao i druga intrakranijalna krvarenja (proširena iz ishemičnih hemoragija - intraventrikularna krvarenja ili SAH) nakon trombolitičke terapije.

7. LITERATURA

1. Čovičković Šternić N, Beslac Bumbaširević L, Žarkov M, Raičević R, Tončev G, Živković M, et al. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse- Ishemijski moždani udar. Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije. 2012.
2. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke*. 2013;44(7):2064–89.
3. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38–48.
4. Adams H, Bendixen B, Kappelle L, Biller J, Love B, Gordon D, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35–41.
5. Kim BJ, Kim JS. Ischemic stroke subtype classification: an asian viewpoint. *J Stroke*. 2014;16(1):8–17.
6. Chin JH, Vora N. The global burden of neurologic diseases. *Neurology*. 2014;83(4):349–51.
7. Bennett DA, Krishnamurthi RV, Barker-Collo S, Forouzanfar MH, Naghavi M, Connor M et al. The global burden of ischemic stroke: Findings of the GBD 2010 study. *Glob Heart*. 2014;9(1):107–12.
8. Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, Chugh S, et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol*. 2016;15(9):913–24.
9. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–128.
10. World Health Organization (WHO). Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030. Vol. 3, World Health Organization (WHO). World Health Organization; 2013.
11. Katan M, Luft A. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol*. 2018;38(2):208–11.
12. Medic S, Beslac-Bumbasirevic L, Kistic-Tepavcevic D, Pekmezovic T. Short-Term and Long-Term Stroke Survival: The Belgrade Prognostic Study. *J Clin Neurol*. 2013;9(1):14.
13. Astrup J. Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg*. 1982;56(4):482–97.
14. Cruz-Flores S. Acute stroke and transient ischemic attack in the outpatient clinic. *Med Clin*

- North Am. 2017;101(3):479–94.
15. Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack. *Stroke*. 2009;40(6):2276–93.
 16. Johnston SC, Gress DR, Browner WS, Stephen S. Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA. *J Am Med Assoc*. 2000;284(22):2901–6.
 17. Siket MS, Edlow JA. Transient ischemic attack. reviewing the evolution of the definition, diagnosis, risk stratification, and management for the emergency physician. *Emerg Med Clin North Am*. 2012;30(3):745–70.
 18. Sierra C, Coca A, Schiffrin EL. Vascular mechanisms in the pathogenesis of stroke. *Curr Hypertens Rep*. 2011;13(3):200–7.
 19. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*. 1998;78(1):53–97.
 20. Farrall AJ, Wardlaw JM. Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease - systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging*. 2009;30(3):337–52.
 21. Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:231.
 22. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007;184(1–2):53–68.
 23. Mehta SL, Manhas N, Raghurir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 2007;54(1):34–66.
 24. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's principles of Internal Medicine*, 18e. New York, NY: McGraw-Hill. 2012.
 25. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;87(1):179–97.
 26. Murphy TH, Li P, Betts K, Liu R. Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines. *J Neurosci*. 2008;28(7):1756–72.
 27. Rama R, Garcia Rodriguez JC. Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. In: *Acute Ischemic Stroke*. 2012. p. 29–58.
 28. Besancon E, Guo S, Lok J, Tymianski M, Lo EH. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(5):268–75.
 29. Xu L, Emery JF, Ouyang YB, Voloboueva LA, Giffard RG. Astrocyte targeted overexpression of Hsp72 or SOD2 reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia*.

- 2010;58(9):1042–9.
30. Caplan L. *Caplan's Stroke*, 5e. Cambridge University Press. 2016.
 31. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008;55(3):310–8.
 32. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2014;115:157–88.
 33. Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. Secondary Ca²⁺ overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. *Brain Res*. 1993;607(1–2):319–23.
 34. Berdichevsky E, Riveros N, Sánchez-Armáss S, Orrego F, Kainate N. N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neurosci Lett*. 1983;36(1):75–80.
 35. Liu B, Liao M, Mielke JG, Ning K, Chen Y, Li L, et al. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci*. 2006;26(20):5309–19.
 36. Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*. 2006;49(5):719–33.
 37. Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 1998;18(24):10277–86.
 38. Abramov AY, Duchen MR. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(7–8):953–64.
 39. Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci*. 1998;1(5):366–73.
 40. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*. 1999;399(6738 Suppl):A7–14.
 41. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor - still lethal after eight years. *Trends Neurosci*. 1995;18(2):57–8.
 42. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*. 2009;4(6):461–70.
 43. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke*. 2001;32(11):2712–6.
 44. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2017;38(7):1167–86.

45. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 2004;1(1):17–25.
46. Yang JL, Mukda S, Chen S. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke. *Redox Biol*. 2018;16:263–75.
47. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res*. 2017;120(3):439–48.
48. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res*. 2017;120(3):472–95.
49. Hill VA, Towfighi A. Modifiable Risk Factors for Stroke and Strategies for Stroke Prevention. *Semin Neurol*. 2017;37(3):237–58.
50. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. Vol. 139, *Circulation*. 2019. 56–528 p.
51. Seshadri S, Beiser A, Pikula A, Himali JJ, Kelly-Hayes M, Debette S, et al. Parental occurrence of stroke and risk of stroke in their children: the framingham study. *Circulation*. 2010;121(11):1304–12.
52. Cordonnier C, Leys D. Stroke: the bare essentials. *Pract Neurol*. 2008;8(4):263–72.
53. Fernandes PM, Whiteley WN, Hart SR, Al-Shahi Salman R. Strokes: Mimics and chameleons. *Pract Neurol*. 2013;13(1):21–8.
54. El-Koussy M, Schroth G, Brekenfeld C, Arnold M. Imaging of acute ischemic stroke. *Eur Neurol*. 2014;72(5–6):309–16.
55. Sandercock PAG, Counsell C, Tseng MC, Cecconi E. Oral antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(3):CD000029.
56. Sinha S, Warburton EA. The evolution of stroke units - Towards a more intensive approach? *QJM*. 2000;93(9):633–8.
57. Rabinstein AA. Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2017;23(1):62–81.
58. Del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams HP. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: A science advisory from the American heart association/american stroke association. *Stroke*. 2009;40(8):2945–8.
59. Saver JL, Fonarow GC, Smith EE, Reeves MJ, Grau-Sepulveda M V., Pan W, et al. Time to treatment with intravenous tissue plasminogen activator and outcome from acute ischemic stroke. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2013;309(23):2480–8.
60. Zerna C, Hegedus J, Hill MD. Evolving Treatments for Acute Ischemic Stroke. *Circ Res*. 2016;118(9):1425–42.

