

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2022. godine, broj 11/IV-3/3-MK, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Genska ekspresija  $\beta$ -adrenergičkih receptora i ključnih molekula uključenih u proces njihove nishodne regulacije u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom“**

kandidata dr Marije Kosić, zaposlene na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Zorica Nešić, a komentor prof. dr Nina Japundžić Žigon.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Doc. dr Marko Stojanović, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, 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 dr Marije Kosić napisana je na ukupno 79 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, 6 grafikona i 25 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 opisana hemijska struktura, farmakokinetika, mehanizam antitumorskog dejstva i toksičnost doksorubicina. Definisano je njegovo neželjeno dejstvo – doksorubicinska

kardiomiopatija i navedena njena epidemiologija i klasifikacija; opisani su molekularni mehanizmi nastanka, dijagnoza, prevencija i terapija doksorubicinske kardiomiopatije. Obrađena je i tema beta adrenergičkih receptora ( $\beta$ -AR) i njihovih signalnih puteva u zdravom srcu i srčanoj dekompenzaciji, sa detaljnim prikazom uloge kinaza G protein-spregnutih receptora (GRK) i arestina u desenzitizaciji, prometu i signalnim putevima ovih receptora. Takođe, navedena su dosadašnja saznanja o ulogama GRK2 u srčanoj insuficijenciji različite etiologije, sa posebnim osvrtom na inhibiciju GRK2 kao nove terapijske mogućnosti u lečenju srčane dekompenzacije.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od razvoja eksperimentalnog modela doksorubicinske kardiomiopatije kod mužjaka *Wistar* pacova, utvrđivanja funkcionalnih i morfoloških promena na srcu pacova sa doksorubicinskom kardiomiopatijom i definisanja kliničke prezentacije. Osim toga, cilj je bio kvantifikovati ekspresiju  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR, kao i ključnih molekula uključenih u procese desenzitizacije i nishodne regulacije ovih receptora i ispitati efekte inhibicije GRK2 paroksetinom na preživljavanje eksperimentalnih životinja i remodelovanje srčane funkcije u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno 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. Eksperimentalni protokol je dobio dozvolu (br. 323-07-04083/2016-05/1) Etičkog komiteta za životinje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Podrazumevao je razvoj doksorubicinskog modela kardiotoksičnosti, određivanje selektivne doze paroksetina za inhibiciju GRK2, procenu preživljavanja i opšte toksičnosti eksperimentalnih životinja, kao i ehokardiografsku procenu srčane morfologije i funkcije. Detaljno su opisane ehokardiografija, patohistološka analiza, histomorfometrija i imunohistohemija, ali i tehnike molekularne biologije neophodne za merenje ekspresije gena za  $\beta$ -AR i ključne molekule uključene u procese desenzitizacije i nishodne regulacije ovih receptora u kontrolnoj grupi, kod pacova tretiranih doksorubicinom i kod pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom. U ovom poglavlju je navedena i lista korišćenih supstanci i statistička analiza 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 243 reference.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Vrednost Similarity indexa dobijena proverom originalnosti doktorske disertacije „Genska ekspresija  $\beta$ -adrenergičkih receptora i ključnih molekula uključenih u proces njihove nishodne regulacije u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom“ autora Marije Kosić, odnosno utvrđen procenat podudarnosti, korišćenjem programa iThenticate iznosi 17%. 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 članom sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Takođe, ovaj stepen podudarnosti posledica je slične metodologije doktorskih disertacija proisteklih iz iste laboratorije (isti ultrazvučni aparat, mereni ultrazvučni parametri, formule za računanje funkcionalnih ultrazvučnih parametara, isti RT-qPCR aparat i korišćene iste hemijske supstance i prajmeri), kao i rezultat sličnih protokola za razvoj eksperimentalnog modela doksorubicinske kardiomiopatije ranijih istraživanja.

