

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 23.03.2021. godine, broj 9700/13-BS, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Vazopresin i neurokardiogene karakteristike hiperadrenergičkog stanja kod granično hipertenzivnih pacova“

kandidata dipl. molekularnog biologa i fiziologa Bojane Stevanović, zaposlene na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Nina Japundžić Žigon.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Doc. dr Marija Stanković Stanojević, Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Sanja Milutinović-Smiljanić, vanredni profesor, Opšta i oralna histologija i embriologija, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Bajić, Katedra za telekomunikacije i obradu signala, Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dipl. molekularnog biologa i fiziologa Bojane Stevanović napisana je na ukupno 67 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 2 tabele i 31 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i 3 priloga (Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i Izjava o korišćenju).

U **uvodu** je definisano šta je to primarna hipertenzija, navedena je klasifikacija hipertenzije prema etiologiji, kao i faktori rizika koji doprinose njenom nastanku. Obrađena je i tema

granične hipertenzije kao dobrog modela za izučavanje promena koje dovode do primarne hipertenzije. Takođe, navedena su dosadašnja saznanja o neuroendokrinoj regulaciji cirkulacije, sa posebnim osvrtom na ulogu vazopresina, kako centralnog, tako i perifernog, na održanje homeostaze kardiovaskularnog sistema. Detaljno su opisani molekularni i autonomni mehanizmi kojima vazopresin utiče na regulaciju krvnog pritiska, naročito u uslovima stresa i povećanog unosa soli.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od izučavanja promene ekspresije gena za vazopresin i vazopresinske receptore (V1aR i V1bR) u paraventricularnom jedru, kao i koncentracije vazopresina u krvnoj plazmi kod normotenzivnih pacova Wistar soja i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima, ali i kod granično hipertenzivnih pacova koji su bili hronično izloženi povećanom unosu soli sa i bez primene heterotipičnog ponovljenog stresa. Dodatni cilj je bio ispitivanje promena kardiovaskularnih parametara kod normotenzivnih i granično hipertenzivnih životinja pod bazalnim uslovima, ali i granično hipertenzivnih životinja pod različitim protokolima. Objedinjeni cilj je bio povezivanje ekspresije gena za vazopresin i vazopresinske receptore u paraventricularnom jedru, kao i koncentracije vazopresina u krvnoj plazmi sa nastankom hipertenzije kod granično hipertenzivnih pacova koji su bili izloženi povećanom unosu soli i heterotipičnom ponovljenom stresu.

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da se radi o eksperimentalnoj studiji koja je sprovedena na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Univerziteta u Beogradu. Korišćene metode u ovom istraživanju su jasno opisane. Za izvođenje eksperimenata dobijena je dozvola (br. 323-07-04083/2016-05/7) Etičkog komiteta za rad sa životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni protokol je podrazumevao hemodinamska merenja uz pomoć radiotelemetrijskog uređaja kod normotenzivnih i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima, ali i kod granično hipertenzivnih pacova pod različitim protokolima (povećan unos soli sa i bez izlaganja heterotipičnom ponovljenom stresu) tokom 24 nedelje. Detaljno su opisane spektralna analiza za procenu kardiovaskularnog varijabiliteta, metoda sekvenci za evaluaciju parametara baroreceptorskog refleksa, ali i molekularno biološke tehnike neophodne za određivanje koncentracije vazopresina u krvnoj plazmi, kao i ekspresije gena za vazopresin i njegove receptore u paraventricularnom jedru kod normotenzivnih pacova i granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima, ali i pod različitim protokolima. U ovom poglavlju je takođe objašnjena statistička obrada dobijenih podataka.