61. Sussman BJ, Fitch TSP. Thrombolysis with fibrinolytic in cerebral arterial occlusion. *J Am Med Assoc.* 1958;167(14):1705–9.
62. Brott T, Broderick J, Kothari R, O'Donoghue M, Barsan WG, Tomsick T, et al. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581–8.
63. The Multicenter Acute Stroke Trial - Europe Study Group, Hommel M, Cornu C, Boutitie F, Boissel JP. Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1996;335(3):145–50.
64. Johnston SC, Fung LH, Gillum LA, Smith WS, Brass LM, Lichtman JH, et al. Utilization of intravenous tissue-type plasminogen activator for ischemic stroke at academic medical centers: The influence of ethnicity. *Stroke.* 2001;32(5):1061–8.
65. Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, Hacke W, Millán M, Muir K, et al. Thrombolysis with alteplase 3-4·5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet.* 2008;372(9646):1303–9.
66. Acheampong P, Ford GA. Pharmacokinetics of alteplase in the treatment of ischaemic stroke. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012;8(2):271–81.
67. Kane I, Sandercock P. Alteplase: Thrombolysis for acute ischemic stroke. *Therapy.* 2005;2(5):709–16.
68. Donnan GA, Baron JC, Ma H, Davis SM. Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. *Lancet Neurol.* 2009;8(3):261–9.
69. Saver JL. Time is brain - Quantified. *Stroke.* 2006;37(1):263–6.
70. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. Vol. 49, *Stroke.* 2018. 46–110 p.
71. Chapman SN, Mehndiratta P, Johansen MC, McMurry TL, Johnston KC, Southerland AM. Current perspectives on the use of intravenous recombinant tissue plasminogen activator (tPA) for treatment of acute ischemic stroke. *Vasc Health Risk Manag.* 2014;10:75–87.
72. Murray V, Norrving B, Sandercock PAG, Terént A, Wardlaw JM, Wester P. The molecular basis of thrombolysis and its clinical application in stroke. *J Intern Med.* 2010;267(2):191–208.
73. Albers GW, Olivot JM. Intravenous alteplase for ischaemic stroke. *Lancet.* 2007;369(9558):249–50.
74. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Bruno A, Connors JJB, Demaerschalk BM, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.*

2013;44(3):870–947.

75. Badhiwala JH, Nassiri F, Alhazzani W, Selim MH, Farrokhlyar F, Spears J, et al. Endovascular thrombectomy for acute ischemic stroke ameta-analysis. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2015;314(17):1832–43.
76. Babu MS, Prabha TS, Kaul S, Al-Hazzani A, Shafi G, Roy S, et al. Association of genetic variants of fibrinolytic system with stroke and stroke subtypes. *Gene.* 2012;495(1):76–80.
77. Oates JA, Loscalzo J et al. Drug Therapy Tissue Plasminogen Activator. *N Engl J Med.* 1988;319(4):925–31.
78. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood.* 1991;78(12):3114–24.
79. Loscalzo J BE. Tissue plasminogen activator. *N Engl J Med.* 1988;319(14):925–31.
80. Hébert M, Lesept F, Vivien D, Macrez R. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(3):186–97.
81. Collen D, Lijnen H. Tissue-type plasminogen activator: A historical perspective and personal account. *J Thromb Haemost.* 2004;2(4):541–6.
82. Gerard R. Regulation Of Tissue Plasminogen Activator Expression. *Annu Rev Physiol.* 1989;51(1):245–62.
83. Sheehan JJ, Tsirka SE. Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: a review. *Glia.* 2005;50(4):340–50.
84. Zaheer Z, Robinson T, Mistri AK. Thrombolysis in acute ischaemic stroke: An update. *Ther Adv Chronic Dis.* 2011;2(2):119–31.
85. Jickling GC, Liu D, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Lu A, et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(2):185–99.
86. Jin R, Yang G, Li G. Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: Critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis.* 2010;38(3):376–85.
87. Pande SD, Win MM, Khine AA, Zaw EM, Manoharraj N, Lolong L, et al. Haemorrhagic transformation following ischaemic stroke: A retrospective study. *Sci Rep.* 2020;10(1):5319.
88. Larrue V, Von Kummer R, Müller A, Bluhmki E. Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: A secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II). *Stroke.* 2001;32(2):438–41.
89. Yaghi S, Willey JZ, Cucchiara B, Goldstein JN, Gonzales NR, Khatri P, et al. Treatment and outcome of hemorrhagic transformation after intravenous alteplase in acute ischemic stroke a

- scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2017;48(12):e343–61.
90. Pereira AC, Martin PJ, Warburton EA. Thrombolysis in acute ischaemic stroke. *Postgrad Med J*. 2001;77(905):166–71.
 91. Fröhlich K, MacHa K, Gerner ST, Bobinger T, Schmidt M, Dörfler A, et al. Angioedema in Stroke Patients with Thrombolysis: A Lesion Mapping Study. *Stroke*. 2019;50(7):1682–7.
 92. Alvarez V, Rossetti AO, Papavasileiou V, Michel P. Acute seizures in acute ischemic stroke: Does thrombolysis have a role to play? *J Neurol*. 2013;260(1):55–61.
 93. Mican J, Toul M, Bednar D, Damborsky J. Structural Biology and Protein Engineering of Thrombolytics. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:917–38.
 94. Relling M, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature*. 2015;526(7573):343–50.
 95. Billeci AM, Agnelli G, Caso V. Stroke pharmacogenomics. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(18):2947–57.
 96. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med*. 2011;364(12):1144–53.
 97. Verbelen M, Weale ME, Lewis CM. Cost-effectiveness of pharmacogenetic-guided treatment: Are we there yet? *Pharmacogenomics J*. 2017;17(5):35–402.
 98. Ross S, Paré G. Pharmacogenetics of stroke. *Stroke*. 2018;49(10):2541–8.
 99. Liao D, Myers R, Hunt S, Shahar E, Paton C, Burke G, et al. Familial history of stroke and stroke risk: The Family Heart Study. *Stroke*. 1997;28(10):1908–12.
 100. Bak S, Gaist D, Sindrup SH, Skytthe A, Christensen K. Genetic liability in stroke: A long-term follow-up study of Danish twins. *Stroke*. 2002;33(3):769–74.
 101. Flossmann E, Schulz UGR, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke*. 2004;35(1):212–27.
 102. Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: A review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol*. 2003;2(1):43–53.
 103. Lindgren A. Stroke genetics: a review and update. *J Stroke*. 2014;16(3):114–23.
 104. Falcone GJ, Malik R, Dichgans M, Rosand J. Current concepts and clinical applications of stroke genetics. *Lancet Neurol*. 2014;13(4):405–18.
 105. Della-Morte D, Guadagni F, Palmirotta R, Testa G, Caso V, Paciaroni M, et al. Genetics of ischemic stroke, stroke-related risk factors, stroke precursors and treatments. *Pharmacogenomics*. 2012;13(5):595–613.
 106. Leys D, Bandu L, Hénon H, Lucas C, Mounier-Vehier F, Rondepierre P, et al. Clinical outcome in 287 consecutive young adults (15 to 45 years) with ischemic stroke. *Neurology*.

