

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Vladislav M. Pajović

TRANSKRIPTOM LEVE KOMORE SRCA  
PACOVA SA DOKSORUBICINSKOM  
KARDIOMIOPATIJOM

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Vladislav M. Pajović

LEFT VENTRICULAR TRANSCRIPTOME IN  
DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY  
IN RATS

doctoral dissertation

Belgrade, 2023

**Mentor:**

Prof. dr Nina Žigon, redovni profesor, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

1. Doc. dr Dragana Srebro, docent, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Ljiljana Đukić, docent, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragana Bajić, naučni savetnik, Fakultet tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr Nini Žigon na ukazanom poverenju, svestranoj pomoći, podršci a pre svega na korisnim sugestijama u svim fazama izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se članovima komisije, doc. dr Dragani Srebro, doc. dr Ljiljani Đukić i prof. dr Dragani Bajić na nesebičnim savetima i pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se kolegama iz laboratorije, dr sci. med. dr Mariji Kosić, dr sci. med. Bojani Stevanović, dr sci. med. Oliveri Antić, dr sci. med. Marku Vasiću i dr sci. med. Tatjani Tasić na nesebičnoj podršci i pomoći u svim fazama eksperimentalnog istraživanja i izradi doktorske disertacije.

**Mojoj porodici, mojoj najvećoj podršci i uzdanici.**

# TRANSKRIPTOM LEVE KOMORE SRCA PACOVA SA DOKSORUBICINSKOM KARDIOMIOPATIJOM

## Sažetak

Kardiomiopatija predstavlja najozbiljnije neželjeno dejstvo doksorubicina, citostatika koji ima široku upotrebu. Nažalost, trenutno ne postoji dovoljno efikasna terapija za kardiomiopatiju indukovanu doksorubicinom. Cilj ovog istraživanja je potvrda modela doksorubicinske kardiotoksičnosti, identifikovanje fenotipova i njihovo povezivanje sa ekspresijom gena u srčanom tkivu. Mužjacima *Wistar* pacova je ugrađen radiotelemetrijski transponder, a zatim su nasumično raspoređeni u eksperimentalnu (5 mg/0,5 mL/kg, I.V. doksorubicin; n=18) i kontrolnu grupu (0,5 mL/kg I.V. fiziološki rastvor; n=6). Ehokardiografsko merenje, procena autonomnih spektralnih markera i funkcije barorefleksa su rađeni pre tretmana i na samom kraju protokola. Krv je sakupljena po završetku protokola. Tkiva srca, bubrega i jetre su histološki analizirani posle smrti jedinki. Ehokardiografski, biohemijski i autonomni parametri su korišćeni za identifikovanje fenotipova fenomapijanjem metodom mašinskog učenja. Ekspresija gena je merena *RT-qPCR* metodom. Identifikovana su dva glavna fenotipa kod jedinki koje su razvile doksorubicinsku kardiomiopatiju. Fenotip 1 karakteriše pad ejsione frakcije leve komore, dilatacija leve komore, stanjenje zida leve komore, pad srčane frekvence, povećanje senzitivnosti barorefleksa i NT-proBNP-a. Fenotip 2 karakteriše očuvana ejsiona frakcija leve komore, hipertrofija i povećanje mase leve komore, očuvane vrednosti srčane frekvence, povećanje senzitivnosti barorefleksa i umereno povećanje NT-proBNP-a. U obe grupe je primećen pad ekspresije gena za MYH6, odnosa MYH6 i MYH7, APLN, APLNR, COL1A1, TTN, MYBPC3 i VACM1, odnosno porast ekspresije gena za MYH7 i CTFG. Ipak, između grupa nije bilo razlike u ekspresiji gena, te nije bilo moguće identifikovanje dva genotipa.

**Ključne reči:** doksorubicin, kardiomiopatija, leva komora, transkriptom, pacov, fenomapijanje

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Medicinska farmakologija

**UDK broj:**

# LEFT VENTRICULAR TRANSCRIPTOME IN DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY IN RATS

## Abstract

Cardiomyopathy is the most serious adverse effect of doxorubicin (dox), widely used cytostatic drug. Unfortunately, at present, there is no efficient treatment for doxorubicin-induced cardiomyopathy (DCM). The aim of the present work was to affirm the experimental model of DCM in rats, to distinct phenotypes and associate them to the changes in cardiac transcriptome. Male Wistar rats equipped with radiotelemetry device, were randomized in DOX group (5 mg/0,5 mL/kg, IV dox; n=18) and CONT group (0,5 mL/kg IV saline; n=6). Echocardiography, autonomic spectral markers and baroreceptor reflex evaluation was performed prior to, and after treatment. Blood samples were collected at the end of experimentation. Cardiac, renal and hepatic tissues were histologically analysed post-mortem. Echocardiographic, biochemical and cardiovascular autonomic spectral parameters were used to identified phenotypes by phenomapping, machine learning method. Changes in expression of cardiac genes affected by dox were assessed by RT-qPCR. The results emphasize the existence of two major phenotypes of DCM with comparably high mortality rates. Phenotype 1 is characterized by reduced left ventricular ejection fraction (LVEF), LV dilatation, thinning of LV posterior wall, decreased heart rate (HR), increased baroreceptor reflex sensitivity (BRS) and increased NT-proBNP. Phenotype 2 is characterized by preserved LVEF, LV hypertrophy, increased LV mass, no changes in HR, increased BRS and moderate NT-proBNP increase. Both phenotypes exhibited a decreased gene expression for MYH6, MYH6 and MYH7 ratio, APLN, APLNR, COL1A1, TTN, MYBPC3 and VACM1 and increased gene expression for MYH7 and CTFG. However, due to no difference in gene expression between those phenotypes, we could not identify two genotypes.

**Key words:** doxorubicin, cardiomyopathy, left ventricle, transcriptome, rat, phenomapping

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Medical Pharmacology

**UDK number:**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Doksorubicin	1
1.2. Mehanizam antitumorskog dejstva doksorubicina	4
1.3. Kardiotoksičnost doksorubicina	5
1.4. Mehanizmi doksorubicinske kardiotoksičnosti	6
1.4.1. Oksidativni stress	6
1.4.1.1. NOS i NAPDH zavisna produkcija ROS	6
1.4.1.2. Mitohondrijalno zavisna produkcija ROS	6
1.4.1.3. Kompleks doksorubicina i gvožđa	7
1.4.2. Apoptoza	7
1.4.3. Disregulacija homeostaze kalcijuma	8
1.4.4. Narušavanje energetske homeostaze	8
1.4.5. Remodelovanje ćelijskog matriksa	9
1.5. Metode za dijagnostikovanje doksorubicinske kardiotoksičnosti	10
1.6. Terapijska strategija doksorubicinske kardiomiopatije	11
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>14</b>
3.1. Eksperimentalne životinje	14
3.2. Hirurška implantacija transmitera	14
3.3. Eksperimentalni protokol	15
3.4. Procena opšte toksičnosti	16
3.5. Procena srčane funkcije i morfologije	16
3.6. Autonomni markeri: kratkotrajni varijabilitet krvnog pritiska i srčane frekvence	17
3.6.1. Registrovanje kardiovaskularnih parametara	17
3.6.2. Spektralna analiza SBP, DBP i HR	17
3.6.3. Metoda sekvenci za procenu rada baroreceptorskog refleksa	18
3.7. Određivanje koncentracije markera srčane insuficijencije u krvi	19
3.8. Patohistološka analiza leve komore srca	19
3.8.1. Uzorkovanje i priprema tkiva	19
3.8.2. Imunohistohemijska bojenja	19
3.8.3. Histomorfometrija	19
3.9. Analiza transkriptoma leve komore srca	20
3.9.1. Ekstrakcija RNK	20
3.9.2. Sintaza cDNK	20
3.9.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR)	20
3.10. Određivanje fenotipa i genotipa doksorubicinske kardiomiopatije metodom mašinskog učenja	22
3.11. Korišćene supstance	23
3.12. Statistička analiza	23
<b>4. REZULTATI</b>	<b>24</b>
4.1. Opšta toksičnost i preživljavanje	24
4.2. Funkcija i morfologija srca	26
4.3. Kardiovaskularni varijabilitet i barorefleks	28

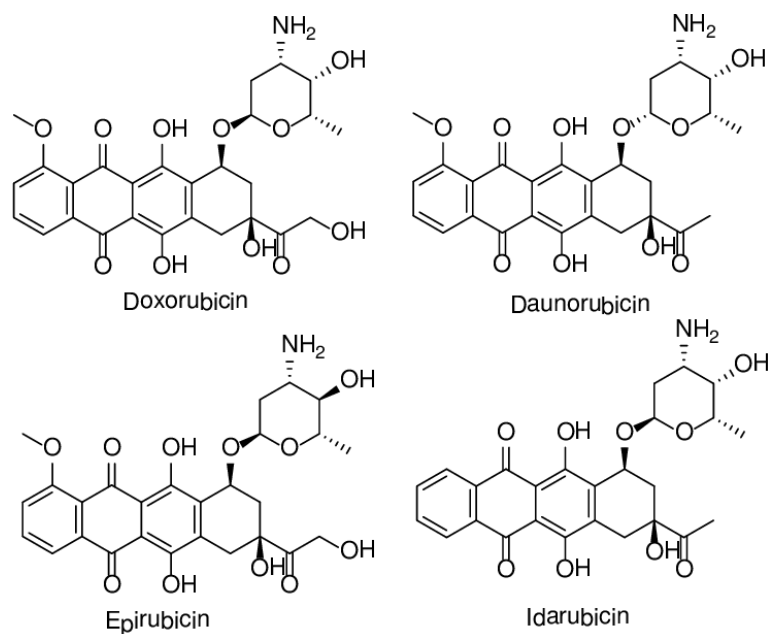
4.3.1. Hedominamski parametri i spontani baroreceptorski refleks	28
4.3.2. Kratkotrajni varijabilitet sistolnog krvog pritiska	29
4.3.3. Kratkotrajni varijabilitet dijastolnog krvnog pritiska	30
4.3.4. Kratkotrajni varijabilitet srčane frekvence	31
4.4. Koncentracije markera srčane insuficijencije u krvi NT-proBNP-a	32
4.5. Patohistološka analiza srčanog mišića	33
4.6. Fenomapiiranje	35
4.7. Transkriptom leve komore srca	37
4.8. Genotipizacija	39
<b>5. DISKUSIJA</b>	<b>41</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>47</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>48</b>



## 1. UVOD

### 1.1. Doksorubicin

Prvi antraciklinski antibiotik sa antitumorskim dejstvom - daunorubicin, izolovan je iz kulture bakterije *Streptomyces peucetius* sredinom 20. veka. Ubrzo nakon toga istraživači iz *FarmItalia*-e su izazivanjem mutacije promenili biološku aktivnost bakterija i stvorili izmenjen soj *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* koji proizvodi izmenjenu molekulu antibiotika. Prvo su je nazvali adriamicin po Jadranskom moru a kasnije doksorubicin zbog crvene boje. Doksorubicin, za razliku od daunorubicina, poseduje hidroksilnu grupu na 14. ugljenikovom atomu koja je doprinela većoj terapijskoj efikasnosti od daunorubicina, terapijskom dejstvu na više tipova tumora kao i bolju podnošljivost (Arcamone i sar., 1969; Blum i Carter, 1974). Kasnije je hemijskom modifikacijom molekula daunorubicina sintetisan idarubicin dok je iz doksorubicina nastao epirubicin (**Slika 1**). Doksorubicin se smatra standardom u odnosu na koji se procenjuju novootkriveni antraciklinski antibiotici (Weiss, 1992).

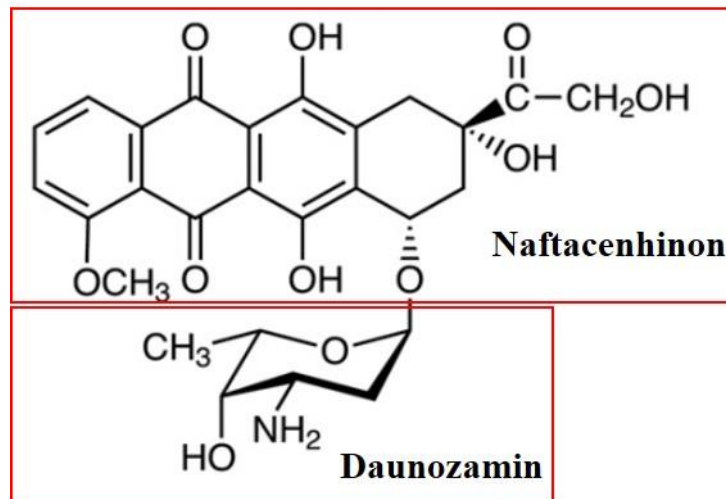


**Slika 1. Hemijske strukture antraciklinskih antibiotika.**

Slika preuzeta od Bhattacharya i Mukherjee, 2015.

Doksorubicin se prvi put registruje za humanu upotrebu u onkologiji u SAD 1974. godine nakon odobrenja FDA (engl. *Food and Drug Administration*) (Sun i sar., 2017), a ubrzo zatim i u većini zemalja sveta. Koristi se kao lek prvog izbora ili u kombinaciji sa drugim antitumorskim lekovima u terapiji mnogobrojnih solidnih i hematoloških tumora. Efikasnost je pokazao u terapiji karcinoma pluća, dojke, jajnika, želuca, bešike, kao akutne leukemije, limfoma, multiplog mijeloma, osteosarkoma i Kapošijevog sarcoma (American Society of Health System Pharmacists, 2017; Sritharan i Sivalingam, 2021).