## **C) Kratak opis postignutih rezultata**

Glavni nalaz ovog istraživanja je da GRK2 inhibicija paroksetinom efikasno prevenira kardiotoksično remodelovanje uzrokovano doksorubicinom i povećava preživljavanje eksperimentalnih životinja. Kod pacova tretiranih doksorubicinom, simptomi i znaci intoksikacije bili su očigledni, a telesna masa se progresivno smanjivala tokom vremena. Medijana preživljavanja bila je 55 dana i nije se statistički značajno razlikovala između različitih kliničkih prezentacija doksorubicinske kardiomiopatije. Makroskopskim pregledom organa primećena su najizrazitija toksična oštećenja na srcu, bubrezima i jetri. Opšte stanje pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom bilo je značajno bolje, bez simptoma i znakova intoksikacije opasne po život. Pacovi su tokom perioda praćenja dobijali na telesnoj masi, medijana preživljavanja bila je ista kao kod pacova iz kontrolne grupe a makroskopski obdukcioni nalaz pokazao je diskretne promene na organima.

Ehokardiografijom je utvrđeno postojanje dve kliničke prezentacije srčane dekompenzacije izazvane doksorubicinom: hipertrofična (DOX-HCM) sa smanjenim volumenom krvi leve komore na kraju dijastole i očuvanom ejakcionom frakcijom leve komore srca i dilataciona

(DOX-DCM), sa povećanim volumenom krvi leve komore na kraju dijastole, a smanjenom ejectionom frakcijom leve komore srca. Pacovi tretirani doksorubicinom i paroksetinom pokazali su normalan ehokardiografski nalaz, kao pacovi iz kontrolne grupe.

Kod oba fenotipa doksorubicinske kardiomiopatije, uočene su patohistološke promene srčanog tkiva tipične za doksorubicinsku kardiotoksičnost: gubitak miofibrila, vakuolizacija srčanih ćelija, infiltracija intersticijuma zapaljenskim ćelijama, leukostaza i nekroza sa kontrakcijskim prugama. Pacovi u DOX-DCM grupi imali su izraženije patohistološke promene: nekrozu, apoptozu, inflamaciju i gubitak miofibrila, dok je kod pacova u DOX-HCM grupi dominantna promena bila uvećanje srčanih ćelija i grupisanje jedara. Kod pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom dominantne promene bile su hronične degenerativne promene srčanog tkiva. Histomorfometrijski srednji dijametar leve komore srca bio je statistički značajno veći kod DOX-HCM pacova, u odnosu na kontrolne pacove i pacove iz DOX-DCM grupe.

Imunohistohemijskim bojenjem srčanog tkiva na LCA i CD68 kod pacova tretiranih doksorubicinom, registrovani su pojedinačni LCA+ leukociti i intersticijalni CD68+ makrofagi. Imunohistohemijska detekcija  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR u srčanom tkivu, pokazala je povećanu imunoreaktivnost kod pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom. Kod DOX-HCM pacova, imunohistohemijsko bojenje isečaka srčanog tkiva, pokazalo je veće regione GRK2 i GRK3 imunopozitivnosti, u odnosu na kontrolnu i grupu pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom.

U DOX-DCM grupi pacova nije bilo statistički značajnih promena u srčanoj ekspresiji gena za  $\beta$ -AR i ključne molekule uključene u procese desenzitizacije i nishodne regulacije ovih receptora. GRK2 i GRK3 bili su povećano ekspimirani samo kod DOX-HCM pacova. Kod pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom, genska ekspresija  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR bila je statistički značajno povećana, dok je ekspresija GRK2 i GRK3 bila statistički značajno smanjena. Uočena je pozitivna povezanost između ekspresije GRK2 i RWT kod DOX-HCM pacova, dok je kod pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom postojala pozitivna povezanost između ekspresije  $\beta_1$ -AR i ekspresije GRK2, kao i između ekspresije  $\beta_2$ -AR i ekspresije GRK2.

## **D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U ovoj studiji, doksorubicin je primenjen kod mužjaka Wistar pacova intravenskim putem u pojedinačnoj, udarnoj dozi od 5mg/kg. Ovaj eksperimentalni model doksorubicinske kardiomiopatije preuzet je iz literature (Duncan i saradnici, 1998; Rasmussen i saradnici, 1989), i potvrđeno je da je odgovarajući, u smislu karakterističnih ehokardiografskih i histopatoloških promena srca (Cheah i saradnici, 2017), kao i po pitanju sličnosti sa doksorubicinskom kardiomiopatijom kod ljudi (Nebigil i D'esaubry, 2018). Doksorubicin nije aplikovan intraperitonealnim putem, sa ciljem da izazove kardiotoksičnost, iako su mnogi autori to činili (Merlet i saradnici, 2013; Teraoka i saradnici, 2000). Razlog su ozbiljni neželjeni efekti intraperitonealne primene doksorubicina: masivna akumulacija tečnosti u trbušnoj duplji (ascites) i direktno oštećenje peritoneuma (Vasić i saradnici, 2019). Svi pacovi tretirani doksorubicinom pokazali su pogoršanje opšteg stanja, progresivno smanjenje telesne mase i malu stopu preživljavanja, što je u skladu sa nalazima različitih istraživanja (Vasić i saradnici, 2019; Cheah i saradnici, 2017; Kenk i saradnici, 2010). Opšte stanje pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom bilo je dobro, bez simptoma i znakova intoksikacije opasne po život.