2002;59(1):26–33.

107. Chauhan G, Debette S. Genetic risk factors for ischemic and hemorrhagic stroke. *Curr Cardiol Rep.* 2016;18(12):124.
108. Culverhouse R, Suarez BK, Lin J, Reich T. A perspective on epistasis: Limits of models displaying no main effect. *Am J Hum Genet.* 2002;70(2):461–71.
109. Liu J, Sun K, Bai Y, Zhang W, Wang X, Wang Y, et al. Association of three-gene interaction among MTHFR, ALOX5AP and NOTCH3 with thrombotic stroke: A multicenter case-control study. *Hum Genet.* 2009;125(5–6):649–56.
110. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1–7.
111. Carty CL, Bužková P, Fornage M, Franceschini N, Cole S, Heiss G, et al. Associations between incident ischemic stroke events and stroke and cardiovascular disease-related genome-wide association studies single nucleotide polymorphisms in the population architecture using genomics and epidemiology study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(2):210–6.
112. Del Río-Espínola A, Fernández-Cadenas I, Giralt D, Quiroga A, Gutiérrez-Agulló M, Quintana M, et al. A predictive clinical-genetic model of tissue plasminogen activator response in acute ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2012;72(5):716–29.
113. Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet.* 2010;11(6):446–50.
114. Schulz UGR, Flossmann E, Rothwell PM. Heritability of ischemic stroke in relation to age, vascular risk factors, and subtypes of incident stroke in population-based studies. *Stroke.* 2004;35(4):819–24.
115. Jerrard-Dunne P, Cloud G, Hassan A, Markus HS. Evaluating the genetic component of ischemic stroke subtypes: A family history study. *Stroke.* 2003;34(6):1364–9.
116. Lövkvist H, Sjögren M, Höglund P, Engström G, Jern C, Olsson S, et al. Are 25 SNPs from the CARDIoGRAM study associated with ischaemic stroke? *Eur J Neurol.* 2013;20(9):1284–91.
117. Bevan S, Traylor M, Adib-Samii P, Malik R, Paul NLM, Jackson C, et al. Genetic heritability of ischemic stroke and the contribution of previously reported candidate gene and genomewide associations. *Stroke.* 2012;43(12):3161–7.
118. Matarin M, Singleton A, Hardy J, Meschia J. The genetics of ischaemic stroke. *J Intern Med.* 2010;267(2):139–55.
119. Söderholm M, Pedersen A, Lorentzen E, Stanne TM, Bevan S, Olsson M, et al. Genome-

- wide association meta-analysis of functional outcome after ischemic stroke. *Neurology*. 2019;92(12):e1271–83.
120. Zaleska MM, Mercado MLT, Chavez J, Feuerstein GZ, Pangalos MN, Wood A. The development of stroke therapeutics: Promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology*. 2009;56(2):329–41.
 121. Pekna M, Pekny M, Nilsson M. Modulation of neural plasticity as a basis for stroke rehabilitation. *Stroke*. 2012;43(10):2819–28.
 122. Meschia JF. Pharmacogenetics and stroke. *Stroke*. 2009;40(11):3641–5.
 123. Psaty BM, Smith NL, Heckbert SR, Vos HL, Lemaitre RN, Reiner AP, et al. Diuretic therapy, the α -adducin gene variant, and the risk of myocardial infarction or stroke in persons with treated hypertension. *J Am Med Assoc*. 2002;287(13):1680–9.
 124. Shields DC, Fitzgerald AP, O’neill PA, Muckian C, Kenny D, Moran B, et al. The contribution of genetic factors to thrombotic and bleeding outcomes in coronary patients randomised to IIb/IIIa antagonists. *Pharmacogenomics J*. 2002;2(3):182–90.
 125. He W, Lu M, Li G, Sun Z, Liu D, Gu L. Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) rs868014 Polymorphism Regulated by miR-1203 Associates with Risk and Short Term Outcome of Ischemic Stroke. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(2):701–10.
 126. Qin L, Jing D, Parauda S, Carmel J, Ratan RR, Lee FS, et al. An adaptive role for BDNF Val66Met polymorphism in motor recovery in chronic stroke. *J Neurosci*. 2014;34(7):2493–502.
 127. Cramer SC, Procaccio V. Correlation between genetic polymorphisms and stroke recovery: Analysis of the GAIN Americas and GAIN International Studies. *Eur J Neurol*. 2012;19(5):718–24.
 128. Balcerzyk A, Zak I, Emich-Widera E, Kopyta I, Iwanicki T, Pilarska E, et al. The plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism in determining the risk of pediatric ischemic stroke case control and family-based study. *Neuropediatrics*. 2011;42(2):67–70.
 129. Macko RF, Kittner SJ, Epstein A, Cox DK, Wozniak MA, Wityk RJ, et al. Elevated tissue plasminogen activator antigen and stroke risk: The stroke prevention in young women study. *Stroke*. 1999;30(1):7–11.
 130. Lijnen HR, Collen D. Impaired fibrinolysis and the risk for coronary heart disease. *Circulation*. 1996;94(9):2052–4.
 131. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):35–45.
 132. Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1 and the calculus of mortality after myocardial infarction. *Circulation*. 2003;108(4):376–7.