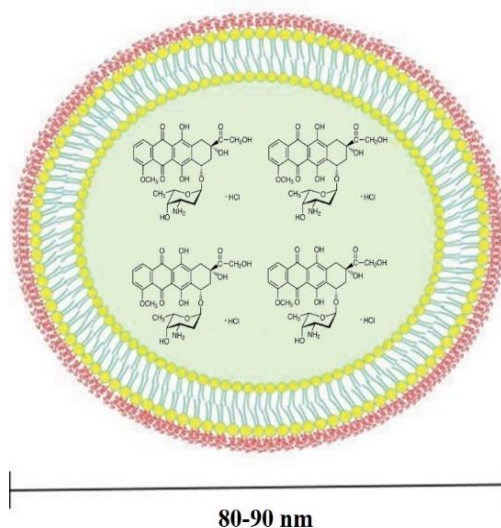
Doksorubicin se sastoji od hinonskog jezgra – naftacenhinona i aminošćera – daunozamina (**Slika 2**). Supstanca ima crvenu fluorescenciju, fotosenzitivna i termosenzitivna je, rastvara se u vodi i lipidima. Zahvaljujući hemijskoj strukturi pored hidrofilnih ima i lipofilna svojstva, zbog čega lako prolazi ćelijske membrane, prostom difuzijom i vezuje se za proteine plazme, nakupljajući se najviše u jedru gde ostvaruje svoje primarno antitumorsko dejstvo (Octavia i sar., 2012; Santos i sar., 2018).



**Slika 2. Hemijska struktura doksorubicina.**

Slika modifikovana i preuzeta sa [www.tcichemicals.com](http://www.tcichemicals.com)

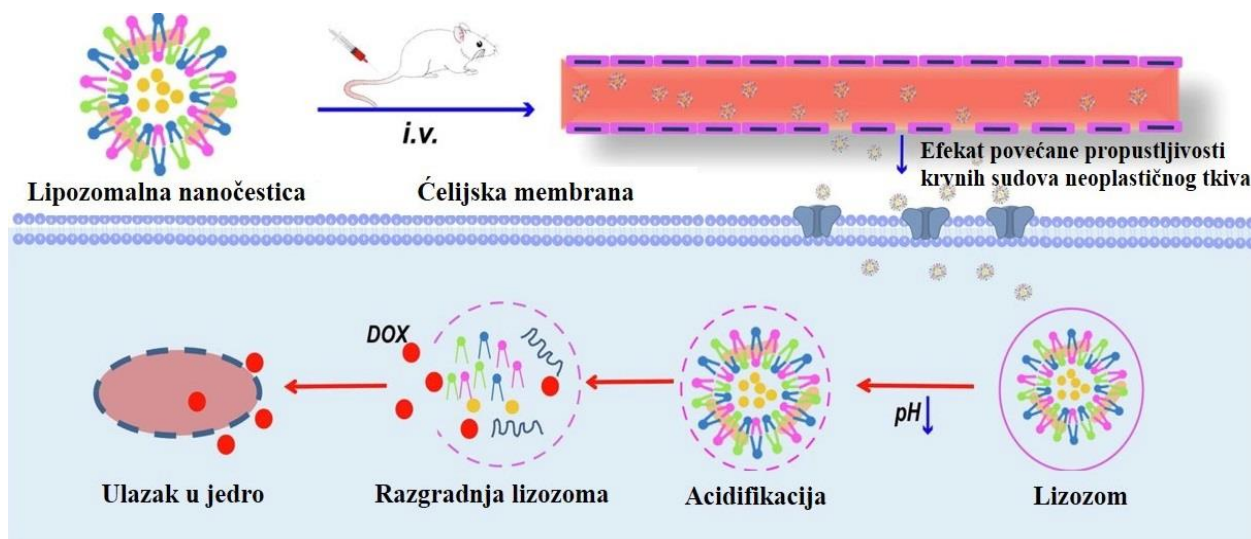
Razvojem nanotehnologije lekova početkom 21. veka napravljen je preparat doksorubicina spakovan u lipozomalne nanočestice da bi se povećala specifičnost dejstva i podnošljivost doksorubicina. Na tržištu su već registrovane čestice doksorubicina u lipozomalnom omotaču koji može biti pegilovan, dodavanjem polietilen glikola (**Slika 3**).



**Slika 3. Pegilovana lipozomalna nanočestica doksorubicina.**

Slika modifikovana i preuzeta od Franco i sar., 2018.

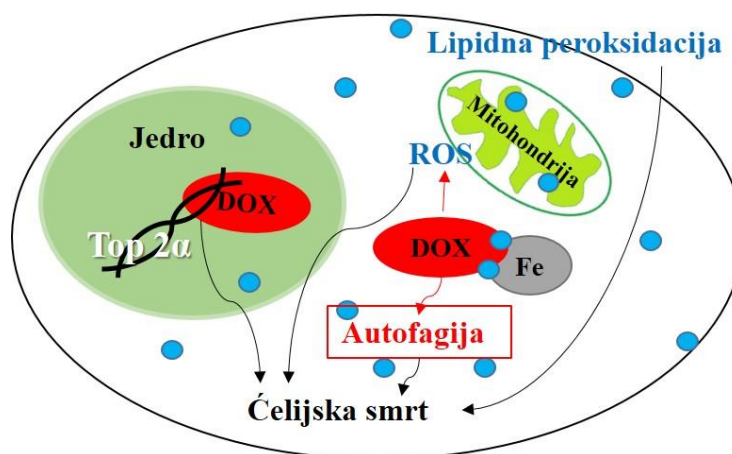
Lipozomalni doksorubicin distribuira se pretežno u tumorsko tkivo. Pasivno ciljanje tumora zasnovano je na tzv. efektu povećane propustljivosti i retencije krvnih sudova neoplastičnog tkiva usled pojačane i defektne angiogeneze i oslabljene limfne drenaže, što nano-nosačima olakšava deponovanje u međucelijskom prostoru tumora. Aktivno ciljanje postiže se konjugovanjem nano-nosača sa molekulima - ligandima, koji se vezuju za antigene ili receptore na površini tumorskih ćelija. Lipozomalni doksorubicin u ćeliju ulazi endocitozom i nakon formiranja endolizozoma oslobađa se u citoplazmi i difunduje u jedro (Peer i sar., 2007), (Slika 4).



**Slika 4. Distribucija nanočestica doksorubicina u tumorsko tkivo**  
Slika modifikovana i preuzeta od Li i sar., 2019.

## 1.2. Mehanizam antitumorskog dejstva doksorubicina

U tumorskim ćelijama doksorubicin ostvaruje citotoksični efekat preko dva mehanizma. Primarni antitumorski mehanizam dejstva je umetanje doksorubicina u lanac DNK i inhibicija enzima topoizomeraze II alfa ( $Top2\alpha$ ) koja je eksprimirana u velikoj meri u brzo proliferišućim tumorskim ćelijama (Giorgio Minotti i sar., 2004; Octavia i sar., 2012; Santos i sar., 2018). Doksorubicin ima veliki afinitet za mesta na lancu bogata CG parovima. Formira vodoničnu vezu sa guaninom, blokira replikaciju nukleotida, odnosno blokira rad DNK i RNK polimeraze, zbog čega se aktivira ćelijski odgovor na oštećenje DNK koji vodi ka programiranoj ćelijskoj smrti. Inhibicijom  $Top2\alpha$ , odnosno stabilizovanjem kompleksa između ovog enzima i DNK lanca sprečava se odmotovanje dvostrukog heliksa DNK lanca i na taj način se dalje sprečavaju replikacija i transkripcija. Ovaj proces takođe vodi ka oštećenju genetskog materijala i iniciranju apoptoze (Santos i sar., 2018). Sekundarni mehanizam antitumorskog dejstva je pojačano stvaranje slobodnih radikala. Prilikom metabolizma doksorubicina u jetri stvara se sekundarni nestabilni metabolit semihinon, koji se zatim u citoplazmi ponovo pretvara u doksorubicin. Tokom ovog procesa se oslobađaju slobodni radikali koji dovode do oksidativnog stresa, oštećenja DNK, proteina i ćelijskih membrana, i na kraju apoptoze. Doksorubicin gradi kompleks sa gvožđem, što takođe dovodi do oslobađanja slobodnih radikala, remeti fiziološku funkciju mitohondrija i intraćelijski metabolizam kalcijuma (Cummings i sar., 1992; G. Minotti i sar., 1998), (Slika 5).



**Slika 5. Mehanizam antitumorskog dejstva doksorubicina.**

DOX: doksorubicin;  $Top2\alpha$ : topoizomeraza II alfa; ROS: slobodni kiseonični radikali; Fe: gvožđe.

### 1.3. Kardiotsiĉnost doksorubicina

Najozbiljnije i najteŹe neŹeljeno dejstvo primene doksorubicina je kardiotsiĉnost. Istim mehanizmom kojim inhibira Top2 $\alpha$ , doksorubicin inhibira topoizomerazu II beta (Top2 $\beta$ ) koja se nalazi u kardiomiocitima i dovodi do njihove apoptoze (McGowan i sar., 2017). TakoŹe, doksorubicinom izazvano Źtetno nagomilavanje slobodnih radikala, remećenje rada mitonohondrija i metabolizma kalcijuma, koje osim tumorskih ćelija, pogaŹa i oŹtećuje i srćane ćelije, doprinosi kardiotsiĉnom efektu ovog antitumorskog leka (Octavia i sar., 2012; Santos i sar., 2018). Nastala doksorubicinska kardiotsiĉnost, u odnosu na vreme javljanja, moŹe biti akutna i hroniĉna. Akutna kardiotsiĉnost se javlja nekoliko dana od dana primene doksorubicina i tada je najĉeŹe reverzibilna. Manifestuje se u najvećem broju slućajeva, kod 20-30% pacijenata kao aritmija, sinusna tahikardija, supraventrikularna tahikardija ili atrio-ventrikularna ekstrasistola. Od akutnih simptoma kardiotsiĉnosti se joŹ javljaju mioperikarditis i disfunkcija leve komore. Hroniĉna kardiotsiĉnost se javlja nekoliko meseci pa i nekoliko godina od primene doksorubicina. Ona je dosta reŹa, javlja se kod manje od 10% pacijenata, ali kako raste kumulativna doza doksorubicina koja je primenjena tako i procenat pacijenata kod kojih se javlja hroniĉna kardiotsiĉnost raste i do preko 20%. Manifestuje se kao ireverzibilna kardiomiopatija, koja posle nekog vremena prelazi u hroniĉnu srćanu insuficijenciju. Smrtnost od hroniĉne srćane insuficijencije je 50% u narednih godinu od pojave simptoma. Kontraindikacije za primenu doksorubicina su već postojeća oŹtećenja srćanog miŹića i anemije (Gianni i sar., 2008; Oikonomou i sar., 2018).

Kliniĉka manifestacija kardiotsiĉnosti moŹe se javiti neposredno posle prve doze doksorubicina, u toku terapije ili neposredno nakon zavrŹetka terapije, kao akutna ali i mesecima i godinama kasnije poprimajući hroniĉni tok. Starost pacijenta, prethodna primena antitumorske terapije, kardiovaskularni komorbiditeti, već postojeća hipertenzija, ishemijska bolest, srćana insuficijencija i druga oboljenja, primena velikih doza na samom poĉetku i istovremena primena radioterapije ili drugih kardiotsiĉnih lekova, povećavaju incidencu i stepen oŹtećenja srca. Pacijenti kod kojih se pregledom utvrde već prisutne kardiovaskularne bolesti nastavljaju sa kardiovaskularnom terapijom koju već koriste, ali se vrŹi optimizacija terapije. Doze kardiovaskularnih lekova će biti povećane, a doze antitumorske terapije biti minimalne za koje se procenjuje da će imati terapijski efekat. Primena novijih, lipozomalnih nano oblika doksorubicina, iako ne sprećava nastanak kardiotsiĉnosti, znaćajno smanjuje Źanse za nastanak kardiotsiĉnosti u odnosu na primenu konvencionalnog doksorubicina (Curigliano i sar., 2020), Źto je pokazano u kliniĉkim studijama kod pacientkinja lećenih od kancera dojke i ovarijuma (Xing i sar., 2015; Gil-Gil i sar., 2021; Li i sar., 2022).

## 1.4. Mehanizmi doksorubicinske kardiotoksičnosti

Najvažniji mehanizmi odgovorni za razvoj doksorubicinske kardiotoksičnosti su oksidativni stres, apoptoza, disregulacija homeostaze kalcijuma, narušavanje energetske homeostaze i remodelovanje ćelijskog matriksa (Octavia i sar., 2012), (**Slika 6**).

### 1.4.1. Oksidativni stres

Poznato je da je glavni uzrok doksorubicinske kardiotoksičnosti povećan oksidativni stres (Octavia i sar., 2012). Stvaranje slobodnih radikala je primarni razlog oštećenja kardiomiocita nastalog usled primene doksorubicina (Horenstein i sar., 2000). Doksorubicinska kardiomiopatija je u najvećoj meri indukovana povećanom produkcijom slobodnih kiseoničnih radikala, ROS (engl. *reactive oxygen species*), poput superoksida i hidrosil radikala, slobodnih azotnih radikala i lipidnom peroksidacijom u srčanom tkivu. Enzimi i procesi koji dovode do oksidativnog stresa su NOS (engl. *nitric oxide synthase*), NADPH oksidaze (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*), odnosno produkcija slobodnih radikala u mitohondrijama i stvaranje kompleksa između doksorubicina i gvožđa (Xu i sar., 2001). Srčane ćelije su osetljivije od ostalih tkiva na oksidativni stres zbog smanjene koncentracije antioksidanasa koje poseduju (Raj i sar., 2014).

