

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 18.4.2019. godine, broj 9700/03-MB, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Varijabilitet srčane frekvencije i ekspresija β -adrenergičkih receptora u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom**“ kandidata dr vet. med. Marka S. Vasića, zaposlenog na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Nina Japundžić Žigon.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vera Pravica, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Dr Silvio De Luka, vanredni profesor, Institut za patološku fiziologiju, Medicinski 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 vet. med. Marka S. Vasića sadrži 97 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 20 slika, šest dijagrama i tri tabele. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i izjave o autorstvu.

U **uvodu** je objašnjeno poreklo, hemijska struktura i mehanizam dejstva doksorubicina. Jasno su i adekvatno objašnjeni molekularni mehanizmi nastanka kardiomiopatije izazvane doksorubicinom, u koje se ubrajaju: oksidativni stres (formiranje reaktivnih kiseoničnih i azotnih jedinjenja u mitohondrijama i interakcija doksorubicina sa jonima gvožđa), poremećaj prometa unutarćelijskog kalcijuma, ćelijska smrt, preoblikovanje

vančelijskog matriksa i fibroza izazvana doksorubicinom. Kandidat se detaljno osvrnuo na ulogu β -adrenergičkih receptora u nastanku srčane insuficijencije, te β -adrenergičku signalizaciju u zdravom i bolesnom srcu. Dao je informativan pregled terapije i prevencije kardiotoksičnosti. Jasno i adekvatno je objasnio metode za ranō otkrivanje toksičnih promena na miokardu (ehokardiografija, serumski srčani troponini i dr.) kao i prognostički i dijagnostički značaj varijabiliteta srčane frekvencije i senzitivnosti barorefleksa u kardiološkoj praksi.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od: 1) dizajniranja eksperimentalnog modela kardiotoksičnosti kod pacova koji je prihvatljivi ekvivalent ljudskoj patologiji; 2) utvrđivanja dijagnostičkog i prognostičkog značaja: varijabiliteta srčane frekvencije, krvnog pritiska i spontanog baroreceptorskog refleksa kod pacova tretiranih toksičnim dozama doksorubicina; 3) upoređivanja senzitivnosti barorefleksa i varijabiliteta srčane frekvencije sa standardnim metodama za dijagnostiku kardiotoksičnosti i 4) otkrivanja molekularnih mehanizama odgovornih za promenu varijabiliteta srčane frekvencije kod oštećenog miokarda, odnosno promenu ekspresije β -AR receptora u srcu.

U poglavlju **materijal i metode**, objašnjeno je dizajniranje farmakološkog modela kardiomiopatije izazvane doksorubicinom i jasno su definisane eksperimentalne grupe (DOX35, DOX70 i CONT). Procenjivana je opšta toksičnost doksorubicina i ehosonografski su praćene promene srčanih parametara kod eksperimentalnih životinja. Detaljno i jasno su opisani: 1) hirurška procedura implantacije polietilenskog katetera za registrovanje kardiovaskularnih parametara u butnu arteriju pacova; 2) proces registrovanja i obrade hemodinamskih parametara linearnim (Hilbert-Huangova transformacija) i nelinearnim metodama (Poenkareov dijagram, aproksimativna i entropija uzorka) i 3) metod evaluacije senzitivnosti spontanog baroreceptorskog refleksa. Navedene su i jasno objašnjene biohemijske metode detekcije srčanih troponina T i I u serumu, patohistološka analiza tkivnih isečaka i analiza genske ekspresije srčanih β_1 i β_2 adrenergičkih receptora. Sve eksperimentalne procedure izvedene su u skladu sa preporukama dobre laboratorijske prakse o etičkom radu na eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Vodič za eksperimentalni rad sa životinjama Medicinskog fakulteta u Beogradu) i u skladu sa preporukama EU Direktive 2010/63/EU za rad sa eksperimentalnim životinjama. Eksperimentalni protokol odobrio je Etički komitet Univerziteta u Beogradu (broj licence: 323-07-10519/2013-05/2).

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 ove doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 224 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Pacovi tretirani doksorubicinom ispoljili su teško opšte stanje u vidu: nakostrešenosti dlake, smanjenog uzimanja hrane i vode, pojave crvenih krugova oko očiju i povećane stope smrtnosti u odnosu na kontrolnu grupu. Ehokardiografskom evaluacijom srčane funkcije i volumena na nedeljnom nivou, kod pacova tretiranih doksorubicinom u periodu pre 35. dana i 35. dana nisu uočene razlike u odnosu na bazalne vrednosti izmerene kod istih životinja pre tretmana doksorubicinom (DOX35 i DOX70) i u odnosu na odgovarajuću grupu životinja tretiranih fiziološkim rastvorom (CONT).