133. Tjärnlund-Wolf A, Brogren H, Lo EH, Wang X. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases. *Stroke*. 2012;43(10):2833–9.
134. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb Res*. 2008;122(6):736–42.
135. Serrano R, Barrenetxe J, Orbe J, Rodríguez JA, Gallardo N, Martínez C, et al. Tissue-specific PAI-1 gene expression and glycosylation pattern in insulin-resistant old rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(5):1563–9.
136. Benchenane K, López-Atalaya JP, Fernández-Monreal M, Touzani O, Vivien D. Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends Neurosci*. 2004;27(3):155–60.
137. Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Oda M, Harada E, Watanabe T, et al. Autocrine and paracrine up-regulation of blood-brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1. *Microvasc Res*. 2011;81(1):103–7.
138. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): A key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther*. 2010;28(5):e72–91.
139. Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(23):8548–52.
140. Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis*. 1991;5(4):197–206.
141. Eriksson P, Kallin B, Van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen- activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(6):1851–5.
142. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 1993;268(15):10739–45.
143. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000;342(24):1792–801.
144. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation*. 1994;90(5):2199–202.
145. Yuan H, Wang X, Xia Q, Ge P, Wang X, Cao X. Angiotensin converting enzyme (I/D) gene polymorphism contributes to ischemic stroke risk in Caucasian individuals: A meta-analysis

- based on 22 case-control studies. *Int J Neurosci.* 2016;126(6):488–98.
146. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, et al. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest.* 1994;94(3):978–84.
 147. Raynolds M V., Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 1993;342(8879):1073–5.
 148. Ehlers MRW, Riordan JF. Angiotensin-Converting Enzyme: New Concepts Concerning Its Biological Role. *Biochemistry.* 1989;28(3):5311–8.
 149. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):11–34.
 150. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:317–25.
 151. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, Van Duijn CM, Wittteman JCM. ACE polymorphisms. *Circ Res.* 2006;98(9):1123–33.
 152. Henriksen EJ, Jacob S. Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *J Cell Physiol.* 2003;196(1):171–9.
 153. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Curr Biol.* 2002;12(21):742–52.
 154. Sturrock ED, Natesh R, Van Rooyen JM, Acharya KR. Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(21):2677–86.
 155. Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: Relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med.* 1991;117(1):33–9.
 156. Moore JH, Smolkin ME, Lamb JM, Brown NJ, Vaughan DE. The relationship between plasma t-PA and PAI-1 levels is dependent on epistatic effects of the ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms. *Clin Genet.* 2002;62(1):53–9.
 157. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990;86(4):1343–6.
 158. Fernández-Cadenas I, Molina CA, Álvarez-Sabín J, Ribó M, Penalba A, Ortega-Torres L, et al. ACE gene polymorphisms influence t-PA-induced brain vessel reopening following ischemic stroke. *Neurosci Lett.* 2006;398(3):167–71.
 159. Feener EP, Northrup JM, Aiello LP, King GL. Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest.*

- 1995;95(3):1353–62.
160. Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Alvarez-Sabín J. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost.* 2004;91(6):1146–51.
 161. Amici S, Paciaroni M, Agnelli G, Caso V. Gene-drug interaction in stroke. *Stroke Res Treat.* 2011;2011:14p.
 162. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827–39.
 163. Chang JJ, Stanfill A, Pourmotabbed T. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in ischemic stroke. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8):1323.
 164. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147(617):1–73.
 165. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke.* 1998;29(10):2189–95.
 166. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M. Matrix Metalloproteinases. *Curr Med Chem.* 2010;17(31):3751–68.
 167. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562–73.
 168. Hannocks MJ, Zhang X, Gerwien H, Chashchina A, Burmeister M, Korpos E, et al. The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. *Matrix Biol.* 2019;75–76:102–13.
 169. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(6):455–61.
 170. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161–74.
 171. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 - and 1/4 -length fragments. *J Biol Chem.* 1995;270(11):5872–6.
 172. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, et al. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation.* 1995;92(6):1393–8.
 173. Reuter B, Bugert P, Stroick M, Bukow S, Griebel M, Hennerici MG, et al. TIMP-2 gene polymorphism is associated with intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis.*

2009;28(6):558–63.

174. Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamon M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A, et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol.* 2008;84(1):207–14.
175. Gołąb P, Boguszevska-Czubara A, Kielbus M, Kurzepa J. The rtPA increases MMP-9 activity in serum during ischaemic stroke. *Neurol Neurochir Pol.* 2014;48(5):309–14.
176. Carbone F, Vuilleumier N, Bertolotto M, Burger F, Galan K, Roversi G, et al. Treatment with recombinant tissue plasminogen activator (r-TPA) induces neutrophil degranulation in vitro via defined pathways. *Vascul Pharmacol.* 2015;64:16–27.
177. ADAMS RD. Observations on brain embolism with special reference to the mechanism of hemorrhagic infarction. *J Clin Invest.* 1950;29(6):795.
178. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem.* 1990;265(19):11077–82.
179. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. Role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7549–58.
180. Qin H, Sun Y, Benveniste EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem.* 1999;274(41):29130–7.
181. Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Rahimi Z, Tavilani H, Navabi SJ, et al. Matrix metalloproteinase-2 functional promoter polymorphism G1575A is associated with elevated circulatory MMP-2 levels and increased risk of cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2012;21(6):616–24.
182. Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res.* 2004;64(20):7622–8.
183. Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem.* 2016;139:91–114.
184. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;107(12):1579–85.
185. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, De Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99(14):1788–94.
186. Montaner J, Fernández-Cadenas I, Molina CA, Monasterio J, Arenillas JF, Ribó M, et al.

- Safety profile of tissue plasminogen activator treatment among stroke patients carrying a common polymorphism (C-1562T) in the promoter region of the matrix metalloproteinase-9 gene. *Stroke*. 2003;34(12):2851–5.
187. Murphy G, O'Shea M, Houbrechts A, Cockett MI, Docherty AJP, Williamson RA. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*. 1991;30(33):8097–102.
 188. Lenglet S, Montecucco F, Mach F, Schaller K, Gasche Y, Copin JC. Analysis of the expression of nine secreted matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in the brain of mice subjected to ischaemic stroke. *Thromb Haemost*. 2014;112(2):363–78.
 189. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 2000;1477(1–2):267–83.
 190. Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res*. 1998;8(3):179–86.
 191. Bernardo MM, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J*. 2003;374(3):739–45.
 192. De Clerck YA, Darville MI, Eeckhout Y, Rousseau GG. Characterization of the promoter of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Gene*. 1994;139(2):185–91.
 193. Guo T, Hao H, Zhou L, Zhou F, Yu D. Association of SNPs in the TIMP-2 gene and large artery atherosclerotic stroke in southern Chinese Han population. *Oncotarget*. 2018;9(4):4698–706.
 194. Piccardi B, Palumbo V, Nesi M, Nencini P, Gori AM, Giusti B, et al. Unbalanced metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases ratios predict hemorrhagic transformation of lesion in ischemic stroke patients treated with thrombolysis: Results from the MAGIC study. *Front Neurol*. 2015;6(MAY):1–7.
 195. Mikołajczyk-Stecyna J, Korcz A, Gabriel M, Pawlaczyk K, Oszkinis G, Słomski R. Gene polymorphism -418 G/C of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 is associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2015;61(5):1114–9.
 196. Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock AM, Schmutte C, Henriët P, et al. Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem*. 1996;271(41):25498–505.
 197. Kubben F, Sier C, Meijer M, Van Den Berg M, Van Der Reijden JJ, Griffioen G, et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer*.