#### 1.4.1.1. NOS i NADPH zavisna produkcija ROS

Doksorubicin se vezuje za eNOS (engl. *endothelial nitric oxide synthase*) reduktivne enzime i dolazi do stvaranja doksorubicinskih semihinonskih radikala. Zatim u prisustvu enzima NADPH oksidaze i mitohondrijalne NADH dehidrogenaze, doksorubicinski semihinonski radikali vrše redukciju jednog elektrona slobodnog kiseonika i tako stvaraju superoksidne slobodne radikale (Octavia i sar., 2012). Narušavanje balansa, odnosno smanjeno stvaranje azotnog oksida i povećano stvaranje slobodnih radikala dovodi do oštećenja srčanih ćelija (Griffith i Stuehr, 1995). Doksorubicin reaguje i sa iNOS (engl. *inducible nitric oxide synthase*) povećavajući sintezu nitrotirozina i mitohondrijalnih superoksida, što dovodi do stvaranja azot dioksida i karbonilnih radikala. Svi zajedno indukuju oksidativni stres i oštećenje kardiomiocita. Nasuprot ovome, nije zabeleženo značajnije stvaranje slobodnih radikala pri reakciji doksorubicina sa nNOS (engl. *neuronal nitric oxide synthase*), (Mukhopadhyay i sar., 2009).

Već pomenute NADPH oksidaze, osim što imaju ulogu u reakciji između doksorubicinskih semihinonskih oblika i slobodnog kiseonika u stvaranju slobodnih kiseoničnih radikala, takođe ulaze direktno u reakciju sa doksorubicinom, poput NOS enzima, u kojoj se stvaraju upravo ti semihinonski oblici doksorubicina. Zbog toga se izdvajaju kao poseban mehanizam indukovanja oksidativnog stresa kod primene doksorubicina (Octavia i sar., 2012)

#### 1.4.1.2. Mitohondrijalno zavisna produkcija ROS

Doksorubicin se u srčanim ćelijama u velikoj meri nakuplja u mitohondrijama. Lako se vezuje za mitohondrijalnu mebranu, sa velikim afinitetom stvarajući ireverzibilnu vezu sa kardiolipinom. Na ovaj način se remeti elektronski transportni lanac, dolazi do narušavanja fizioloških funkcija mitohondrija i stvaranja superoksidnih slobodnih radikala koji oštećuju strukturu srčane ćelije (Goormaghtigh i sar., 1980). Dodatno se u mitohondrijama smanjuje oksidacija masnih kiselina dugog lanca, zbog čega se povećava iskorišćavanje glukoze, odnosno povećava se udeo anaerobnog metabolizma. Ovaj proces narušava kontraktilnost i relaksaciju srčanih ćelija dovodeći do srčane insuficijencije (Carvalho i sar., 2010).

### 1.4.1.3. Kompleks doksorubicina i gvožđa

Pozitivni naboj doksorubicina mu obezbeđuje veliki afinitet za vezivanje za slobodne jone gvožđa u srčanim ćelijama i njihovo nakupljanje unutar mitohondrija. Stvara se kompleks doksorubicina i gvožđa koji utiče na sam metabolizam gvožđa, reaguje sa slobodnim kiseonikom i stvara slobodne kiseonične radikale i slobodne azotne radikale, te dovodi do lipidne peroksidacije koja oštećuje lipide, nukleinske kiseline i proteine srčanih ćelija i vodi ka kardiotoksičnosti. Iako u zdravom organizmu ne postoji dovoljna koncentracija slobodnih jona gvožđa za građenje kompleksa koji bi doveli do značajnog oštećenja srčanog mišića, pokazano je da doksorubicin, pre svega njegov metabolit doksorubicinol, utiče na određene proteine, transportere gvožđa. Konkretno, vezuje se za transferin i IRP-1 (engl. *iron regulatory protein-1*), inhibira njihove funkcije i raskida vezu sa jonima gvožđa i tako povećava koncentraciju slobodnog gvožđa u organizmu, pre svega unutar srčane ćelije. Poseban problem predstavlja to što pacijenti koji su podvrgnuti antitumorskoj terapiji, kako bi se sprečila ili ublažila anemija, uzimaju suplementaciju u većem obimu koja u sebi sadrži gvožđe (Gutteridge, 1984; Ichikawa i sar., 2014).

### 1.4.2. Apoptoza

Primena doksorubicina stimuliše aktivaciju i unutrašnjih i spoljašnjih signalnih puteva apoptoze (Ghigo i sar., 2016). Ovi signalni putevi su odgovorni za apoptozu srčanih ćelija koja nastaje pre svega zbog narušene ravnoteže između oksidanasa i antioksidanasa. Doksorubicin takođe stimuliše mehanizme apoptoze koji nisu posledica oksidativnog stresa, mada sama apoptoza generiše stvaranje slobodnih radikala (Outomuro i sar., 2007).

Doksorubicin dovodi do stvaranja oksidativnog stresa tako što aktivira HSF-1 (engl. *heat shock factor 1*), koji dalje indukuje HSP-25 (engl. *heat shock protein 25*). Ovaj protein vrši stabilizaciju p53 proteina koji je odgovoran za generisanje proapoptotskih faktora koji uzrokuju smrt srčanih ćelija, kao što su FasL, Fas, c-Myc, i p53 (Vedam i sar., 2010). Ove proapoptotske faktore aktivira i transkripcioni faktor NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa B cells*), čija je transkripcija povećana i usled nastalog oksidativnog stresa (Suwei Wang i sar., 2002). Aktivacija i stabilizacija p53 proteina dovodi do povećane ekspresije Bax gena (engl. *bcl-2 associated x-protein*), koja kao krajnji rezultat ima pokretanje unutrašnjeg apoptotskog puta, aktivaciju citohroma c i aktivaciju kaspaza (S. Wang i sar., 2000).

Nastali oksidativni stres indukuje ASK-1 (engl. *apoptosis-signal regulating kinase-1*), koji aktivira JNK (engl. *jun NH2-terminal kinase*) i p38 MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) signalne puteve koji vode ka apoptozi (Xia i sar., 1995). Inhibicijom PI3K (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i Akt (eng. *protein kinase B*) signalnog puta, doksorubicin indirektno indukuje Bad (*BCL2 associated agonist of cell death*) proteine, koji imaju ulogu u procesima ćelijske smrti (Fan i sar., 2008). Takođe, doksorubicin aktivira kaspazu-3, jedan od glavnih lizozomalnih enzima koji učestvuje u apoptozi (Ueno i sar., 2006).

Doksorubicin povećava ekspresiju takozvanih receptora smrti (engl. *death receptors*), kao što su TNFR1 (engl. *tumor necrosis factor receptor 1*), Fas, DR4, i DR5 i na proteinskom nivou i na nivou gena (Zhao i Zhang, 2017). Ovi receptori prenose signale spoljašnjeg apoptotskog puta u ćeliju. Kao najnoviji receptori smrti koje doksorubicin indukuje, otkriveni su TLR-2 (engl. *toll-like receptor-2*) i TLR-4 (engl. *toll-like receptor-4*). TLR-2 indukuje apoptozu aktivacijom kaspaze 8 i FADD (engl. *Fas-associated death domain*), dok TLR-4 se indukuje ako su pre toga indukovani HSP-70 i NF- $\kappa$ B (Aliprantis, 2000).

### 1.4.3. Disregulacija homeostaze kalcijuma

Kontrola nivoa kalcijuma unutar srčanih ćelija je važan mehanizam kojim se obezbeđuje fiziološki ritam srčanih kontrakcija. Studije su pokazale da doksorubicin narušava homeostazu kalcijuma unutar kardiomiocita i na taj način doprinosi patogenezi doksorubicinske kardiomiopatije. Povećanje koncentracije intracelularnog kalcijuma su istovremeno i posledica i uzrok stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala, te jednim delom ovaj mehanizam kardiotoksičnosti spada u mehanizme koji dovode do oksidativnog stresa, ali i apoptoze. Identifikovano je nekoliko mehanizama koji dovode do povećanja nivoa kalcijuma unutar srčanih ćelija (Octavia i sar., 2012; Salazar-Mendiguchía i sar., 2014).

Doksorubicinol inhibira natrijum/kalcijum jonski kanal na sarkolemi u smeru smanjenog izbacivanja kalcijuma iz srčane ćelije. Takođe inhibira i natrijum/kalijum jonski kanal na sarkolemi, tako da sa povećanom koncentracijom natrijuma unutar srčane ćelije on biva razmenjen za kalcijum koji ulazi unutar ćelije (Zhou i sar., 2001). Dodatno se inhibira kalcijumska pumpa na sarkoplazmatičnom retikulumu, te kalcijum većinski ostaje u sarkoplazmi umesto da ulazi u retikulum i povećava aktivnost L tipa kalcijumovih kanala kojima kalcijum ulazi unutar ćelije (Keung i sar., 1991). Doksorubicin utiče i na ekspresiju gena koji kodiraju proteine za rijanodinske receptore, preko kojih kalcijum ulazi u ćeliju, te proteine za sarkoplazmazični ATP-azni retikulum, fosfolamban i proteine odgovorne za skladištenje kalcijuma unutar mitohondrija. Svim ovim mehanizmima pre svega dolazi do povećanja koncentracije kalcijuma u sarkoplazmi, a kao posledica toga dolazi i do nepravilnih kontrakcija srčanog mišića tokom sistole i dijastole (Menna i sar., 2008; Rawat i sar., 2021).

Povećana intracelularna koncentracija kalcijuma u kardiomiocima dovodi do aktivacije kalpaina, kalcijumskih proteaza. Kalpainsi vrše razgranju titina, glavnog strukturnog proteina sarkomera, i aktiviraju kaspazu-12, koja pokreće signalne puteve apoptoze (Jang i sar., 2004). Povećana koncentracija kalcijuma u sarkoplazmi takođe stimuliše aktivaciju ciklosporin senzitivnih kalcijumovih kanala koji dovode do mitohondrijalne disfunkcije zbog smanjenog deponovanja kalcijuma u mitohondrijama, te aktivacije kaspaze 3, kaspaze 9, kalmodulin aktivirane protein kinaze i vodonik peroksida koji učestvuju u procesu apoptoze. Povećanje nivoa kalcijuma u sarkoplazmi dovodi do aktivacije kalcineurina i aktivacije apoptoskih puteva (Mitry i Edwards, 2016; Tscheschner i sar., 2019).

### 1.4.4. Narušavanje energetske homeostaze

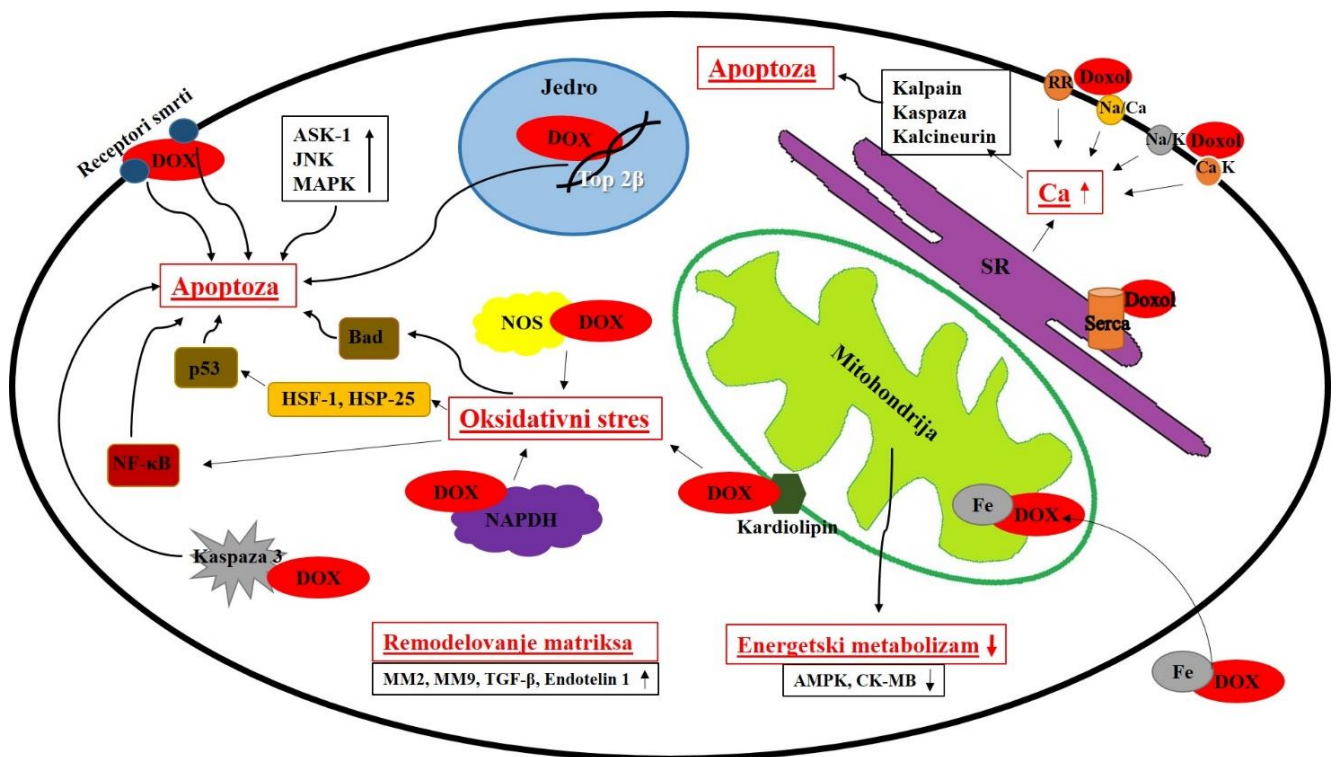
AMP aktivna protein kinaza ima važnu ulogu u energetske homeostazi ćelije, odnosno reguliše preuzimanje i oksidaciju glukoze i masnih kiselina. Doksorubicin smanjuje aktivaciju ovog enzima, odnosno blokira AMPK signalni put, kao i smanjenje aktivacije ACC (engl. *Acetyl-coA carboxylase*) enzima, što dovodi do nastanka oksidativnog stresa, smanjene produkcije energije i oštećenja genetskog materijala (Timm i Tyler, 2020).