Vidljivi ehokardiografski znaci razvoja srčane slabosti pojavili su se tek kod DOX70 grupe: dijametar interventrikularnog septuma u sistoli je statistički značajno snižen, dok su vrednosti dijametara interventrikularnog septuma u dijastoli i unutrašnjeg dijametra leve komore u dijastoli bile povišene u odnosu na bazalne vrednosti i CONT grupu. Vrednosti izračunatog end-dijastolnog volumena i ejskacione frakcije bile su dvostruko više u odnosu na bazalne i CONT vrednosti. U DOX35 grupi, svi parametri varijabiliteta srčane frekvencije bili su povišeni u vremenskom i frekvencijskom domenu, kao i vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska i srčane frekvence.

Analiza frekvencija ukazala je na povišenje varijabiliteta srčane frekvencije kod DOX35 grupe u odnosu na CONT grupu u okviru svih spektralnih domena, kao i povećanje LF/HF količnika. Vrednosti srčane frekvence kod DOX35 i DOX70 grupe bile su u fiziološkim granicama. Vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska kod DOX35 grupe i DOX70 grupe bile su statistički značajno povišene u odnosu na CONT grupu. Poenkareovi dijagrami pacova iz DOX35 grupe pokazali su povećanje standardne devijacije, kako duž linije identiteta, tako i perpendikularno i gubitak oblika komete, koji je karakterističan za CONT grupu. Srednje vrednosti parametara Poenkareovog dijagrama DOX70 grupe nisu se značajno razlikovale od kontrolnih vrednosti. Pregrupisavanje spektralne gustine snage po različitim frekvencijskim opsezima i prosečni porast ukupne snage primećeni su u PI seriji kod DOX35 grupe. Prosečna snaga kod LF i HF opsega bila je, takođe, statistički značajno povišena kod DOX35 grupe, sa značajno promenjenim LF/HF količnikom. Vrednosti LF/HF količnika kao i LF kod DOX70 grupe vratile su se na bazalne, u poređenju sa CONT grupom. Snaga SBP spektra kako u domenu niske tako i u zoni visoke frekvencije bila je značajno snižena kod DOX70 grupe u odnosu na CONT grupu. Vrednosti aproksimativne i entropije uzorka kod DOX35 grupe bile su statistički značajno snižene u odnosu na CONT grupu. Srednje vrednosti spontanog baroreceptorskog refleksa kod pacova tretiranih doksorubicinom bile su statistički značajno povećane kod DOX35 grupe u odnosu na CONT grupu. Nakon 70. dana od tretmana doksorubicinom, osetljivost barorefleksa je nastavila da statistički značajno raste kod DOX70 grupe u odnosu na CONT grupu.

Kod DOX35 grupe nije bilo povećanja nivoa serumskih srčanih troponina, dok je kod DOX70 nivo serumskog troponina T bio povišen.

Patohistološki, DOX35 grupa je na srcu imala tipične promene kardiotoksičnosti (lakostepena vakuolarna degeneracija kardiomiocita, nekroza kontraktilnih vlakana i intersticijska infiltracija polimorfonukleara), dok je kod DOX70 grupe stepen promena bio znatno izraženiji, sa dominantnom fibrozom srčanog mišića.

Relativna ekspresija iRNK srčanih β 1-AR bila je statistički značajno povišena kod pacova iz DOX35 grupe u odnosu na CONT i DOX70 grupu. Relativna ekspresija iRNK β 2-AR u tkivu srčanog mišića pacova tretiranih doksorubicinom nije bila statistički značajna.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ova studija pokazala je, po prvi put, da sveobuhvatna analiza kratkoročnog varijabiliteta srčane frekvencije kod pacova tretiranih doksorubicinom otkriva rane promene u dinamici srčane frekvencije.