- 2006;95(6):744–51.
198. Powers DW. Assessment of the stroke patient using the NIH stroke scale. *Emerg Med Serv.* 2001;30(6):52–6.
 199. Duncan PW. Outcome measures in stroke rehabilitation. *Handb Clin Neurol.* 2013;110:105–11.
 200. Broderick JP, Adeoye O, Elm J. Evolution of the Modified Rankin Scale and Its Use in Future Stroke Trials. *Stroke.* 2017;48(7):2007–12.
 201. Yeatts SD, Broderick JP, Chatterjee A, Jauch EC, Levine SR, Romano JG, et al. Alteplase for the treatment of acute ischemic stroke in patients with low National Institutes of Health Stroke Scale and not clearly disabling deficits (Potential of rtPA for Ischemic Strokes with Mild Symptoms PRISMS): Rationale and design. *Int J Stroke.* 2018;13(6):654–61.
 202. Weisscher N, Vermeulen M, Roos YB, De Haan RJ. What should be defined as good outcome in stroke trials; A modified Rankin score of 0-1 or 0-2? *J Neurol.* 2008;255(6):867–74.
 203. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
 204. Lo YMD, Chan KCA. Introduction to the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2006;336:1–10.
 205. Waters D FMSF. *The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods.* 2014;1099(1):97–115.
 206. Butler JM, Reeder DJ. Detection of DNA polymorphisms using PCR-RFLP and capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2001;163:49–56.
 207. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2–3):95–125.
 208. Green MR, Sambrook J. Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(10):769–77.
 209. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (80-).* 2002;296(5576):2225–9.
 210. Currie S, Sinclair M, Murphy MH, Madden E, Dunwoody L, Liddle D. Reducing the decline in physical activity during pregnancy: a systematic review of behaviour change interventions. *PLoS One.* 2013;8(6):e66385.
 211. Muroet W, Rudd A, Wolfe CDA, Douiri A. Long-term survival after intravenous thrombolysis for ischemic stroke: A propensity score-matched cohort with up to 10-year follow-up. *Stroke.* 2018;49(3):607–13.
 212. Boudreau DM, Guzauskas GF, Chen E, Lalla D, Tayama D, Fagan SC, et al. Cost-

- effectiveness of recombinant tissue-type plasminogen activator within 3 hours of acute ischemic stroke: Current evidence. *Stroke*. 2014;45(10):3032–9.
213. Lansberg MG, Albers GW, Wijman CAC. Symptomatic intracerebral hemorrhage following thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: A review of the risk factors. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24(1):1–10.
 214. Munshi A, Sharma V. Genetic Signatures in the Treatment of Stroke. *Curr Pharm Des*. 2014;21(3):343–54.
 215. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333(24):1581–7.
 216. Broderick J, Lu M, Jackson C, Pancioli A, Tilley BC, Fagan SC, et al. Apolipoprotein E phenotype and the efficacy of intravenous tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2001;49(6):736–44.
 217. Fernandez-Cadenas I, Alvarez-Sabin J, Ribo M, Rubiera M, Mendioroz M, Molina CA, et al. Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost*. 2007;5(9):1862–8.
 218. González-Conejero R, Fernández-Cadenas I, Iniesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabín J, et al. Role of fibrinogen levels and factor XIII V34L polymorphism in thrombolytic therapy in stroke patients. *Stroke*. 2006;37(9):2288–93.
 219. Fernández-Cadenas I, Del Río-Espínola A, Giralt D, Domingues-Montanari S, Quiroga A, Mendióroz M, et al. IL1B and VWF variants are associated with fibrinolytic early recanalization in patients with ischemic stroke. *Stroke*. 2012;43(10):2659–65.
 220. Hu X, Zan X, Xie Z, Li Y, Lin S, Li H, et al. Association Between Plasminogen Activator Inhibitor-1 Genetic Polymorphisms and Stroke Susceptibility. *Mol Neurobiol*. 2017;54(1):328–41.
 221. Abboud N, Ghazouani L, Saidi S, Ben-Hadj-Khalifa S, Addad F, Almawi WY, et al. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A gene polymorphisms and changes in PAI-1/tissue plasminogen activator levels in myocardial infarction: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010;14(1):23–7.
 222. Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, Tormene D, Simioni P, Spiezia L, et al. The PAI-1 gene 4G/5G Polymorphism and Deep Vein Thrombosis in Patients with Inherited Thrombophilia. *Clin Appl Thromb*. 2003;9(4):299–307.
 223. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol*. 2006;56(4):230–6.

224. Vergouwen MD, Frijns CJ, Roos YB, Rinkel GJ, Baas F, Vermeulen M. Plasminogen activator inhibitor-1 4G allele in the 4G/5G promoter polymorphism increases the occurrence of cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2004;35(6):1280–3.
225. Festa A, D'Agostino R, Rich SS, Jenny NS, Tracy RP, Haffner SM. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, hispanics, and non-hispanic whites: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation*. 2003;107(19):2422–7.
226. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, Vecchione G, Celentano E, Cappucci G, et al. Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1994;14(11):1741–5.
227. Wiman B, Hamsten A. The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost*. 1990;16(3):207–16.
228. Hermans PWM, Hibberd ML, Booy R, Daramola O, Hazelzet JA, Groot R De. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet*. 1999;354(9178):556–60.
229. Yamada N, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Watanabe H, Sohda S, Hamada H, et al. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. *J Hum Genet*. 2000;45(3):138–41.
230. Menges T, Hermans PWM, Little SG, Langefeld T, Böning O, Engel J, et al. Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet*. 2001;357(9262):1096–7.
231. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluit C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G Genotype of PAI-1 Gene Is Associated with Reduced Risk of Stroke in Elderly. *Stroke*. 2003;34(12):2822–8.
232. Cao Y, Chen W, Qian Y, Zeng Y, Liu W. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and ischemic stroke risk: A meta-analysis in Chinese population. *Int J Neurosci*. 2014;124(12):874–81.
233. Wiklund PG, Nilsson L, Ardnor SN, Eriksson P, Johansson L, Stegmayr B, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of stroke: Replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts. *Stroke*. 2005;36(8):1661–5.
234. Hindorff LA, Schwartz SM, Siscovick DS, Psaty BM, Longstreth WT, Reiner AP. The association of PAI-1 promoter 4G/5G insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction and stroke in young women. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2002;9(2):131–7.