Kreatin kinaza, odnosno izoforma koja se nalazi u srčanim ćelijama, CK-MB (engl. *creatine kinase myocardial band*), stvara energetske rezerve pretvarajući kreatinin u fosfo-kreatinin, koristeći ATP kao supstrat. Kako doksorubicin preko više mehanizama inhibira fiziološku funkciju mitohondrija, samim tim se smanjuje i količina ATP-a proizvedena u srčanoj ćeliji. Doksorubicin u prisustvu slobodnih jona gvožđa stvara slobodne azotne radikale, peroksinitrite, koji oštećuju sam izoenzim CK-MB. Krajni rezultat su smanjene energetske rezerve u kardiomitima što dodatno narušava fiziološku kontraktilnost već oštećenog miokarda (Mihm i sar., 2002).



#### 1.4.5. Remodelovanje ćelijskog matriksa

Doksorubicin utiče na matriks metaloproteinaze, enzima koji imaju ulogu u remodelovanju ćelijskog matriksa. Doksorubicin inhibira sintezu matriks metaloproteinaze 1 u tumorskim ćelijama, čime otežava njihovu pokretljivost. Sa druge strane, oksidativni stres nastao pod uticajem doksorubicina u srčanim ćelijama aktivira matriks metaloproteinazu 2 i matriks metaloproteinazu 9, što dovodi do aktivacije TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) i povećanog stvaranja i deponovanja kolagena, odnosno indukuje fibrozu srčanog tkiva (Spallarossa i sar., 2006). Posle tretmana doksorubicinom beleži se i porast endotelina 1 u kardiomiocitima koji stimuliše proces hipertrofije miokarda (Bien i sar., 2007).



**Slika 6. Mehanizmi doksorubicinske kardiotoksičnosti.**

DOX: doksorubicin; Doxol: doksorubicinol; Fe: gvožđe; Top2 $\beta$ : topoizomeraza II beta; SR: sarkoplazmatski retikulum; ASk-1: engl. *apoptosis-signal regulating kinase-1*; JNK: engl. *jun NH2-terminal kinase*; MAPK: engl. *mitogen-activated protein kinase*; Bad: engl. *BCL2 associated agonist of cell death*; NF- $\kappa$ B: engl. *nuclear factor kappa B cells*; HSF-1: engl. *heat shock factor 1*; HSP-25: *heat shock protein 25*; NOS: engl. *nitric oxide synthase*; NAPDH: engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*; RR: rijanodinski receptor; Na/Ca: natrijum/kalcijum jonski kanal; Na/K: natrijum/kalijum jonski kanal; Ca K: kalcijumov kanal L-tip; Serca: engl. *sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*; MM2: matriks metaloproteinaza 2; MM9: matriks metaloproteinaza 9; TGF- $\beta$ : engl. *transforming growth factor  $\beta$* ; AMPK: AMP aktivna protein kinaza; CK-MB: engl. *creatine kinase myocardial band*.

## 1.5. Metode za dijagnostikovanje doksorubicinske kardiotoksičnosti

Merenje i praćenje kardiovaskularnih parametara vizuelnim tehnikama kod pacijenata koji su podvrgnuti hemioterapiji je ključan i prvi korak u dijagnostikovanju kardiotoksičnosti pre nastupanja ireverzibilnog oštećenja srca. Merenje specifičnih kardijalnih biomarkera se takođe koristi kao pouzdan metod za dijagnozu i praćenje kardiotoksičnosti izazvane antitumorskim lekovima. S obzirom na jako ograničene terapijske mogućnosti, bitno je na vreme uočiti subkliničke forme kardiotoksičnosti, kako bi se terapija doksorubicinom blagovremeno prekinula i sprečilo ireverzibilno oštećenje miokarda (Jain i sar., 2017).

Procena ejekcione frakcije leve komore (engl. *Left Ventricular Ejection Fraction-LVEF*) je opšte prihvaćeni parametar za procenu srčane funkcije. Vrednost LVEF ispod 55% i pad veći od 5% u odnosu na vrednost pre početka terapije ili samo smanjenje LVEF veće od 10% su kriterijumi za dijagnostikovanje oštećenja srca izazvanog lekovima. FDA je predložila blaži kriterijum, smanjenje ejekcione frakcije ispod 40-45%, odnosno smanjenje ejekcione frakcije preko 10% u odnosu na vrednost pre početka terapije (Dong i Chen, 2018). Međutim, LVEF nije osetljiv parametar za rano otkrivanje srčane slabosti. Promena LVEF se registruje onda kada je srčani mišić značajno oštećen morfološki. Iako su radionuklidna ventrikulografija, miokardijalni strejn i pre svega magnetna rezonanca dosta specifičnije i senzitivnije tehnike, i mogu detektovati subkliničke promene u radu srčanog mišića koje se javljaju pre pada LVEF, dvodimenzionalna ehokardiografija je zbog svoje dostupnosti, neinvazivnosti, jednostavnog korišćenja, bezbednosti i cene, i dalje zlatni standard u onkološkoj praksi za otkrivanje i praćenje kardiotoksičnosti u toku i nakon prestanka hemioterapije (Thavendiranathan i sar., 2013). Korišćenje različitih tehnika vizuelnog praćenja rada srca nije preporučljivo zbog razlika u prezentovanju i tumačenju rezultata. Zbog toga se preporučuje odabir jednog vizuelnog metoda za kontinuirano praćenje funkcije leve komore tokom hemioterapije (Cardinale i sar., 2016). Produženi QT segment na ekogardiogramu ukazuje na povećani rizik od nastanka aritmija (Curigliano i sar., 2020).

Prednost biohemijskih metoda je preciznost, široka dostupnost i pristupačna cena. Kardijalni troponini su regulatorni proteini koji regulišu kontraktilnost kardiomiocita povezujući aktin i miozin. Kod zdravih ljudi troponini se ne mogu detektovati u krvi, dok se prilikom oštećenja srčanog mišića njihova koncentracija povećava u roku od nekoliko sati, mnogo pre razvoja srčane dekompenzacije. Zbog toga, u kliničkoj praksi kardijalni troponini T i I su merilo oštećenja kardiomiocita. Pokazano je da postoji značajna korelacija između povećanja koncentracije troponina u krvi sa naknadnim padom ejekcione frakcije leve komore srca (Colombo i sar., 2014). Natriuretski peptid (BNP) sintetišu i luče srčane ćelije u cirkulaciju kada dođe do njihove distenzije usled povećanja intravaskularnog volumena. BNP i NT-proBNP (engl. *N-terminal proBrain Natriuretic Peptide*) koriste se u kardiološkoj praksi za dijagnostikovanje srčane insuficijencije i procenu efikasnosti terapije. Neka istraživanja sugerišu da kod pacijenata koji primaju manje ili srednje doze antraciklina, koncentracija NT-proBNP-a je osetljiviji pokazatelj kardiotoksičnosti od troponina (Christenson i sar., 2015). Troponini i NT-proBNP se luče kod dekompenzovane kardiomiopatije i samim tim ne mogu biti korišćeni kao rani biomarkeri (Novo i sar., 2016).

Dakle, kombinacija ehokardiografske procene morfologije i funkcije srca, pre svega ejekcione frakcije leve komore, kao i određivanja biohemijskih markera oštećenja srčanih ćelija, troponina i biohemijskih markera srčane dekompenzacije, NT-proBNP-a, predstavlja osnovu dijagnostikovanja kardiotoksičnosti doksorubicina u kliničkoj praksi. Ovaj postupak se ponavlja pre primene svake sledeće doze kardiotoksičnog leka (Sawaya i sar., 2012). Ipak, treba napomenuti da ni ehokardiografija ni biohemijski markeri nisu specifični za doksorubicinsku kardiomiopatiju. Specifične metode, kao biopsija srca, su invazivne, komplikovane i neprihvatljive u rutinskoj kontroli.

## 1.6. Terapijska strategija doksorubicinske kardiomiopatije

Deksrazoksan se ordinira u prevenciji antraciklinske kardiotoksičnosti i predstavlja jedini specifični antidot u slučaju pojave kardiotoksičnosti (Tocchetti i sar., 2019), (**Tabela 1**). On je derivat etilendiamintetrasirćetne kiseline i jedini lek koji je od strane FDA odobren kao kardioprotektivan lek u terapiji doksorubicinske kardiotoksičnosti (Corremans i sar., 2019). Deksrazoksan se vezuje se za topoizomerazu 2 beta, za isto mesto gde se vezuju antraciklini, i tako sprečava inhibiciju replikacije DNK u srčanim ćelijama, ali ne i u ćelijama tumora, te tako ne inhibira njegovo antitumorsko dejstvo. Takođe, helacijom gvožđa se inhibira stvaranje kompleksa gvožđa i antraciklina, čime se sprečava stvaranje izuzetno reaktivnog hidroksil-radikala. Međutim, zbog svojih neželjenih dejstava, pre svega povećanog rizika od pojave sekundarnih tumora, njegovo korišćenje se ograničava kod odraslih pacijenata koji primaju kumulativne doze doksorubicina veće od 300 mg/m<sup>2</sup> (Jain i sar., 2017).

Osim deksrazoksana, koji ima malu efikasnost u prevenciji i nema efikasnost u terapiji razvijene forme kardiomiopatije, ostali lekovi su nespecifični i koriste se u terapiji sistolne srčane insuficijencije, HFrEF. Tu spadaju inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE inhibitori), blokatori angiotenzinskih receptora (sartani), beta blokatori, kombinovani blokator angiotenzina i neprilizina (engl. *ARNI*), antagonisti mineralokortikoidnih receptora, diuretici koji štede kalijum, spironolakton i inhibitori natrijum-glukoznog kotransportera 2 (engl. *SGLT2*), (**Tabela 1**). Ove grupe lekova su pokazale kardioprotektivni efekat kod pacijenata koji su primali antraciklinske antibiotike. Lekovi su uzimani pre, posle, ili i pre i posle antitumorske terapije. Mehanizam kardioprotektivnog dejstva povezuje se sa smanjivanjem srčanog rada, smanjenjem srčane frekvence i rasterećenjem srca preraspodelom krvi prema periferiji. Ukoliko se javu poremećaji srčanog ritma u terapiju se uvode antiaritmici, a za srčanu dekompenzaciju pozitivno inotropni lekovi, glikozidi digitalisa (Tocchetti i sar., 2019). U kardiološkoj praksi ordiniraju se i statini i antagonisti aldosterona koji sprečavaju fibrozirajući proces u srcu, kao i inhibitori 5'fosfodiesteraze i  $\alpha 1$  antagonisti jer dovode do vazodilatacije i tako smanjuju opterećenje srčanih komora i periferni otpor, odnosno indirektno smanjuju apoptotske i fibrozirajuće procese u kardiomiocitima (Cadeddu i sar., 2016). Efikasnost ovih lekova u prevenciji i lečenju doksorubicinske kardiomiopatije je mala. Ona ne sprečava značajno razvoj kardiomiopatije niti dovodi do regresije promena nakon prestanka terapije doksorubicinom.

**Tabela 1. Lekovi u prevenciji i terapiji doksorubicinske kardiotoksičnosti.**

Specifična terapija	Nespecifična terapija
Deksrazoksan	Inhibitori angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE inhibitori)
	Blokatori angiotenzinskih receptora
	Beta blokatori
	Kombinovani blokator angiotenzina i neprilizina (engl. <i>ARNI</i> )
	Antagonisti mineralokortikoidnih receptora
	Diuretici koji štede kalijum
	Inhibitori natrijum-glukoznog kotransportera 2 (engl. <i>SGLT2</i> )

Sva dosadašnja saznanja o etiopatogenezi doksorubicinske kardiomiopatije potiču iz eksperimentalnih i kliničkih studija na ispitanicima koji su razvili dilatacioni oblik srčane slabosti. Međutim, u svetlu najnovije kardiološke prakse smatra se da postoji više tipova srčane slabosti (McDonagh i sar., 2022). Kardiomiopatija može da nastane kao dilatatorna forma, sa smanjenom ejectionom frakcijom leve komore i povećanim end-dijastolnim volumenom (engl. *heart failure with reduced ejection fraction- HFrEF*), odnosno kao hipertrofična kardiomiopatija sa očuvanom ejectionom frakcijom leve komore i znacima zadebljana srčanog mišića (engl. *heart failure with preserved ejection fraction-HFpEF*). Srčana slabost bez promene LVEF teže se dijagnostikuje, ima istu smrtnost kao HFrEF i slabiji odgovor na postojeću terapiju. U svim dosadašnjim istraživanjima o mehanizmima doksorubicinske kardiomiopatije uvršćavane su isključivo eksperimentalne životinje koje su razvile dilatatornu formu kardiomiopatije (Riehle i Bauersachs, 2019).

Mi smo pretpostavili da višestruki mehanizmi kardiotoksičnosti mogu da dovedu do različitih kliničkih prezentacija srčane slabosti izazvane dokorubicinom koje karakterišu različiti transkriptomi leve komore srca pacova i ukazati na nova ciljna mesta za delovanje lekova.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Ciljevi istraživanja bili su:

1. Mapiranje fenotipa kardiomiopatije izazvane doksorubicinom na osnovu ehokardiografskih, biohemijskih i autonomnih karakteristika metodom mašinskog učenja bez nadzora.
2. Određivanje transkriptoma leve komore srca koja ukazuje na promene genotipa leve komore kod kardiomiopatije izazvane doksorubicinom.
3. Povezivanje fenotipa i genotipa kardiomiopatije izazvane doksorubicinom.