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

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

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 317 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Vrednost Similarity indexa dobijena proverom originalnosti doktorske disertacije „Vazopresin i neurokardiogene karakteristike hiperadrenergičkog stanja kod granično hipertenzivnih pacova“ autora Bojane Stevanović, odnosno utvrđen procenat podudarnosti, korišćenjem programa iThenticate iznosi 6%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je tzv. opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Ova studija je po prvi put pokazala razlike u ekspresiji gena za vazopresin i njegove receptore u paraventrikularnom jedru između normotenzivnih Wistar pacova i granično hipertenzivnih pacova. Naime, granično hipertenzivni pacovi imali su povećanu ekspresiju gena za vazopresin, kao i V1bR u paraventrikularnom jedru, ali i povećanje koncentracije vazopresina u krvnoj plazmi u odnosu na Wistar pacove. Nije primećena razlika u ekspresiji gena za V1aR u paraventrikularnom jedru normotenzivnog i granično hipertenzivnog soja. Takođe, hemodinamska merenja pokazala su da granično hipertenzivni pacovi imaju više vrednosti krvnog pritiska, a niže vrednosti srčane frekvencije u odnosu na normotenzivne Wistar pacove. Kod ove grupe životinja bila je izmenjena i funkcija baroreceptorskog refleksa, pa su granično hipertenzivni pacovi imali povećanu senzitivnost baroreceptorskog refleksa, praćenu uvećanjem njegovog opsega delovanja i težista rada. Kada su granično hipertenzivni pacovi izloženi povećanom unosu soli, došlo je do smanjenja ekspresije gena za V1bR u paraventrikularnom jedru. Krvni pritisak je ostao nepromenjen u odnosu na granično hipertenzivne pacove, ali je došlo do smanjenja srčane frekvencije u odnosu na početno merenje. Kod granično hipertenzivnih pacova koji su bili izloženi povećanom unosu soli indeks efektivnosti baroreceptorskog refleksa je bio niži u odnosu na iste životinje pod

bazalnim uslovima. Spektralna analiza ukazala je na sniženje kardiovaskularnog kratkotrajnog varijabiliteta u zoni niskih frekvencija tokom vremena, kao i niže vrednosti indeksa simpatovagalnog uticaja na srce. Granično hipertenzivni pacovi izloženi povećanom unosu soli i heterotipičnom ponovljenom stresu imali su niže vrednosti vazopresina u krvnoj plazmi u odnosu na iste životinje pod bazalnim uslovima, ali i na one životinje koje su bile izložene povećanom unosu soli. Takođe, granično hipertenzivni pacovi izloženi povećanom unosu soli i heterotipičnom ponovljenom stresu pokazali su porast sistolnog krvnog pritiska u odnosu na početna merenja, ali i iste životinje pod bazalnim uslovima, dok su vrednosti srčane frekvencije opale tokom vremena. Senzitivnost i težište rada baroreceptorskog refleksa porasli su za vreme trajanja protokola. Kratkotrajni varijabilitet krvnog pritiska u zoni niskih frekvencija bio je povećan usled izlaganja granično hipertenzivnih pacova solju i heterotipičnom ponovljenom stresu. Takođe, i vrednost indeksa simpatovagalnog uticaja na srce bila je veća nego kod granično hipertenzivnih pacova pod bazalnim uslovima.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ove studije po prvi put pokazuju razlike u profilu ekspresije gena za vazopresin i njegove receptore u paraventricularnom jedru normotenzivnih Wistar pacova i granično hipertenzivnih pacova. Iako je poznato da granično hipertenzivni pacovi nasleđuju genetsku podlogu za razvoj granične hipertenzije od svoje spontano hipertenzivne majke (Lawler i Cox, 1985), etiologija granične hipertenzije nije istražena. Prisustvo vazopresina u brojnim moždanim strukturama važnim za regulaciju krvnog pritiska (Sofroniew i Weindl, 1978; Buijs, 1978; Nilaver i sar., 1980) sugeriše ulogu vazopresina u nastanku hipertenzije. Takođe hronična stimulacija perifernih receptora za vazopresin ima za posledicu razvoj hipertenzije (Cowley i sar., 1994; Szczepanska-Sadowska i sar., 1994). Postoje brojni dokazi da se nivo vazopresina u genetskoj hipertenziji menja u mozgu (Racher i sar., 1982; Lang i sar., 1981), ali i krvnoj plazmi (Crofton i sar., 1978; Möhring i sar., 1980). U rezultatima ove studije uočen je porast vazopresina u paraventricularnom jedru u poređenju sa normotenzivnim Wistar pacovima. Povećanje sinteze vazopresina moglo bi da dovede do njegovog povećanog otpuštanja u cirkulaciju. Vazopresin iz krvne plazme modifikuje funkciju baroreceptorskog refleksa u nivou *area postremae* (Brizze i Walker, 1990) i povećava senzitivnost baroreceptorskog refleksa, što je potvrđeno u *in vitro* i u *in vivo* studijama (Koshimitzu i sar., 2006; Hasser i sar., 1997; Bizze i Walker, 1990). Povećana senzitivnost baroreceptorskog refleksa uočena je i u ovim eksperimentima i dovodi do smanjenja srčane frekvencije kao kompenzatornog mehanizma u održanju krvnog pritiska. Takođe, pošto granično hipertenzivni