235. Roest M, Van Der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, De Groot PG, Sixma JJ, et al. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation*. 2000;101(1):67–70.
236. Endler G, Lalouschek W, Exner M, Mitterbauer G, Häring D, Mannhalter C. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promotor region of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene is less frequent in young patients with minor stroke than in controls. *Br J Haematol*. 2000;110(2):469–71.
237. Donkel SJ, Benaddi B, Dippel DWJ, Ten Cate H, De Maat MPM. Prognostic hemostasis biomarkers in acute ischemic stroke: A systematic review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(3):360–72.
238. Fernandez-Cadenas I, Del Rio-Espinola A, Rubiera M, Mendioroz M, Domingues-Montanari S, Cuadrado E, et al. PAI-1 4G/5G polymorphism is associated with brain vessel reocclusion after successful fibrinolytic therapy in ischemic stroke patients. *Int J Neurosci*. 2010;120(4):245–51.
239. Szegedi I, Nagy A, Székely EG, Czuriga-Kovács KR, Sarkady F, Láncki LI, et al. PAI-1 5G/5G genotype is an independent risk of intracranial hemorrhage in post-lysis stroke patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(11):2240–50.
240. Hughes CG, Pandharipande PP, Thompson JL, Chandrasekhar R, Ware LB, Ely EW, et al. Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Injury as Risk Factors for Delirium in Critically Ill Patients*. *Crit Care Med*. 2016;
241. Meade TW, Brozovic M, Chakrabarti RR, Haines AP, Imeson JD, Mellows S, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*. 1986;2(8506):533–7.
242. Wang XL, McCredie RM, Wilcken DE. Genotype distribution of angiotensin-converting enzyme polymorphism in Australian healthy and coronary populations and relevance to myocardial infarction and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(1):115–9.
243. Hassan A, Lansbury A, Catto AJ, Guthrie A, Spencer J, Craven C, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype is associated with leukoaraiosis in lacunar syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72(3):343–6.
244. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: Meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(2):484–92.
245. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via

- membrane NADH/NADPH oxidase activation: Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1916–23.
246. Mogi M, Kawajiri M, Tsukuda K, Matsumoto S, Yamada T, Horiuchi M. Serum levels of renin-angiotensin system components in acute stroke patients. *Geriatr Gerontol Int.* 2014;14(4):793–8.
247. Kalita J, Somarajan BI, Kumar B, Mittal B, Misra UK. A study of ACE and ADD1 polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clin Chim Acta.* 2011;412(7–8):642–6.
248. Tuncer N, Tuglular S, Kiliç G, Sazci A, Us Ö, Kara I. Evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of ischaemic stroke. *J Clin Neurosci.* 2006;13(2):224–7.
249. Zhang Z, Xu G, Liu D, Fan X, Zhu W, Liu X. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *PLoS One.* 2012;7(10):e46495.
250. Malueka RG, Dwianingsih EK, Sutarni S, Bawono RG, Bayuangga HF, Gofir A, et al. The D allele of the angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism is associated with worse functional outcome of ischaemic stroke. *Int J Neurosci.* 2018;128(8):697–704.
251. Pjevic MD, Bumbasirevic LB, Vojvodic L, Grk M, Maksimovic N, Damnjanovic T, et al. 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(1):142–9.
252. Sun Y, Liu Y, Watts LT, Sun Q, Zhong Z, Yang GY, et al. Genetic Associations of Angiotensin-Converting Enzyme with Primary Intracerebral Hemorrhage: A Meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(6):e67402.
253. Liu L, Sun J, Li G, Gu B, Wang X, Chi H, et al. Association between MMP-12-82A/G polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(8):11896–904.
254. Li Y, Sun DL, Duan YN, Zhang XJ, Wang N, Zhou RM, et al. Association of functional polymorphisms in MMPs genes with gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma in high incidence region of North China. *Mol Biol Rep.* 2010;37(1):197–205.
255. Jia P, Wu N, Zhang X, Jia D. Association of matrix metalloproteinase-1 -519A/G polymorphism with acute coronary syndrome: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4):5675–82.
256. Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, et al. Functional polymorphisms of Matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(15):5433–9.

257. Ting WC, Chen LM, Pao JB, Yang YP, You BJ, Chang TY, et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and clinical outcomes in colorectal cancer patients. *Int J Med Sci.* 2013;10(8):1022–7.
258. Hao Y, Tian S, Sun M, Zhu Y, Nie Z, Yang S. Association between matrix metalloproteinase gene polymorphisms and development of ischemic stroke. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11647–52.
259. Nie SW, Wang XF, Tang ZC. Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(2):400–4.
260. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):617–29.
261. Agrawal SM, Lau L, Yong VW. MMPs in the central nervous system: Where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(1):42–51.
262. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: An overview. *Front Biosci.* 2006;11:1696–701.
263. Rosenberg GA, Sullivan N, Esiri MM. White matter damage is associated with matrix metalloproteinases in vascular dementia. *Stroke.* 2001;32(5):1162–8.
264. Moniche F, Montaner J, Gonzalez-Marcos JR, Carmona M, Piñero P, Espigado I, et al. Intra-arterial bone marrow mononuclear cell transplantation correlates with GM-CSF, PDGF-BB, and MMP-2 Serum levels in stroke patients: Results from a clinical trial. *Cell Transplant.* 2014;23(1):57–64.
265. Fatar M, Stroick M, Steffens M, Senn E, Reuter B, Bukow S, et al. Single-nucleotide polymorphisms of MMP-2 gene in stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis.* 2008;26(2):113–9.
266. Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Reiners M, Ford CC. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: Relation to blood-brain barrier injury. *Neurology.* 1996;46(6):1626–32.
267. Zhang L, Ren R, Mu S. The correlation of MMP-2 polymorphisms and stroke. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(2):4460–6.
268. Misra S, Talwar P, Kumar A, Kumar P, Sagar R, Vibha D, et al. Association between matrix metalloproteinase family gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of 29 studies. *Gene.* 2018;672:180–94.
269. Niu F, Wei B, Yan M, Li J, Ouyang Y, Jin T. Matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke in a Hainan population. *Med (United States).* 2018;97(39):e12302.
270. Liu O, Li J, Xin Y, Qin Y, Li H, Gong M, et al. Association of MMP-2 gene haplotypes with thoracic aortic dissection in chinese han population. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16(1):1–

8.