### 3. MATERIJAL I METODE

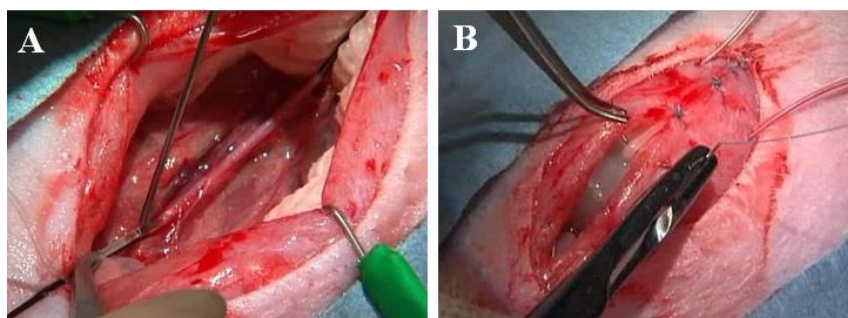
Sve eksperimentalne procedure su izvedene u saglasnosti sa Direktivom 2010/63/EU i Aktom o dobrobiti životinja 2009/6/RS, kao i Pravilnikom 2010/RS. Izvođenje eksperimenata odobreno je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta za rad sa ogleđnim životinjama i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (broj rešenja: 323-07-12661/2021-05).

#### 3.1. Eksperimentalne životinje

U ovom eksperimentalnom istraživanju su korišćeni mužjaci Wistar nesrodničkog soja, starosti dvadeset nedelja, telesne mase 300-350g, iz uzgajivačnice Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Broj životinja neophodnih za eksperiment je određen poštujući etičke norme i 3R princip, korišćenjem softvera *Power Sample Size Calculation* (<http://biostat.mc.vanderbilt.edu>) koji uzima u obzir varijabilnost parametara unutar grupe (varijansa) za snagu 90% i verovatnoću greške 0,05. Tokom eksperimenta, pacovi su bili smešteni u laboratoriji pod ambijentalnim uslovima prilagođenim za Wistar pacove, temperatura 22-24°C, vlažnost vazduha 65-70%, 12:12h ciklus svetlost/tama. Hrana, komercijalni briketi sa 0.2% sadržaja natrijuma (Veterinarski zavod, Subotica, Republika Srbija) i voda iz česme su im bili dostupni *ad libitum*.

#### 3.2. Hirurška implantacija transmitera

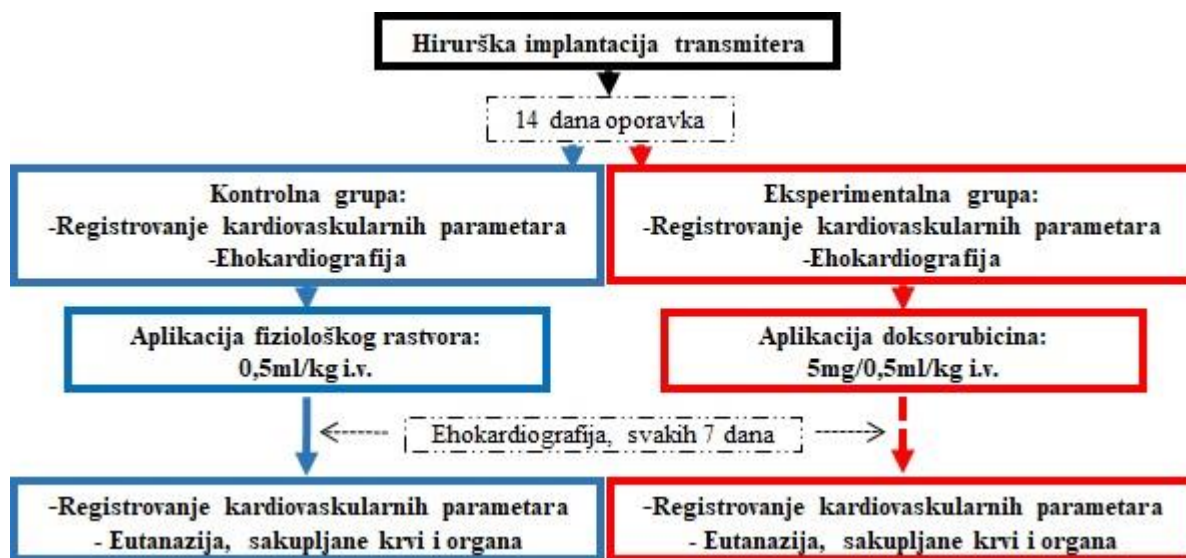
Nakon perioda adaptacije na laboratorijske uslove u trajanju od 48 časova, pacovima je postavljen radiotelemetrijski transmitter (TA11-PA C40; *DSI, Transoma Medical*, MN, USA) u abdominalnu aortu radi kontinuiranog registrovanja arterijskog krvnog pritiska. Pre ovoga pacovi su uvedeni u opštu anesteziju kombinacijom ksilazina 2% (10 mg/kg i.m.) i ketamina 10% (90 mg/kg i.m.). Dubina anestezije je proveravana odsustvom kornealnog i patelarnog refleksa. Telesna temperatura tokom anestezije je održavana električnom podloškom. Nakon brijanja dlake, pravio se rez dužine 3 cm na sredini trbuha, praćen retrakcijom creva, za postavljanje vrha katetera radiotransmitera u trbušnu aortu (**Slika 7A**). Telo transmitera je pričvršćeno neresorptivnim koncem za prednji trbušni zid a koža zašivena resorptivnim koncem čvorastim šavovima i tretirana lokalnim antiseptikom (**Slika 7B**). Dan pre, tokom intervencije i nekoliko dana posle operativnog zahvata, pacovi su bili tretirani lekovima protiv bolova, karprofenom 5 mg/kg/dan, s.c., i antibiotikom, gentamicinom 2.5. mg/kg i.m., za sprečavanje sekundarne bakterijske infekcije. Tokom oporavka u trajanju od najmanje deset dana, pacovi su bili smešteni u individualne kaveze od pleksiglasa (30 × 30 × 30 cm), podvrgnuti dnevnom nadzoru i brizi, odnosno praćenju njihovog oporavka.



**Slika 7. Implantacija radiotelemetrijskog transmitera.**

### 3.3. Eksperimentalni protokol

Nakon potpunog oporavka od operacije, najmanje 14 dana, životinje su metodom slučajnog izbora bile razvrstane u dve eksperimentalne grupe: kontrolnu grupu (n=6), CONT i doksorubicinsku grupu (n=18), DOX. Pre tretmana životinjama je određena telesna masa, ehokardiografski parametri i autonomni markeri kardiovaskularnih parametara. Pacovima iz doksorubicinske grupe je aplikovan doksorubicin (5 mg/0,5 ml/kg i.v.) po prethodno utvrđenoj dozi za koju je već pokazano da je pouzdan doksorubicinski model kardiotoksičnosti (Duncan i sar., 1998; Cheah i sar., 2017). Pacovima u kontrolnoj grupi je davan fiziološki rastvor (0,5 ml/kg i.v.). Intravenska aplikacija doksorubicina i fiziološkog rastvora je vršena nakon ekspozicije jugularne vene pod kratkotrajnom anestezijom, za koju je korišćena kombinacija acepromazina (0,5 mg/kg i.m.) i ketamina (90 mg/kg i.m.). Svim životinjama je jednom nedeljno merena telesna masa i rađen je ultrazvučni pregled srca u sedaciji. Kada su ultrazvučnim pregledom bile uočene promene koje ukazuju na nastanak srčane insuficijencije, kao i pogoršanje opšteg stanja životinje, vršila se završna registracija krvnog pritiska. Nakon završne registracije krvnog pritiska, odnosno merenja i snimanja kardiovaskularnih parametara, životinje su podvrgnute fizičkom metodom eutanazije, brzom dekapitacijom giljotinom. Eutanazija sedativima i anestheticima nije mogla da bude primenjena jer bi uticala na rezultate genske ekspresije i patohistološke analize. Krv životinja je sakupljena u epruvete radi određivanja markera za srčanu slabost. Leva komora srca i mozak su trenutno smrznuti na suvom ledu i čuvani na -80°C za molekularnu analizu. Ostali organi su uzeti i čuvani u formalinu radi dalje patohistološke analize (Slika 8).



Slika 8. Šematski prikaz eksperimentalnog algoritma.



### 3.4. Procena opšte toksičnosti

Opšta toksičnost dokosrubicina procenjena je na osnovu izgleda pacova (dlačnog pokrivača i prisustva porfirinskih prstenova oko očiju koji oslikavaju patnju), ponašanja (spontane aktivnosti, timarenja), promena u telesnoj masi, preživljavanjem i konstrukcijom Kaplan-Majerove krive, kao i određivanjem biohemijskih parametara u plazmi. Uzrok smrti i organska oštećenja utvrđena su autopsijom i patohistologijom.

Uzorci venske krvi su sakupljeni u epruvete bez EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) i ostavljeni 10 min na sobnoj temperaturi da se zgrušaju zbog kasnije ekstrakcije seruma. Nakon toga, epruvete su centrifugirane 10 min na 4000 obrtaja u minutu, na sobnoj temperaturi. Serum je zatim pipetom prebačen u nove ohlađene plastične ependorfice i čuvan na -80 °C. Biohemijski markeri koji su rađeni su: kreatinin (engl. *creatinine*-CRE), azot uree u krvi (engl. *blood urea nitrogen*-BUN), alanin aminotransferaza (engl. *alanine aminotransferase*-ALT), aspartat aminotransferaza (engl. *aspartate aminotransferase*-AST), kreatin kinaza (engl. *creatine kinase*-CK), laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*-LDH), glukoza (GLU), holesterol (HOL) i trigliceridi (TRI). Koncentracije navedenih biohemijskih markera iz seruma su merene pomoću spektrofotometrije u automatizovanom analizatoru A15 (*BioSistems S.A.*, Barselona, Španija).

### 3.5. Procena srčane funkcije i morfologije

Procena srčane funkcije i morfologije rađena je ehokardiografski. Uoči pregleda, 15 minuta, pacovi su sedirani acepromazinom 0,5 mg/kg i.m. Ehokardiografija je rađena jednom nedeljno ultrazvučnim aparatom *ALOKA ProSound2*, linearnom sondom podešenom na frekvencu od 13 MHz (*HitachiMedical Systems*, Ciri, Švajcarska). Ehokardiografski parametri su mereni u desnoj parasternalnoj kratkoj osi, M modu, presek na nivou papilarnih mišića. Funkcionalni parametri su izračunavani na osnovu vrednosti merenih parametara.

Mereni ehokardiografski parametri: prečnik međukomorskog septuma u sistoli (engl. *interventricular septum in systole*-IVSs), prečnik međukomorskog septuma u dijastoli (engl. *interventricular septum in diastole*-IVSd), prečnik leve komore u sistoli (engl. *left ventricular end-diastolic internal diameter in systole*-LVIDs), prečnik leve komore u dijastoli (engl. *left ventricular end-diastolic internal diameter in diastole*-LVIDd), debljina zadnjeg zida leve komore u sistoli (engl. *posterior wall thickness in systole*-PWs), debljina zadnjeg zida leve komore u dijastoli (engl. *posterior wall thickness in diastole*-PWd).

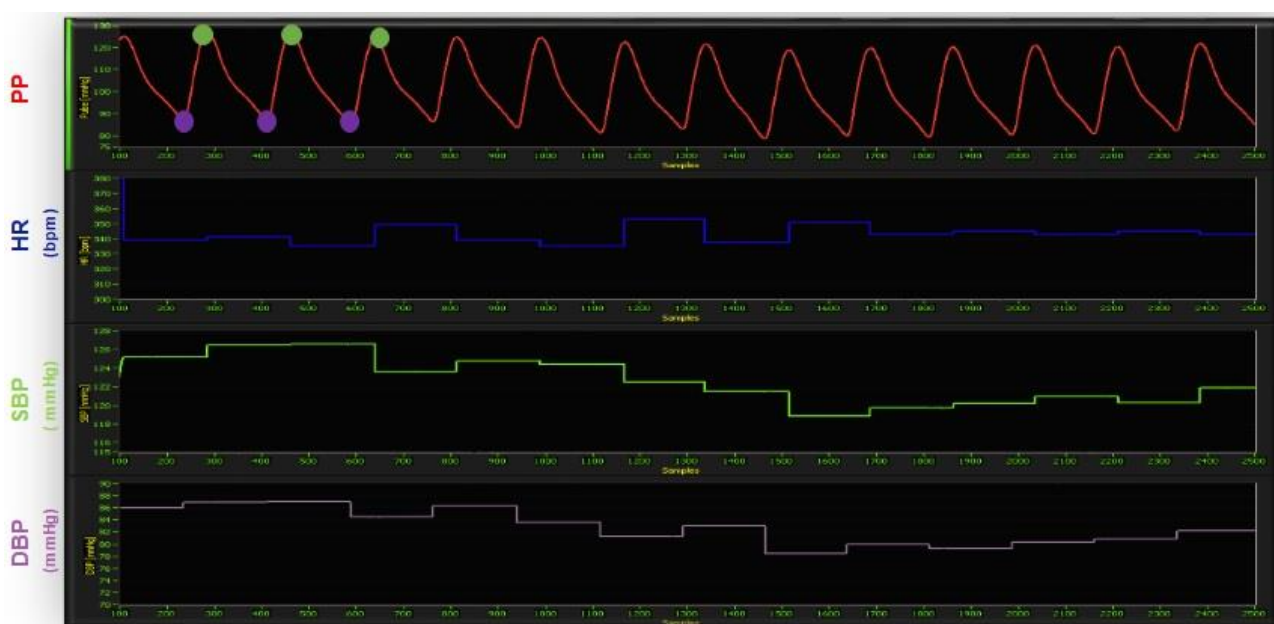
Funkcionalni parametri koji su računati prema formulama su: end-dijastolni volumen leve komore (engl. *left ventricular end-diastolic volume*),  $LVEDV(ml) = 1.047 \cdot (LVIDd)^3$ ; ejekciona frakcija leve komore (engl. *left ventricular ejection fraction*),  $LVEF(\%) = (SV/LVEDd) \cdot 100$  i frakcionalno skraćnje leve komore (engl. *left ventricular fractional shortening*-LVFS) (Brown i sar., 2002). Relativna debljina zida leve komore (engl. *relative wall thickness*-RWT) je računata prema formuli:  $RWT = (IVSd + PWd)/LVIDd$  (Foppa i sar., 2005). Ehokardiografska masa leve komore (engl. *left ventricular mass*-LVM) je izračunata korišćenjem formule:  $[LVM = 1.047 (IVSd + LVIDd + PWd)^3 - (LVIDd)^3]$ , (Devereux i sar., 1986). Indeks mase leve komore (engl. *left ventricular mass index*-LVMI) računa se kao količnik mase leve komore i telesne mase pacova.