Doksorubicin se u kliničkoj praksi, najčešće, aplikuje intravenski a u toku hirurških zahvata i tretmana peritonealnih karcinomatosa češće intraperitonealno (Spiliotis et al. 2016). U ovoj studiji, kod pacova intraperitonealno tretiranih doksorubicinom u ukupnoj kumulativnoj dozi od 15 mg/kg pojavili su se znaci pogoršanja opšteg stanja: nakostrešeno krzno, smanjena motorna aktivnost, pad telesne težine i povećana stopa smrtnosti. Ehokardiografski pregledi ukazali su na vidljive znake srčane insuficijencije samo kod pacova koji su preživeli 70 dana od tretmana doksorubicinom: kod većine pregledanih životinja, dijametar leve komore u dijastoli i sistoli je statistički značajno bio povećan, srčani volumen na kraju dijastole bio je dva puta povišen a ejectiona frakcija leve komore snižena za oko 8%, što potkrepljuje postojeća saznanja u naučnoj i stručnoj literaturi (Teraoka et al. 2000; Merlet et al. 2013). U kliničkoj praksi se, kao biomarkeri za otkrivanje antraciklinske kardiotoksičnosti, koriste srčani troponini (Cardinale et al. 2004; Dolci et al. 2008). U ovoj studiji, povišen nivo serumskog srčanog troponina T kod pacova tretiranih doksorubicinom podudara se sa ehokardiografski ustanovljenom srčanom dekompenzacijom, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Herman et al. 1999; Bertinchant et al. 2003). Patohistološke analize mikrotomskog preseka srčanog mišića pacova potvrdile su postojanje fokalnog nekrotičnog oštećenja miokarda i intersticijsku infiltraciju fibroblastima i polimorfonuklearima. Rezultati ove studije su pokazali da je eksperimentalni model srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom primenljiv, iskoristiv i u saglasnosti sa

prethodno objavljenim rezultatima za proučavanje ove bolesti kod ljudi (Jensen et al. 1984; Teraoka et al. 2000; Cheah et al. 2017).

U ovoj studiji, pred kraj opservacionog perioda od 70 dana, vrednosti sistolnog krvnog pritiska se nisu značajno menjale kod pacova tretiranih doksorubicinom, dok je vrednost DBP bila statistički značajno povišena u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina. Takođe, na kraju opservacionog perioda, primećeno je i sniženje ukupnih vrednosti svih činilaca kratkoročnog varijabiliteta krvnog pritiska, kao i svih njegovih komponenti. Istovremeno, smanjivala se i kompleksnost SBP i DBP signala. Uloga autonomnog nervnog sistema u regulaciji kratkoročnog varijabiliteta srčane frekvence potvrđena je u literaturi farmakološkim (blokadom β -AR) i hirurškim (denervacijom) putem (Japundzic et al. 1990; Japundzic-Zigon 1998), a dokazano je i da antraciklini genezom ROS i NOS preko MAP signalnog puta i cAMP oštećuju endotelne ćelije i uvode ih u apoptozu (Yamada et al. 2012; Yamada et al. 2016). Pretpostavka autora ove studije da je smanjenje varijabiliteta SBP i DBP u vezi sa smanjenom elastičnošću zida krvnih sudova, nastalih kao posledica endotelnog oštećenja izazvanog doksorubicinom, što je potkrepljeno prethodno objavljenim rezultatima Egger i sar. (Egger et al. 2015), koji su pokazali da doksorubicin slobodnim radikalima oštećuje sitne krvne sudove srži bubrega pacova i smanjenje gustine peritubularnih krvnih sudova, dok u kori bubrega dovodi do smanjenja ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta.

Važan nalaz ove studije jeste povećanje varijabiliteta srčane frekvencije u ranōj, kompenzovanoj, fazi nastanka kardiomiopatije izazvane doksorubicinom. Razvijene su mnoge linearne i nelinearne metode za analizu varijabiliteta srčane frekvence i veliki broj biomarkera (Stein et al. 2005; Nicolini et al. 2012; Huikuri & Stein 2013). U studiji koju su Tjeerdsma i sar. (Tjeerdsma et al. 1999) sproveli na 20 pacijentkinja sa tumorom dojke koje su dobijale doksorubicin, bile podvrgnute radioterapiji i imale nepromenjenu sistolnu funkciju leve komore, analizom HRV utvrđene su promene na ANS kod 85% ispitanica. Ovi nalazi ukazuju da je analiza HRV znatno osetljivija metoda za ranō otkrivanje srčanih promena izazvanih doksorubicinom u odnosu na uporednu ehokardiografsku procenu sistolne funkcije kod ovih pacijenata. U početnoj fazi ove studije (Vasić et al. 2019), praćene su promene HRV na modelu srčane insuficijencije izazvane doksorubicinom na pacovu u intervalu od 35 dana nakon završene aplikacije. Rezultati su pokazali da je metoda procene HRV bila osetljivija i promene na srcu detektovala ranije u odnosu na ultrazvučnu metodu i patohistološku analizu. U ovoj studiji, LF i LF/HF bili su značajno statistički povećani u odnosu na vrednosti pre aplikovanja doksorubicina, ukazujući da je varijabilitet srčane frekvence pod dominantnim uticajem simpatikusa. Nalaz povišenog varijabiliteta srčane frekvence potvrđen je i Poenkareovim dijagramima. Sniženje aproksimativne entropije prati ove promene, ukazujući na uprošćavanje dinamike srčane frekvence i povećanje njene regularnosti usled dominacije simpatikusne kontrole srca. Ovu tvrdnju potkrepljuje nalaz Tong i sar. (Tong et al. 1991) koji su primetili da su u ranoj fazi kardiomiopatije