271. Vašků A, Goldbergová M, Hollá LI, Šišková L, Groch L, Beránek M, et al. A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol.* 2004;22(7):585–91.
272. Alp E, Menevse S, Tulmac M, Yilmaz A, Yalcin R, Cengel A. The Role of matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphisms in coronary artery disease and myocardial infarction. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011;15(4):193–202.
273. Manso H, Krug T, Sobral J, Albergaria I, Gaspar G, Ferro JM, et al. Variants of the Matrix Metalloproteinase-2 but not the Matrix Metalloproteinase-9 genes significantly influence functional outcome after stroke. *BMC Med Genet.* 2010;11:40.
274. Němec P, Goldbergová M, Swobodnik T, Polášková D, Souček M, Vašků A. Polymorphism of gene promotor region for MMP-2 in rheumatoid arthritis. *Vnitr Lek.* 2006;52(4):348–54.
275. Habel AF, Ghali RM, Bouaziz H, Daldoul A, Hadj-Ahmed M, Mokrani A, et al. Common matrix metalloproteinase-2 gene variants and altered susceptibility to breast cancer and associated features in Tunisian women. *Tumor Biol.* 2019;41(4):1–8.
276. Wang B, Wang Y, Zhao L. MMP-9 gene rs3918242 polymorphism increases risk of stroke: A meta-analysis. *J Cell Biochem.* 2018;119(12):9801–8.
277. Buraczynska K, Kurzepa J, Ksiazek A, Buraczynska M, Rejdak K. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients. *NeuroMolecular Med.* 2015;17(4):385–90.
278. He T, Wang J, Wang XL, Deng WS, Sun P. Association between the Matrix Metalloproteinase-9 rs3918242 Polymorphism and Ischemic Stroke Susceptibility: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;26(5):1136–43.
279. Szczudlik P, Borratyńska A. Association between the -1562 C/T MMP-9 polymorphism and cerebrovascular disease in a Polish population. *Neurol Neurochir Pol.* 2010;44(4):350–7.
280. Fan ZZ, Ge ZM, Cai H Bin, Liu ZY, Liu P, Wang HY. Association between the MMP-9-1562 C>T polymorphism and the risk of stroke: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014;41(10):6787–94.
281. Wang Y, Zhang L, Huang H, Qin X, Huang Z, Lan J, et al. Relationship between the matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms and ischemic stroke. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(3):949–56.
282. Yuan M, Zhan Q, Duan X, Song B, Zeng S, Chen X, et al. A functional polymorphism at miR-491-5p binding site in the 3'-UTR of MMP-9 gene confers increased risk for atherosclerotic cerebral infarction in a Chinese population. *Atherosclerosis.* 2013;226(2):447–52.

283. Inzitari D, Giusti B, Nencini P, Gori AM, Nesi M, Palumbo V, et al. MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. *Stroke*. 2013;44(10):2901–3.
284. Wang L, Wei C, Deng L, Wang Z, Song M, Xiong Y, et al. The Accuracy of Serum Matrix Metalloproteinase-9 for Predicting Hemorrhagic Transformation After Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(6):1653–65.
285. Ramos-Fernandez M, Bellolio MF, Stead LG. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: A systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2011;20(1):47–54.
286. Graham CA, Chan RW, Chan DY, Chan CP, Wong LK, Rainer TH. Matrix metalloproteinase 9 mRNA: An early prognostic marker for patients with acute stroke. *Clin Biochem*. 2012;45(4–5):352–5.
287. Zhang X, Cao X, Xu X, Li A, Xu Y. Correlation between the -1562C/T polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 gene and hemorrhagic transformation of ischemic stroke. *Exp Ther Med*. 2015;9(3):1043–7.
288. Fernández-Cadenas I, Del Río-Espínola A, Carrera C, Domingues-Montanari S, Mendióroz M, Delgado P, et al. Role of the MMP9 gene in hemorrhagic transformations after tissue-type plasminogen activator treatment in stroke patients. *Stroke*. 2012;43(5):1398–400.
289. Barr TL, Latour LL, Lee KY, Schaewe TJ, Luby M, Chang GS, et al. Blood-brain barrier disruption in humans is independently associated with increased matrix metalloproteinase-9. *Stroke*. 2010;
290. Yi X, Sui G, Zhou Q, Wang C, Lin J, Chai Z, et al. Variants in matrix metalloproteinase-9 gene are associated with hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke patients with atherothrombosis, small artery disease, and cardioembolic stroke. *Brain Behav*. 2019;9(6):e01294.
291. Wang K, Wang G, Huang S, Luo A, Jing X, Li G, et al. Association between TIMP-2 gene polymorphism and breast cancer in Han Chinese women. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–9.
292. Alakus H, Afriani N, Warnecke-Eberz U, Bollschweiler E, Fetzner U, Drebber U, et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *World J Surg*. 2010;34(12):2853–9.
293. Vairaktaris E, Yapijakis C, Yiannopoulos A, Vassiliou S, Serefoglou Z, Vylliotis A, et al. Strong association of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 polymorphism with an increased risk of oral squamous cell carcinoma in Europeans. *Oncol Rep*. 2007;17(4):963–8.
294. Yaykaşlı KO, Kayıkçı MA, Yamak N, Soğuktaş H, Düzenli S, Arslan AO, et al. Polymorphisms in MMP-2 and TIMP-2 in Turkish patients with prostate cancer. *Turkish J*

Med Sci. 2014;44(5):839–43.

295. Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, Morishima Y, Masuyama K, Ishii Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2001;18(5):748–52.
296. Park YS, Jeon YJ, Kim HS, Han IB, Oh SH, Kim DS, et al. The GC + CC genotype at position -418 in TIMP-2 promoter and the -1575GA/-1306CC genotype in MMP-2 is genetic predisposing factors for prevalence of moyamoya disease. *BMC Neurol.* 2014;14(1):1–8.
297. Jeong An H, Ahn EH, Oh Kim J, Park HS, Ryu CS, Cho SH, et al. Association between tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genetic polymorphisms and primary ovarian insufficiency (POI). *Maturitas.* 2019;120:77–82.
298. Chen YC, Ho WM, Lee YS, Chen HW, Chen CM. Polymorphisms in the promoters of the MMP-2 and TIMP-2 genes are associated with spontaneous deep intracerebral hemorrhage in the Taiwan population. *PLoS One.* 2015;10(11):1–13.