### 3.6. Autonomni markeri: kratkotrajni varijabilitet krvnog pritiska i srčane frekvence

#### 3.6.1. Registrovanje kardiovaskularnih parametara

Arterijski pulsni pritisak je digitalizovan na 1000 Hz korišćenjem *Dataquest A.R.T. 4.0* softvera, (*DSI, Transoma Medica, USA*). Sistolni krvni pritisak (engl. *systolic blood pressure-SBP*), dijastolni krvni pritisak (engl. *diastolic blood pressure-DBP*), pulsni interval (engl. *pulse interval-PI*) i njegova inverzna vrednost, srčana frekvenca (*heart rate – HR*) su izvedeni iz arterijskog pulsnog pritiska kao maksimum, minimum i razmak između dva maksimuma (**Slika 9**). Izvedeni signali SBP, DBP i HR su podvrgnuti spektralnoj analizi za određivanje spektralnih markera (Japundzic i sar., 1990), a SBP i PI su korišćeni za procenu funkcije baroreceptorskog refleksa (engl. *baroreceptor reflex-BRR*) metodom sekvenci (Lončar-Turukalo i sar., 2015). Ove analize su rađene u *BP Complete software v. 8.0.0*, razvijenom u laboratoriji prof. dr Nine Žigon.



**Slika 9. Digitalizovan arterijski pulsni pritisak i njegove komponente.**

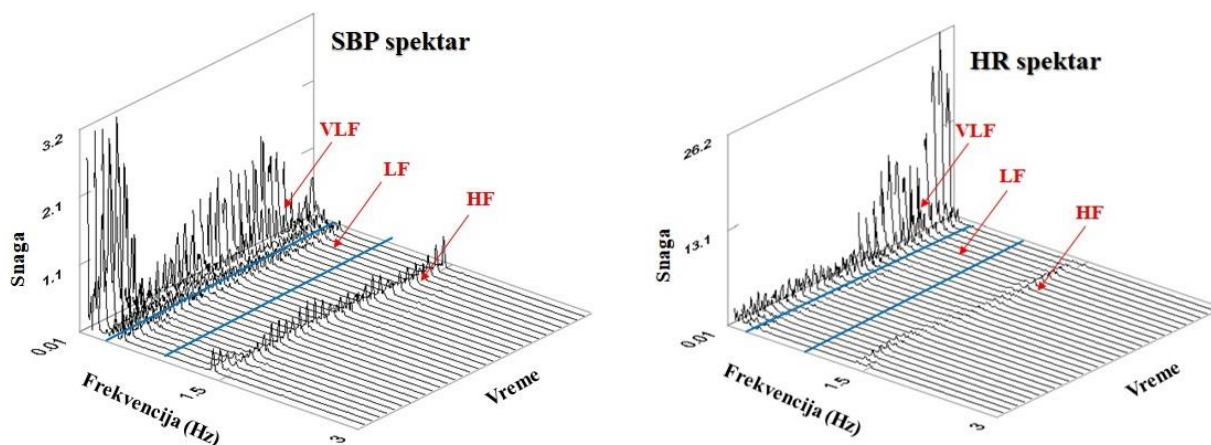
PP: pulsni pritisak; HR: srčana frekvenca; SBP: sistolni krvni pritisak; DBP: dijastolni krvni pritisak.

#### 3.6.2. Spektralna analiza SBP, DBP i HR

Kardiovaskularni varijabilitet SBP, DBP i HR je evaluiran primenom spektralne analize bazirane na brzom Furijeovoj transformaciji (Lozić i sar., 2014). Snaga spektra je određena nad celim spektrom (0-3Hz), u zonama veoma niske (eng. *Very Low-Frequency, VLF: 0-0,2 Hz*), niske (eng. *Low-Frequency, LF: 0,2-0,8 Hz*) i visoke frekvencije (eng. *High-Frequency, HF: 0,8-3,0 Hz*). Spektar kroz vreme (engl. *time Fast Fourier Transformation-tFFT*) dobijen je zbrajanjem 30 pojedinačnih preklapljenih spektara sa fiksnim pomerajem od 211 tačaka na signalu koji je obuhvatao 8192 tačke, odnosno 409.6 sekundi registracije (**Slika 10**).

VLF BP oscilacije su miogenog porekla, odnosno posledica renin-angiotenzin sistema (RAS), kao glavnog vazoaktivnog mehanizma. LF BP su neurogenog porekla, posledica dejstva simpatikusa na srce i krvne sudove. HF BP nastaju usled mehaničkih efekata tokom respiracije. VLF HR, LF HR i HF HR su sve neurogenog porekla. VLF HR nastaju kao efekat termoregulacije, LF HR nastaju kao

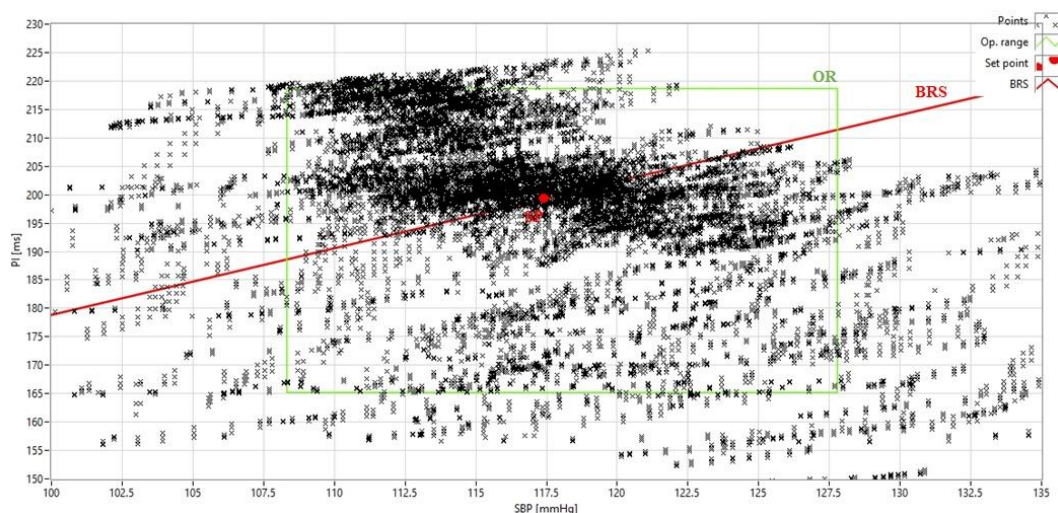
posledica uticaja simpatikusa na srce, a HF HR kao posledica uticaja nerva vagusa. U kliničkoj i eksperimentalnoj praksi, LF-SBP i LF/HF-HR indeks su prepoznati kao markeri simpatičkog uticaja na arterije i simpato-vagalnog uticaja na srce (Heart Rate Variability. Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use, 1996; Japundzic-Zigon, 1998).



**Slika 10. Grafički prikaz SBP (levi panel) i HR (desni panel) spektara kroz vreme.**  
VLF: zona veoma niskih frekvenci; LF: zona niskih frekvenci; HF: zona visokih frekvenci.

### 3.6.3. Metoda sekvenci za procenu rada baroreceptorskog refleksa

Za analizu BRR-a se koriste SBP i PI na signalu dužine 409,6 sekundi. PI se koristi umesto HR-a jer je odgovor između frekvencije vagalne stimulacije i intervalnih PI linearan. Refleksni odgovor BRR-a kasni 3-5 otkucaja za detektovanom promenom SBP-a (Oosting i sar., 1997). Glavni parametri koji su računati su senzitivnost baroreceptorskog refleksa (engl. *baroreceptor reflex sensitivity* -BRS, ms/mmHg) i indeks efektivnosti baroreceptorskog refleksa (engl. *baroreceptor effectiveness index*-BEI). BRS predstavlja srednji linearni regresioni koeficijent svih sekvenci ( $PI = BRS \times SBP + const.$ ). BEI je odnos broja SPB-PI sekvenci prema broju SBP rampi, najmanje 3 uzastopna porasta sistolnog krvnog pritiska (**Slika 11**).



**Slika 11. Grafički prikaz parametara BRR-a.**

PI: pulsni interval; SBP: sistolni krvni pritisak; BRS: senzitivnost BRR-a; SP: težište rada BRR-a; OR: opseg delovanja BRR-a.

### 3.7. Određivanje koncentracije markera srčane insuficijencije u krvi

Priznati marker srčane insuficijencije je NT-proBNP (engl. *N-Terminal pro-Brain natriuretic peptide*). Koncentracija NT-proBNP-a u plazmi je određivana pomoću ELISA testa (*Elabscience Biotechnology Inc.*, SAD), po uputstvu proizvođača. Koncentracija NT-proBNP-a je izražena u pg/ml, u nivou detekcije 3-2000 pg/ml, pomoću čitača mikrotitar ploča (*Multiskan EX*, *Thermo Electron Corporation*, Vanta, Finska).

### 3.8. Patohistološka analiza leve komore srca

#### 3.8.1. Uzorkovanje i priprema tkiva

Pacovi su žrtvovani kada smo ustanovili znake lošeg opšteg stanja i promene ehokardiografskih srčanih parametara koji ukazuju na pojavu srčane insuficijencije, fizičkom metodom eutanazije, dekapitacijom, koristeći giljotinu (*Harvard Apparatus*, SAD). Nakon ekscizije makazama vrh leve komore je trenutno zamrznut suvim ledom i odložen za molekularnu analizu. Ostatak srčanog tkiva, bubrezi i jetra su fiksirani 48 sati u 4% formaldehidu, a potom ukalupljeni u parafin. Isečci debljine 3 µm (*Leica Microsystems*, Nemačka) su postavljeni na pločice i obojeni metodom hematoksilin-eozin i Mason-trihrom za vizualizaciju vezivnog tkiva.

#### 3.8.2. Imunohistohemijska bojenja

Rađena su imunohistohemijska bojenja za detekciju apoptoze i leukocita (engl. *leukocyte common antigen*, LCA), na već pripremljenim parafinskim isečcima srčanog tkiva. Imunohistohemijsko bojenje za detekciju apoptoze je rađeno kaspazom 3, prema uputstvima proizvođača. Napravljeni su tkivni isečci od 5 µm, koji su deparafinizovani i rehidrirani opadajućim koncentracijama alkohola do destilovane vode, da bi se blokirala aktivnost endogene peroksidaze. Nakon toga, isečci tkiva su inkubirani sa specifičnim mišjim monoklonskim primarnim antitelom, *anti-Caspase 3* (klon CPP32, 1:50 razblaženje, *Leica Biosystems*, Njukastl, Engleska). Streptavidin-biotin metod, DAKO LSAB+ komplet (*DAKO*, Danska) sa diaminobenzidinom (DAB) je primenjen za bojenje a rastvor hromogena i Majerov hematoksilin su korišćeni za kontrabojenje. Citoplazmatsko bojenje kardiomiocita do apoptoze je bilo procenjeno u odnosu na limfocite koji su služili kao pozitivna kontrola, i inkubiranih razblaženih antitela, bez primarnog antitela, koji su služili kao negativna kontrola. LCA CD45 glikoprotein imunobojenje je standardizovano korišćenjem odgovarajuće pozitivne kontrole za svako antitelo, prema uputstvima proizvođača. Negativna kontrola je izvršena izostavljanjem primarnog antitela, prateći standardnu proceduru bojenja. Za LCA imunohistohemiju korišćen je DAKO, klon 2B11 + PD7/26, 1:200 (*Lab Vision™ IHC Autostainer 360*). Mikrofotografije su snimljene pomoću svetlosnog mikroskopa (*Olympus BX450*, Tokio, Japan) i kamere *Olympus DP70* (*Camera System*, Tokio, Japan) pri uvećanju od 40 puta.

#### 3.8.3. Histomorfometrija

Pojedinačne mikrofotografije svakog histološkog preparata snimljene su na uvećanju od 4 puta, uz pomoć digitalne kamere u boji (*Leica DFC295*, *Leica Microsystems*, Nemačka). Zatim su spojene u jednu sliku i analizirane histomorfometrijske karakteristike srčanog tkiva u *Leica University Suite* softveru (*Leica Microsystems*, Nemačka).