Ehokardiografija, koja predstavlja zlatni standard za procenu srčane morfologije i funkcije u eksperimentalnoj i kliničkoj praksi (Oh, 2007), otkrila je u ovom istraživanju postojanje dve različite kliničke prezentacije doksorubicinske kardiomiopatije, sa gotovo jednakom učestalošću i preživljavanjem: DOX-HCM i DOX-DCM. Ovaj nalaz je u skladu sa istraživanjem iz 2021. godine (Pajović i saradnici, 2021). U eksperimentalnim studijama doksorubicinske kardiomiopatije kod pacova, sa različitim putevima administracije i različitim režimima doziranja doksorubicina, ehokardiografski pregled rađen je uvek na anestetisanim pacovima i  $EF_{LV}$  bila je značajno smanjena (Liu i saradnici, 2016; Merlet i saradnici, 2013) zbog sinergističkih negativno inotropnih efekata anestetika (Stein i saradnici, 2007) i doksorubicina. U ovoj studiji, pregledani su svesni pacovi, sedirani acepromazinom, što objašnjava manji, ali ipak statistički značajan pad ejekcione frakcije kod DOX-DCM pacova. U kliničkoj praksi, ehokardiografsko praćenje ejekcione frakcije jedan je od osnovnih pokazatelja srčane disfunkcije (Villani i saradnici, 2006). Međutim, ejekciona frakcija je neosetljiv parametar u otkrivanju ranih znakova srčanog stresa i oštećenja miokarda (Kang i saradnici, 2017). Različite studije pokazale su širok raspon variranja vrednosti  $EF_{LV}$  (31 –

90%) u modelima doksorubicinske kardiomiopatije (Georgiadis i saradnici, 2020). ). S obzirom da očuvana e젝ciona frakcija ne isključuje disfunkciju srca i da su u ovom istraživanju podjednako loše preživljavanje imali pacovi sa smanjenom i pacovi sa očuvanom e젝cionom frakcijom, odvojeno su analizirana ova dva fenotipa doksorubicinske kardiomiopatije. U ovom istraživanju, ehokardiografski nalaz pacova tretiranih doksorubicinom i paroksetinom nije pokazao odstupanja srčane morfologije i funkcije, u odnosu na kontrolnu grupu. Ehokardiografijom i magnetnom rezonancom ranije je pokazano da paroksetin smanjuje neželjeno remodelovanje leve komore srca nakon infarkta miokarda (Lassen i saradnici, 2017).

Histološkom analizom srca kod DOX-HCM i DOX-DCM pacova ustanovljeni su karakteristični znaci kardiotoksičnosti izazvane doksorubicinom, u skladu sa prethodnim istraživanjima (Octavia i saradnici, 2012; Takemura i Fujiwara, 2007; Bertinchant i saradnici, 2003). Imunohistohemijskim bojenjem potvrđeno je prisustvo makrofaga i retkih limfocita u zapaljenskom infiltratu intersticijuma. Ovaj nalaz je u skladu sa nalazom Kobayashi i saradnika. U ovom eksperimentalnom modelu doksorubicinske kardiomiopatije, bubrezi i jetra bili su umereno oštećeni doksorubicinom, očekivano prema podacima iz literature (Lee i Harris, 2011; Injac i Strukelj, 2008). Međutim, funkcija ovih organa ostala je očuvana, na šta ukazuju fiziološke vrednosti bilirubina, kreatinina, alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze iz prethodnog istraživanja (Pajović i saradnici, 2021). Ovo se može smatrati prednošću modela jer nespecifična hepatorenalna kardiotoksičnost nije „ometala“ specifične, kardiotoksične efekte doksorubicina.