pacovi imaju hronično veće vrednosti pritiska, smatra se da je to posledica resetovanja težišta rada baroreceptorskog refleksa zabeleženog u ovoj studiji, koje se javlja i kod spontano hipertenzivnih životinja (Judy i Farrel, 1997).

Ovi eksperimenti ukazuju i na povećanje gena za V1bR u paraventrikularnom jedru granično hipertenzivnih pacova. V1bR su bogato eksprimirani i kolokalizuju sa V1aR na telu i dendritima sekretujućih magnocelularnih neurona paraventrikularnog jedra (Hurbin i sar., 1998; Berlove i Piekut, 1990). Iako se autokrini regulacija vezuje za aktivnost V1aR (Hurbin i sar., 2002), rezultati ove studije sugerišu da bi V1bR mogli biti odgovorni za kontrolu oslobađanja vazopresina i pobuđivanje okolnih sekretujućih magnocelularnih neurona.

Povećana kardiovaskularna varijabilnost je faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja (Lombardi, 2002; Narkiewicz i Grassi, 2008). Spektralna analiza se može koristiti za procenu kardiovaskularnih kontrolnih mehanizama (Akselrod, 1981). Rezultati ove studije nisu ukazali na razlike u kardiovaskularnom varijabilitetu između Wistar i granično hipertenzivnih pacova, što ide u prilog očuvanoj funkciji baroreceptorskog refleksa. Usled odsustva razlika u kratkotrajnom varijabilitetu pritiska i srčane frekvencije, kao i indeksu simpatovagalnog uticaja na srce, smatra se da porast ekspresije vazopresina i V1bR ne menja neurogenu kardiovaskularnu kontrolu kod granično hipertenzivnih životinja.

Hipertenzija je višefaktorska bolest koja nastaje združenim dejstvom naslednih činilaca i faktora iz okruženja (Folkow, 1982). Povećan oralni unos soli i psihosocijalni stres su priznati faktori rizika za razvoj hipertenzije (Benarroch, 2005; Simmonds i sar., 2014).

Paraventrikularno jedro igra važnu ulogu u povećanju simpatoekscitacije i posledičnom povećanju krvnog pritiska kao odgovor na povišen unos soli. Kod normotenzivnih subjekata hroničan povećan unos soli smanjuje renalnu simpatičku aktivnost, što vodi pojačanju natriureze (Miyajima, 1999; Lohmeier i sar., 1999). Ovaj efekat je još više naglašen u hipertenziji (DiBona i Rios, 1978; DiBona i Sawin, 1986). Granično hipertenzivni pacovi pod blagim opterećenjem solju (1%) (DiBona i Jones, 1991) ponašaju se kao normotenzivne kontrole, što je podudarno i sa rezultatima ove studije. U prilog sniženoj simpatičkoj aktivnosti idu smanjenje kratkotrajnog varijabiliteta krvnog pritiska, kao i smanjena ekspresija V1bR, jer je pokazano da povećana ekspresija V1bR vodi porastu simpatičke renalne aktivnosti (El-Werfali i sar., 2015). Mehanizmi kojima sredinski stres izaziva hipertenziju i budi kardiovaskularni odgovor su nepoznati. Paraventrikularno jedro ima važnu ulogu u koordinisanju neuroendokrinog i simpatoadrenalnog odgovora na hroničan stres (Dampney i