### 3.9. Analiza transkriptoma leve komore srca

#### 3.9.1. Ekstrakcija RNK

Vrh srca je homogenizovan u 500  $\mu$ l Trizola (*Invitrogen*, Karlsbad, SAD), vorteksovan i inkubiran na sobnoj temperaturi 5 minuta. Ekstrakcija RNK se vršila dodavanjem 100  $\mu$ L hloroforma (*Sigma-Aldrich Co. Ltd.*, Karlsbad, SAD) uz vorteksovanje. Uzorci su ostavljeni 2-3 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani na 12000 obrtaja u minutu, 15 minuta, na temperaturi od 4 stepena. Supernatant je zatim pipetom premešten u nove ependorfice i u svaki uzorak je dodato 250  $\mu$ l propanola, kako bi se stvorio talog RNK. Uzorci su zatim vorteksovani, inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi, pa centrifugirani na 12000 obrtaja u minutu, 15 minuta, na temperaturi od 4 stepena. Supernatant je pipetom uklonjen iz ependorfica sa RNK talogom, a u njih je dodato 500  $\mu$ l 70% etanola. Nakon toga uzorci su stavljeni u centrifugu na 7500 obrtaja u minutu, 5 minuta na 4 stepena. Usledilo je ponovno uklanjanje ostatka supernatanta, sušenje uzoraka u laminaru, a zatim dodavanjem 0,01 ml DEPC vode i inkubiranje uzoraka na 55 stepeni, 10 minuta. Uzorci su zatim čuvani na -80 stepeni. Koncentracija dobijene RNK je procenjena pomoću *BIOSpec-nano* spektrofotometra (*Shimadzu*, Kjoto, Japan).

#### 3.9.2. Sinteza cDNK

Sinteza cDNK je obavljena korišćenjem *QuantiTect Reverse Transcription Kit-a* (*Qiagen Ltd.*, Mančester, VB) prema uputstvu proizvođača sa ulaznom koncentracijom RNK od 100 ng. U svaki uzorak RNK je dodat 2  $\mu$ l *gDNA Wipeout Buffer-a* i 12  $\mu$ l *RNA-free* vode, za eliminaciju genomske DNK. Uzorci su stavljeni na inkubaciju 2 minuta, na 42 stepena, a nakon toga ovoj smeši su dodati 1  $\mu$ l smeše prajmera za reverznu transkriptazu (*RT Primer Mix*), 1  $\mu$ l smeša za reakciju reverzne transkripcije (*Quantiscript Reverse Transcriptase*) i 4  $\mu$ l pufera za reverznu transkripciju (*Quantiscript RT Buffer*). Uzorci su zatim prvo inkubirani 30 minuta na 42 stepena, pa 3 minuta na 95 stepeni. Ependorfice sa uzorcima su čuvane na -20 stepeni.

#### 3.9.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (RT-qPCR)

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu je obavljena korišćenjem *Applied Biosystems ViiA7 Real Time PCR* sistema (*Applied Biosystems*, Foster Siti, SAD). Kao fluoroscentna boja koja se nespecifično vezuje za dvolančanu DNK korišćen je SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, Varington, VB). cDNK uzorci su u triplikatu nalivani u bunariće u koncentraciji od 1  $\mu$ l, u koje su zatim dodati 6  $\mu$ l SYBR Green PCR Master Mix, po 0,5  $\mu$ l uzvodnog (engl. *forward*) i nizvodnog (engl. *reverse*) prajmera i 4  $\mu$ l *RNA free* vode. Ploče sa bunarićima su prekrivene zaštitnom folijom, zatim centrifugirane 30 sekundi na 2500 obrtaja u minutu. Temperaturni protokol reakcije lančanog umnožavanja DNK se sastojao od denaturacije cDNK (50 stepeni-2 minuta, 95 stepeni-10 minuta), 40 ciklusa umnožavanja cDNK (95 stepeni- 15 sekundi, 60 stepeni- jedan minut) i završetka reakcije (95 stepeni- 15 sekundi, 60 stepeni- jedan minut, 95 stepeni-15 sekundi). Analiza rezultata urađena je pomoću *ViiA 7 v1.2* softvera (*Applied Biosystems*, Foster Siti, SAD). Relativne promene genske ekspresije računata su metodom  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak i Schmittgen, 2001).

Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-GAPDH*) je korišćen kao konstitutivno eksprimirani gen, odnosno referentni gen za normalizaciju ekspresije gena od interesa. Svi prajmeri (**Tabela 2**) su dizajnirani korišćenjem *GenBank* baze gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

**Tabela 2. Lista prajmera korišćenih u istraživanju.**

<b>Gen</b>	<b>Prajmeri</b>	<b>NCBI Reference</b>
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Fwd: 5'-GCAATGGTTCGGGACATAGTT-3' Rev: 5'-AGACCTGACTTGGCAGAGGA-3'	NM_031512.2
<b>IL6</b>	Fwd: 5'-TCTCTCCGCAAGAGACTTCCA-3' Rev: 5'-ATACTGGTCTGTTGTGGGTGG-3'	NM_012589.2
<b>FN1</b>	Fwd: 5'-CGGTGGCATGGAGAGCCAGC-3' Rev: 5'-TCACCCGCACTCGGTAGCCA-3'	XM_006245158.4
<b>COL1A1</b>	Fwd: 5'-TGGACCTCCGGCTCCTGCTC-3' Rev: 5'-TCGCACACAGCCGTGCCATT-3'	NM_053304.1
<b>ADRB1</b>	Fwd: 5'-AGACGTGCTATGTGTGACGG-3' Rev: 5'-AGCACTTGGGGTCGTTGTAG-3'	NM_012701.1
<b>ADRB2</b>	Fwd: 5'-TGGATTGTGTCCGGCCTTA-3' Rev: 5'-TGGCACGGTACCAGTGCAT-3'	NM_012492.2
<b>AGTR1A</b>	Fwd: 5'-GCCAGGGCAGCCTCTGA-3' Rev: 5'-TCCTGAGGCAGGGTGAATG-3'	NM_030985.4
<b>NR3C2</b>	Fwd: 5'-ACGACGTTCCCTTTCCTAAGACA-3' Rev: 5'-TGAGCGGGCCAGTCACA-3'	NM_001395077.1
<b>CTGF</b>	Fwd: 5'-GCGAGCCAAGTGCCTGGTCC-3' Rev: 5'-GCGTCCGGATGCACTTTTTGCC-3'	NM_022266.2
<b>NPPB</b>	Fwd: 5'-GACGGGCTGAGGTTGTTTA-3' Rev: 5'-ACTGTGGCAAGTTTGTGCTG-3'	XM_006239376.1
<b>MYH6</b>	Fwd: 5'-GGGGCAAGGTCCTGCCGAA-3' Rev: 5'-GGCCGCATAGCGCTCCTTGA-3'	XM_017599641.2
<b>MYH7</b>	Fwd: 5'-AGGAGGCGGAGGAACAGGCCAAC-3' Rev: 5'-GGGCTTCACAGGCATCCTTAGGGTT-3'	NM_017240.2
<b>TNNT2</b>	Fwd: 5'-GGAGGCAGTGGAGGAGGAGGAT-3' Rev: 5'-GCTGGGCTTGGGTTTGGAGTC-3'	XM_006249842.4
<b>TNNI3</b>	Fwd: 5'-TATGACCTGCGTGGCAAGTT-3' Rev: 5'-GCCCTCAGGTCCAAGGATTC-3'	NM_017144.2
<b>TTN</b>	Fwd: 5'-GGAGAATTGAGCCCTTGGAAAGT-3' Rev: 5'-CCTTGGATCTCACAGGTGAATTT-3'	XM_039106434.1
<b>ACTC1</b>	Fwd: 5'-CCGCTGTCCTGAGACTCTCTTC-3' Rev: 5'-CGTGAATGCCGGCAGACT-3'	NM_019183.1
<b>MYBPC3</b>	Fwd: 5'-GCCGACAAGAAGACCATGGA-3' Rev: 5'-TGATAAGCTCTGATACCACACAGTGA-3'	XM_006234503.4
<b>RYR2</b>	Fwd: 5'-CTCAAACCACGAACACATCG-3' Rev: 5'-TCCACATCAAAGTCCTCCAA-3'	NM_001191043.3
<b>ATP2A2</b>	Fwd: 5'-CCTACACTGGCCGTGAGTTT-3' Rev: 5'-AGAGCAGGGGCATCATTGAC-3'	XM_039110887.1
<b>VACM1</b>	Fwd: 5'-GCTGATCGAGCACAAGTACATCA-3' Rev: 5'-TCAGCTACGCCATGTATATGAAGG-3'	NM_022683.1
<b>APLN</b>	Fwd: 5'-GCCACAGATTGCACGTGTA-3' Rev: 5'-CTTTTTGTGAGCTTGTGGCAA-3'	NM_031612.3
<b>APLNR</b>	Fwd: 5'-TTCATCATCATGCTGACCTGTTACT-3' Rev: 5'-TCGATGCGCTCCTTTCG-3'	NM_031349.2
<b>GAPDH</b>	Fwd: 5'-CAGGGCTGCCTTCTCTTGTG-3' Rev: 5'-GATCTCGCTCCTGGAAGATGG-3'	NM_017008.4

IL1 $\beta$ : interleukin 1 beta; IL6: interleukin 6; FN1: fibronektin 1; COL1A1: kolagen tip 1 alfa 1; ADRB1: beta-adrenergički receptor tip 1; ADRB2: beta-adrenergički receptor tip 2; AGTR1A: angiotenzinski II receptor tip 1a; NR3C2: nuklearni receptor podfamilije 3 grupe C tip 2 (kodira protein za mineralokortikoidni receptor); CTGF: faktor rasta vezivnog tkiva; NPPB: natriuretski peptid tipa B; MYH6: teški lanac miozina tip 6; MYH7: teški lanac miozina tip 7; TNNT2: troponin T tip 2; TNNT3: troponin I tip 3; TTN: titin; ACTC1: alfa aktin srčanog mišića 1; MYBPC3: srčani miozin-vezujući protein C; RYR2: rijanodinski receptor tip 2; ATP2A2: ATPaza sarkoplazmatičnog retikuluma koja pumpa Ca; VACM1: protein za mobilizaciju kalcijuma aktiviran vazopresinom; APLN: apelin; APLNR: apelinski receptor; GAPDH: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; Fwd (forward): uzvodni prajmer; Rev (reverse): nizvodni prajmer.

### 3.10. Određivanje fenotipa i genotipa doksorubicinske kardiomiopatije metodom mašinskog učenja

Osobine (parametri) jedinki su uneti u jedinstven matriks u kome boja oslikava njihovu snagu i formira toplotnu mapu (engl. *heat map*). Za određivanje fenomapa korišćeni su hemodinamski, ehokardiografski i biohemijski parametri i autonomni markeri. Za računanje genomapa prikazana je promena ekspresije gena na koje utiče doskorubicin.

Parametri kod kojih je Pirsonovim parnim testom utvrđena korelacija  $\leq 6$  su izostavljeni kako bi se izbeglo ponavljanje. Mapa svakog subjekta, odnosno životinje, je predstavljena jednom tačkom u multidimenzionalnom prostoru parametara. Povezanost između parametara omogućava grupisanje subjekata na osnovu najviše izraženih karakteristika.

Za grupisanje parametara se koriste 4 metode: hijerarhijsko algoritamsko klasterovanje (Jain i Dubes, 1988), K-mean ++ klasterovanje (Onoda i sar., 2012), afinitetna propagacija (Frey i Dueck, 2007) i Gausov mešani model (Hand i sar., 1989). Potom se metodom gomilanja dokaza (engl. *evidence accumulation clustering*) formira matriks koegzistencije u boji, sa z-normalizovanom kolonom koja omogućava upoređivanje (Fred i Jain, 2005). Matriks koegzistencije je vizualizovan pomoću klastera u toplotnim mapama, pokazujući mogućnost za svaki par životinja da se nađe u istom klasteru. Nakon toga, parametri su iz multidimenzionalnog prostora redukovani na dve dimenzije T-SNE metodom (Maaten i sar., 2012) i prikazani grafički tako da se fenotipski slični pacovi rasporede u blizini a fenotipski različiti pacovi prikažu odvojeno.



### 3.11. Korišćene supstance

Ketamin hidrohlorid (*Ketamidor10%*®), rastvor za injekcije 100 mg/mL), ksilazin hidrohlorid (*Xylased*®), rastvor za injekciju 20 mg/mL), karprofen (*Rimadyl*®), rastvor za injekcije 50 mg/mL) i acepromazin maleat (*Neurotrank*®), rastvor za injekcije 10 mg/mL) nabavljeni su od Marlo Farme (Beograd, RS). Gentamicin (*Gentamicin*®), rastvor za injekcije 120 mg/ 2 mL) i doksorubicin (*Adriblastina*®), prašak za injekcije, 50 mg) naručeni su od Hemofarma AD (Vršac, RS) i Pfizer-a (Beograd, RS).