izazvane doksorubicinom depoi noradrenalina u tkivu srčanog mišića povećani, dok se u kasnijoj fazi smanjuju. Na ovaj se način može objasniti prolazno povećanje varijabiliteta srčane frekvence u eksperimentima ove studije.

Poznato je da kod kardiovaskularnih oboljenja, kao što su hronična srčana insuficijencija (Mortara et al. 1997) ili infarkt miokarda (La Rovere et al. 2001), senzitivnost barorefleksa opada neposredno pre letalnog ishoda, te predstavlja loš prognostički znak. U eksperimentima ove studije nije primećeno smanjenje senzitivnosti barorefleksa kod pacova tretiranih doksorubicinom. Međutim, 35. dana nakon aplikacije doksorubicina, kod pacova je došlo do statistički značajnog povećanja osetljivosti barorefleksa. Budući da su kod tih jedinki vrednosti SBP i DBP, takođe, bile povećane, najverovatnije je da je do povećanja osetljivosti BRS došlo zbog pojačane težnje organizma da se u patološkim uslovima, gde je došlo do oštećenja endotela krvnih sudova doksorubicinom, krvni pritisak održi u homeostatskim granicama.

Različite studije dale su oprečne rezultate u pogledu ekspresije β 1- i β 2-AR kod kardiomiopatije izazvane doksorubicinom. Razlog za nepodudarnost nalaza, najverovatnije je različitost među životinjskim modelima, te protokolima, doziranju i načinu aplikacije doksorubicina. Pre više od trideset godina, Robinson i sar. (Robinson & Giri 1986) otkrili su da dugotrajna administracija doksorubicina kod pacova smanjuje sposobnost miokarda da adekvatno odgovori na adrenergičku stimulaciju, te, iako nisu našli promene u gustini β -AR, otkrili su njihovo smanjenje afiniteta za vezivanje kateholamina. U eksperimentima ove studije, za vreme kompenzatorne faze kardiomiopatije (35. dana posle aplikacije doksorubicina), otkriveno je prolazno povišenje ekspresije mRNA β 1-AR ali ne i β 2-AR, što je, izgleda, ključno za nastanak progresivne hipertrofične kardiomiopatije (Milano et al. 1994; Engelhardt et al. 1999; Bernstein et al. 2005). Rezultati ove studije, takođe, ukazuju da su β 1-AR medijatori kardiotoksičnosti.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Marko Vasić, Tatjana Lončar Turukalo, Tatjana Tasić, Marija Matić, Sofija Glumac, Dragana Bajić, Branka Popović, Nina Japundžić Žigon: **Cardiovascular Variability And β -ARs Gene Expression At Two Stages Of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy**; *Toxicology and Applied Pharmacology* 362 (2019) 43–51;
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.10.015>

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Rezultati doktorske disertacije „Varijabilitet srčane frekvencije i ekspresija β -adrenergičkih receptora u kardiomiopatiji izazvanoj doksorubicinom“ dr vet. med. Marka S. Vasića originalan su naučni doprinos, i po prvi put pokazuju da su povećanje varijabiliteta srčane frekvencije, smanjenje kompleksnosti dinamike srčanog rada i porast senzitivnosti baroreceptorskog refleksa rani znaci doksorubicinske kardiomiopatije. Rezultati otvaraju kliničke perspektive za primenu HRV i sBRS u ranoj dijagnostici doksorubicinske kardiomiopatije, kao i BPV za prognozu lošeg ishoda. Pored toga, sugerišu da bi terapiju blokatorima β 1-AR trebalo započeti kad se javi povećanje srčanog varijabiliteta, a pre popuštanja srčanog mišića.

Ova doktorska disertacija je urađena i napisana 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 vet. med. Marka S. Vasića i odobri njenu javnu odbranu, radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 15.5.2019.

Mentor:

Prof. dr Nina Japundžić Žigon

Članovi Komisije:

Prof. dr Vera Pravica

Dr Silvio De Luka

Prof. dr Dragana Bajić