sar., 2002). Takođe, kardiovaskularni varijabilitet raste sa razvojem hipertenzije (Brown i sar.,1999). Sve prethodno navedeno u skladu je sa rezultatima ovih eksperimenata, koji ukazuju na povećanje vrednosti sistolnog pritiska i porast simpatičkog uticaja na srce i krvne sudove. Povećan unos soli interaguje sa hroničnim stresom (Lawler i sar., 2019). DiBona i Jones (1995) i Koepke i DiBona (1985) pokazali su da sredinski stres primenjivan na životinje koje su bile izložene opterećenju solju povećava renalnu simpatičku aktivnost i smanjuje natriurezu, što bi mogao biti mehanizam koji u ovoj studiji doprinosi razvoju hipertenzije.

Povećanje perifernog vazopresina u ovim eksperimentima nije mehanizam koji dovodi do nastanka hipertenzije kod granično hipertenzivnih pacova kada se izlože povećanom unosu soli i heterotipičnom ponovljenom stresu. Suprotno, u ovoj studiji dolazi do smanjenja koncentracije vazopresina u krvnoj plazmi, koje se susreće i kod primene snažnih emocionalnih stresora, kakav je *air-jet* (Yagi i Onaka 1993).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Savić B, Martin A, Souza Mecawi A, Bukumirić Z, Antunes-Rodrigues J, Murphy D, Šarenac O, Japundžić-Žigon N. *Vasopressin and v1br gene expression is increased in the hypothalamic pvn of borderline hypertensive rats*. Hypertens Res. 2020 Nov;43(11):1165-1174. doi: 10.1038/s41440-020-0469-2

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Vazopresin i neurokardiogene karakteristike hiperadrenergičkog stanja kod granično hipertenzivnih pacova“ dipl. molekularnog biologa i fiziologa Bojane Stevanović, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja vazopresina i njegovih receptora u nastanku hipertenzije kod subjekata sa genetskom predispozicijom. Po prvi put je pokazano da postoji razlika u ekspresiji gena za vazopresin i V1bR u paraventrikularnom jedru granično hipertenzivnih i normotenzivnih pacova i da ovo nije mehanizam koji doprinosi promeni neurogene kontrole cirkulacije kod ovih životinja. Pokazano je i da povećana koncentracija vazopresina u krvnoj plazmi utiče na funkciju baroreceptorskog refleksa i dovodi do njegovog resetovanja, čime se održava granična hipertenzija. Takođe, utvrđeno je da kada se granično hipertenzivni pacovi izlože povećanom unosu soli, oni neće razviti hipertenziju, usled smanjenja renalne simpatičke aktivnosti koja olakšava natriurezu. Kada se povećanom unosu soli pridoda i heterotipični ponovljeni stres, granično hipertenzivni pacovi razvijaju izraženu

hipertenziju, ali usled povećanja simpatičkog pražnjenja ka srcu i krvnim sudovima, a ne promene ekspresije vazopresina i njegovih receptora u paraventrikularnom jedru, kao ni zbog promene koncentracije vazopresina u krvnoj plazmi. Ovi rezultati bi mogli da ukažu na mehanizame koji doprinose nastanku hipertenzije kod ljudi sa genetskom predispozicijom, što bi omogućilo razvoj novih antihipertenzivnih lekova.

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

Na osnovu svega navedenog i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dipl. molekularnog biologa i fiziologa Bojane Stevanović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 07. 04. 2021. god.

Članovi Komisije:

Doc. dr Marija Stanković Stanojević

Prof. dr Sanja Milutinović-Smiljanić

Prof. dr Dragana Bajić

Mentor:

Prof. dr Nina Japundžić Žigon