U ovom eksperimentalnom modelu doksorubicinske kardiomiopatije kod pacova, genska ekspresija  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR kod DOX-HCM i DOX-DCM pacova nije bila promenjena, potvrđujući nalaz o neizmenjenoj gustini  $\beta$ -AR iz istraživanja Robison i Girija (Robison i Giri, 1986). Kod DOX-DCM pacova nisu uočene promene u genskoj ekspresiji molekula uključenih u proces nishodne regulacije  $\beta$ -AR. Genska ekspresija i imunoreaktivnost GRK2 i GRK3 u srčanom tkivu bila povećana samo kod DOX-HCM pacova. S obzirom da ovi pacovi nisu razvili srčanu dekompenzaciju (očuvana e젝ciona frakcija), može se pretpostaviti da ovaj porast GRK2 genske ekspresije i sinteze nije povezan sa maladaptivnom nishodnom regulacijom  $\beta$ -AR. S druge strane, važno otkriće Schlegel i saradnika ukazuje na nekanonsku ulogu GRK2 u nastanku srčane hipertrofije kod miševa sa transverzalnom konstrikcijom aorte (Schlegel i saradnici, 2017). Sa tim u vezi, GRK2 se nameće kao nova obećavajuća meta u terapiji srčane hipertrofije (Schlegel i saradnici, 2017).

Novo otkriće ove studije je da paroksetin povećava gensku ekspresiju i sintezu  $\beta_1$ -AR i  $\beta_2$ -AR u srčanom tkivu pacova tretiranih doksorubicinom, što nije pokazano kod pacova tretiranih samo paroksetinom. Ovaj efekat bi mogao biti posledica simpatolitičkog efekta paroksetina u patofiziološkim uslovima poput doksorubicinske kardiomiopatije, koje karakteriše povećana aktivnost simpatikusa (van Melle i saradnici, 2004; McFarlane i saradnici, 2001). Još jedno važno otkriće u ovom istraživanju je da paroksetin smanjuje gensku ekspresiju i sintezu GRK2 i GRK3 kod pacova tretiranih doksorubicinom. Ova nishodna regulacija kinaza  $\beta$ -AR mogla bi imati povoljne efekte na doksorubicinsku kardiomiopatiju iz najmanje dva razloga: sprečavanjem maladaptivne desenzitizacije  $\beta$ -AR i posledičnim očuvanjem srčane inotropne rezerve (Thal i saradnici, 2012) i sprečavanjem nastanka hipertrofije srca (Schlegel i saradnici, 2017).

### **E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

*Kosić M, Nešić Z, Glumac S, Vasić M, Pajović V, Savić B, Japundžić-Žigon N. Paroxetine mitigates cardiac remodelling by doxorubicin and increases survival. Biomed Pharmacother 2022;145:112411. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112411*

### **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Genska ekspresija  $\beta$ -adrenergičkih receptora i ključnih molekula uključenih u proces njihove nishodne regulacije u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom“ dr Marije Kosić, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju signalnog puta nishodne regulacije  $\beta$ -AR kod doksorubicinske kardiomiopatije. Rezultati ove studije po prvi put pokazuju da primena paroksetina povećava preživljavanje, smanjuje toksičnost organa i čuva morfologiju i funkciju leve komore srca kod pacova tretiranih doksorubicinom. Nalaz je najverovatnije povezan sa smanjenjem ekspresije i sinteze molekula uključenih u proces nishodne regulacije  $\beta$ -AR, a povećanjem ekspresije i sinteze  $\beta$ -AR, što zajedno poboljšava inotropnu rezervu srca. Ovaj rad prepoznaje novo farmakološko dejstvo paroksetina – kardioprotekciju kod doksorubicinske kardiomiopatije i sugeriše potencijalnu prenamenu ovog leka za prevenciju/terapiju doksorubicinske kardiomiopatije kod onkoloških pacijenata.

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

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

U Beogradu, 23. 03. 2022. god.

Članovi Komisije:

doc. dr Marko Stojanović

---

prof. dr Sanja Milutinović-Smiljanić

---

prof. dr Dragana Bajić

---

Mentor:

prof. dr Zorica Nešić

---

Komentor:

prof. dr Nina Japundžić Žigon

---