SPISAK SKRAĆENICA

ACE - angiotenzin konvertujući enzim

AF - atrijalna fibrilacija

AIM - akutni infarkt miokarda

AIMU - akutni ishemijski moždani udar

ALT - alanin amino-transferaza

AMPA - α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionskokiselina

AMU - akutni moždani udar

aPTT - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme

AST - aspartat amino-transferaza

ATP - adenzin-trifosfata

BDNF - neurotrofni moždani faktor

BM - bazalna membrana

CADASIL - cerebralna autozomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom

CARASIL - cerebralna autozomno recesivna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom

CNS - centralni nervni sistem

CT - kompjuterizovana tomografija

CVB - cerebrovaskularne bolesti

DALY - godine života korigovane u odnosu na nesposobnost

DM - dijabetes melitus

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP - dezoksinukleozid-trifosfat

EDTA - etilendiamintetraacetatna kiselina

EGF - epidermalni faktor rasta

F prajmer - prednji prajmer

GnRH - gonadotropin oslobađajući hormon

GWAS - studije asocijacije kompletnog genoma

HI-1 - hemoragijski infarkt tip 1

HI-2 - hemoragijski infarkt tip 2

HT - hemoragijska transformacija

HTA - hipertenzija

IBS - ishemijska bolest srca

ICH - intracerebralna hemoragija

IL-1 β - interleukin 1 β

INR - protrombinsko vreme/Internacionalni normalizovani odnos

IMU - ishemijski moždani udar

INDLs - inserciono-delecionie varijante

iNOS - inducibilna azot-oksidi sintaza

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

i.v. - intravenski

KMB - krvno-moždana barijera

MMP - matriks metaloproteinaza

mRS - modifikovani Rankin skor

MT-MMP - membranska matriks metaloproteinaza

MTHFR - metilen-tetrahidrofolat reduktaza

MU - moždani udar

NGS - metode sekvenciranja nove generacije

NIHSS - skala za procenu težine mozdanog udara

NMDA - N-metil-D-aspartat

NMDAr - N-metil-D-aspartat receptor

NMR - nuklearna magnetna rezonanca

nNOS - neuronalna azot-oksida sintaza

NO - azot-oksida

NOS - azot-oksida sintaza

PAI-1 - inhibitor aktivatora plazminogena 1

PCR - reakcija lančane polimerizacije

PCR-RFLP - reakcija lančane polimerizacije - polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata

PH-1 - parenhimski hematoma tip 1

PH-2 - parenhimski hematoma tip 2

PXE - pseudoksantoma elastikum

R prajmer - reverzni prajmer

RAAS - renin-angiotenzin-aldosteron sistem

RNK - ribonukleinska kiselina

RNS - reaktivne azotne vrste

ROS - reaktivne kiseonične vrste

rtPA - rekombinovani tkivni aktivator plazminogena

RVCL - retinalna vaskulopatija sa cerebralnom leukodistrofijom

SAD - Sjedinjene Američke Države

SAH - subarahnoidalna hemoragija

sICH - simptomatska intrakranijalna hemoragija

SNP - polimorfizam pojedinačnih nukleotida

TIA - tranzitorni ishemijski atak

TIMP - tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza

TNF α - faktor nekroze tumora α

tPA - tkivni aktivator plazminogena

uPA - urokinaza

VCM - vanćelijski matriks

WGS - metode sekvenciranje celog genoma

BIOGRAFIJA

Marija Dušanović Pjević je rođena 13.11.1989. godine u Gornjem Milanovcu gde je završila osnovnu i srednju školu, oba puta kao đak generacije, kao i nižu muzičku školu, odsek klavir.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine kao prva na rang listi. Diplomirala je 9. juna 2014. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,86. Obavezni lekarski staž obavila je od jula 2014. godine do januara 2015. godine u Kliničkom centru Srbije, a stručni ispit je položila u januaru 2015. godine.

Od marta 2015. godine je zaposlena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač saradnik na projektu koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, pod nazivom „Epidemiološka istraživanja neuroloških poremećaja: sveobuhvatna procena efekata bolesti" (projekat broj 175087), rukovodilac prof. dr Tatjana Pekmezović, u koji je i dalje uključena. Januara 2016. godine izabrana je u zvanje saradnika u nastavi na predmetu Humana genetika na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a zatim reizabrana januara 2017. godine. Marta 2018. godine izabrana je u zvanje asistenta na predmetu Humana genetika. Doktorske akademske studije na modulu Epidemiologija upisala je 2014. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, da bi se naredne godine prebacila na modul Molekularna medicina. Položila je sve predmete predviđene modulom Molekularna medicina sa prosečnom ocenom 10,00. Specijalizaciju iz Laboratorijske medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je u oktobru 2020. godine.

Učestvuje u pripremi i realizaciji nastave iz Humane genetike na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a od oktobra 2016. godine učestvuje i u izvođenju nastave iz Humane genetike na engleskom jeziku. Od januara 2016. godine aktivno je uključena u naučno-istraživački rad i zdravstvenu delatnost koja se obavlja u laboratorijama Instituta. Do sada je, i više nego uspešno, savladala sve kompleksne laboratorijske tehnike koje su neophodne za samostalan rad u okviru laboratorije humane genetike, te je bila i učesnica brojnih domaćih i međunarodnih stručnih i naučnih skupova.

Čita, piše i govori engleski jezik.

Udata je za Miloša i imaju sina Pavla.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Г. Душановић Пјевић

Број индекса ММ-16/15

Изјављујем

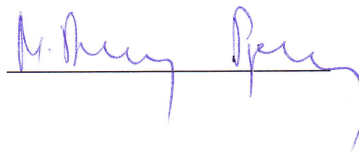
да је докторска дисертација под насловом

Испитивање повезаности полиморфизама гена који регулишу фибринолизу и интегритет ванћелијског матрикса са ефектима терапије исхемијског možданог удара рекомбинованим ткивним активатором плазминогена

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 15.09.2020.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Г. Душановић Пјевић

Број индекса ММ-16/15

Студијски програм Докторске академске студије - модул Молекуларна медицина

Наслов рада Испитивање повезаности полиморфизама гена који регулишу фибринолизу и интегритет ванћелијског матрикса са ефектима терапије исхемијског možданог удара рекомбинованим ткивним активатором плазминогена

Ментор проф. др Биљана Јекић, проф. др Љиљана Беслаћ Бумбаширевић

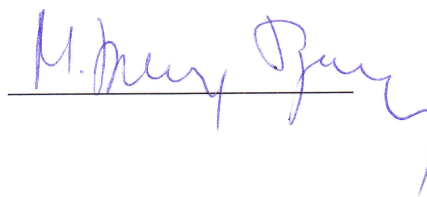
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 15.09.2020.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање повезаности полиморфизама гена који регулишу фибринолизу и интегритет ванћелијског матрикса са ефектима терапије исхемијског možданог удара рекомбинованим ткивним активатором плазминогена

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

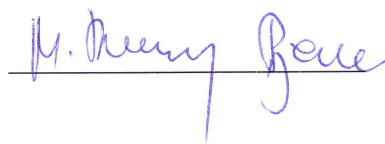
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 15.09.2020.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.