### 3.12. Statistička analiza

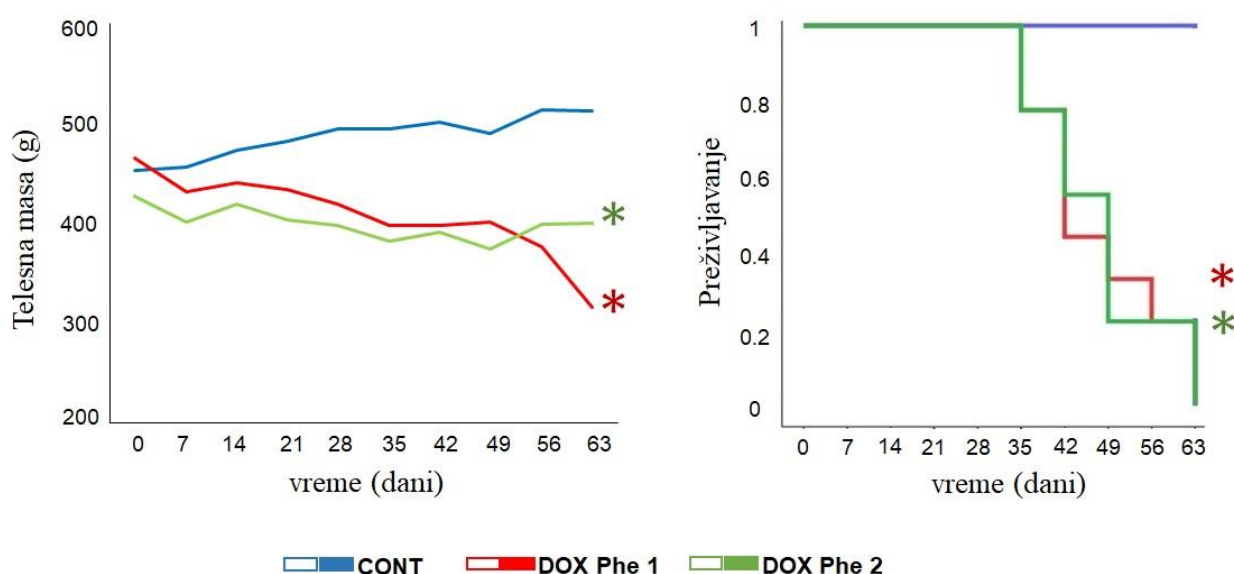
Svi parametri su prikazani u slikama i tabelama kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška srednje vrednosti (SE). Priroda raspodele svakog analiziranog parametra je bila određena testom za proveru normalnosti raspodele (Shapiro-Wilk). Za analizu statističke značajnosti ehokardiografskih i autonomnih parametara su primenjeni parametarski testovi, Studentov t-test i *OneWay ANOVA* test, i neparametarski testovi, *Mann-Whitney* test, *Wilcoxon* test i *Kruskall-Wallis* test, u zavisnosti od prirode raspodele varijabli, kao i u zavisnosti da li su ispitivane međugrupne razlike ili razlike unutar jedne grupe. Za analizu ekspresije gena i biohemijskih parametara su korišćeni *OneWay ANOVA* i *Kruskall-Wallis* test, u zavisnosti od prirode raspodele varijabli. Statistička značajnost razlike je bila prihvaćena za vrednost  $p < 0,05$ . Za statističku analizu su korišćeni softveri *GraphPad Prism* (San Diego, SAD) i *SPSS Statistics 2.0* (IBM, Njujork, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Opšta toksičnost i preživljavanje

Pacovi u eksperimentalnoj grupi, tretirani doksorubicinom, pokazivali su znake intoksikacije: propadanje krzna, smanjenu fizičku aktivnost, dijareju, smanjeni unos hrane i vode i progresivno smanjenje telesne mase (**Figura 1, levi panel**), počev od treće nedelje. Takođe je primećeno smanjeno preživljavanje pacova u eksperimentalnoj grupi (**Figura 1, desni panel**). Pacovi iz kontrolne grupe, tretirani fiziološkim rastvorom, bili su odličnog fizičkog izgleda, aktivni, telesna masa im se progresivno povećavala (**Figura 1, levi panel**) i svi su preživeli do kraja protokola (**Figura 1, desni panel**).

Između dve eksperimentalne grupe, DOX Phe 1 i DOX Phe 2, nije bilo statistički značajne razlike ni u vrednostima telesne mase ni u dužini preživljavanja.



**Figura 1. Kriva promene telesne mase kod pacova tretiranih doksorubicinom i Kaplan-Majerova kriva preživljavanja.** Uočava se statistički značajno smanjenje telesne mase pacova (levi panel) i statistički značajno smanjene dužine preživljavanja (desni panel) u grupama DOX Phe 1 i DOX Phe 2 u odnosu na CONT grupu.

\*p < 0.05 vs. CONT, ANOVA ponovljenih merenja. CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2.



Analiza nivoa biohemijskih markera opšte toksičnosti iz seruma, metodom spektrofotometrije, je pokazala statistički značajni porast BUN, markera oštećenja funkcije bubrega, porast CK, nespecifičnog markera oštećenja srčanog mišića i porast koncentracije LDH i HOL u obe eksperimentalne grupe tretirane doksorubicinom u odnosu na kontrolnu grupu. Nije bilo statistički značajne razlike u nivoima vrednosti ALT i AST, biohemijskih markera za oštećenje jetre, između eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe. Takođe nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji biohemijskih markera između dve eksperimentalne grupe (**Tabela 3**).

Na autopsiji je utvrđeno da su životinje preminule najverovatnije usled srčane slabosti. Primećeno je oštećenje bubrega, dilatacija tubula i depoziti amiloida, kao i masna infiltracija i inflamacija jetre sa nagomilanim Kupferovim ćelijama (nije prikazano), ali one nisu bile kritične za preživljavanje.

**Tabela 3. Biohemijski markeri u krvi kod pacova tretiranih doksorubicinom.**

parametar	CONT (n=6)	DOX Phe 1 (n=9)	DOX Phe 2 (n=9)
<b>BUN (mmol/L)</b>	6,0 ± 0,3	11,5 ± 1,8 *	13,0 ± 2,1 *
<b>KRE (µmol/L)</b>	70,0 ± 3,3	91,0 ± 9,8	66,0 ± 9,4
<b>ALT (U/L)</b>	64,0 ± 6,0	64,0 ± 15,4	105,0 ± 25,4
<b>AST (U/L)</b>	165,0 ± 35,7	79,0 ± 18,8	108,0 ± 19,4
<b>CK (U/L)</b>	385,0 ± 46,6	750,0 ± 243,3 **	663,0 ± 126,1 *
<b>LDH (U/L)</b>	1475,0 ± 45,9	1919,0 ± 311,3 *	1931,0 ± 179,3 **
<b>GLU (mmol/l)</b>	6,0 ± 0,5	6,1 ± 0,5	6,0 ± 0,6
<b>HOL (mmol/l)</b>	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,4 *	2,0 ± 0,2 *
<b>TRI (mmol/l)</b>	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,1

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje šest pacova ± SEM.

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1;

DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2; BUN: azot uree u krvi;

KRE: kreatinin; ALT: alanin aminotransferaza; AST: aspartat aminotransferaza; CK: kreatin kinaza;

LDH: laktat dehidrogenaza; GLU: glukoza; HOL: holesterol; TRI: trigliceridi.

\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. CONT

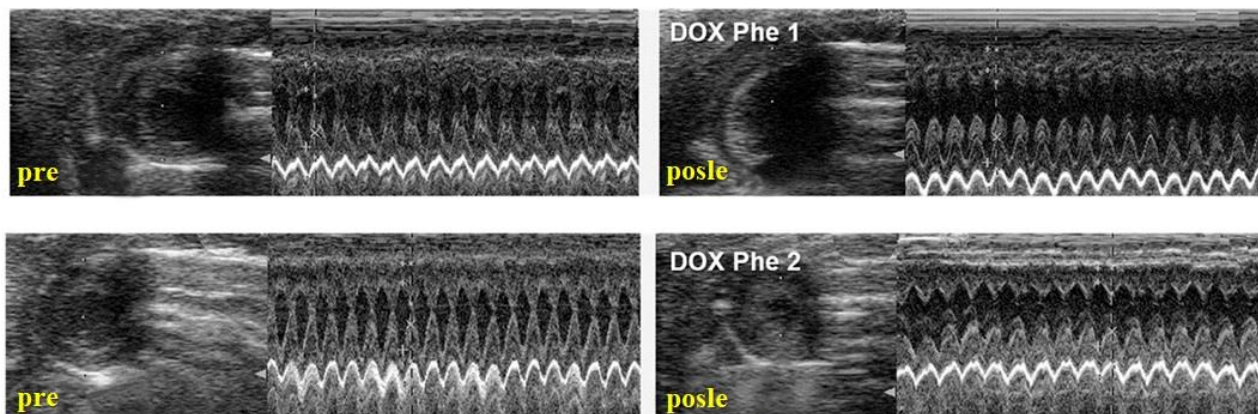
## 4.2. Funkcija i morfologija srca

Ehokardiografski pregledi su ukazali na razvijanje dva različita fenotipa kod pacova u eksperimentalnoj grupi, na osnovu parametara srčane funkcije i morfologije. Kod pacova sa fenotipom 1 uočavamo statistički značajno smanjenje PWT u sistoli i dijastoli odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i kontrolnu grupu, statistički značajno smanjenje IVS u sistoli u odnosu na kontrolnu grupu, te statistički značajno smanjene RWT, LVEF i LVFS u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu. Sa druge strane uočavamo statistički značajno povećanje LVID u sistoli i dijastoli i statistički značajno povećanje LVEDV (**Slika 12, Tabela 4**) u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu. Ove promene ehokardiografskih parametara odgovaraju promenama koje se sreću kod srčane insuficijencije sa redukovanom ejekcionom frakcijom.

Životinje iz eksperimentalne grupe sa razvijenim fenotipom 2 su imale statistički značajno povećanje PWT u sistoli i dijastoli u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i kontrolnu grupu, statistički značajno smanjenje LVID u dijastoli u odnosu na kontrolnu grupu i očuvane vrednosti LVEF, RWT i LVFS u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i kontrolnu grupu (**Slika 12, Tabela 4**). Ehokardiografske promene u ovoj eksperimentalnoj fenotipskoj grupi 2 odgovaraju promenama koje se sreću kod srčane insuficijencije sa očuvanom ejekcionom frakcijom.

Primećene su statistički značajno veće vrednosti parametara LVS i PWT u sistoli, LVEF, RWT i LVFS i statistički značajno manja vrednost parametra LVID u sistoli kod jedinki u grupi DOX Phe 2 u odnosu na jedinke iz grupe DOX Phe 1 (**Tabela 4**).

Pacovi iz kontrolne grupe su pokazivali fiziološki normalne vrednosti ehokardiografskih parametara (**Tabela 4**).



**Slika 12. Ehokardiogram u M-modu pacova tretiranih doksorubicinom.**

Gornji levi panel: fiziološki normalan ehokardiografski nalaz pacova pre aplikacije doksorubicina. Gornji desni panel: ehokardiografski nalaz pacova koji je posle aplikacije doksorubicina razvio fenotip 1 (DOX PHE 1). Uočavaju se stanjenje zidova i povećanje lumena komore. Donji levi panel: fiziološki normalan ehokardiografski nalaz pacova pre aplikacije doksorubicina. Donji desni panel: ehokardiografski nalaz pacova koji je posle aplikacije doksorubicina razvio fenotip 2 (DOX Phe 2). Uočavaju se zadebljanje zidova i smanjenje lumena komore.

**Tabela 4. Ehokardiografski parametri kod pacova tretiranih doksorubicinom.**

parametar	CONT (n=6)		DOX Phe 1 (n=9)		DOX Phe 2 (n=9)	
	pre	posle	pre	posle	pre	posle
IVSs (mm)	3,3±0,01	3,5±0,01	3,2±0,01	2,9±0,01†	3,3±0,01	3,5±0,01#
PWTs (mm)	3,6±0,01	3,6±0,01	3,8±0,01	3,0±0,01***†	3,5±0,01	3,9±0,02†#
LVIDs (mm)	2,6±0,01	2,6±0,02	2,5±0,01	3,9±0,02***†	2,8±0,03	2,7±0,03#
IVSd (mm)	1,9±0,01	2,0±0,01	1,9±0,01	1,8±0,01	2,0±0,01	2,3±0,01
PWTd (mm)	3,1±0,01	2,9±0,01	3,0±0,01	2,5±0,01*†	2,9±0,01	3,3±0,01*†
LVIDd (mm)	6,1±0,01	6,1±0,01	6,2±0,01	6,7±0,03*	6,2±0,02	5,6±0,02†
LVEF (%)	90±0,6	92±1,2	91±1,2	78±1,2***†	88±2,3	87±2,1#
LVEDV (ml)	0,5±0,01	0,5±0,02	0,54±0,02	0,71±0,1*†	0,58±0,1	0,56±0,02
RWT	0,82±0,01	0,83±0,01	0,79±0,01	0,65±0,01***†	0,82±0,01	0,82±0,03#
LVFS (%)	56,56±1,04	58,48±1,92	59,55±1,95	43,36±1,92***†	54,48±3,27	58,56±2,61#
LVMI (g)	1,2±0,05	1,2±0,04	1,2±0,07	1,1±0,09	1,2±0,06	1,4±0,02

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje šest pacova ± SEM.

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1;

DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2;

IVSs: prečnik međukomorskog septuma u sistoli, PWTs: debljina zadnjeg zida leve komore u sistoli;

LVIDs: prečnik leve komore u sistoli; IVSd: prečnik međukomorskog septuma u dijastoli; PWTd:

debljina zadnjeg zida leve komore u dijastoli; LVIDd: prečnik leve komore u dijastoli; LVEF:

ejekciona frakcija leve komore; LVEDV: end-dijastolni volumen leve komore; RWT: relativna

debljina zida leve komore; LVFS: frakcionalno skraćenje leve komore; LVMI: masa leve komore

(indeks).

\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. početne vrednosti; †p<0,05; ††p<0,01 vs. CONT; #p<0,05; ##p<0,01 vs.

DOX Phe 2

### 4.3. Kardiovaskularni varijabilitet i barorefleks

#### 4.3.1. Hemodinamski parametri i spontani baroreceptorski refleksi

Hemodinamski parametri su dobijeni registrovanjem kardiovaskularnih parametara a spontani baroreceptorski refleksi analizirani metodom sekvenci. U obe eksperimentalne grupe tretirane doksorubicinom nije bilo statistički značajne promene vrednosti sistolnog (SBP) i dijastolnog (DBP) krvnog pritiska. Uočavamo statistički značajan pad srčane frekvence (HR) kod pacova u DOX Phe 1 grupi u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina. Spontana senzitivnost baroreceptorskog refleksa (BRS) je statistički značajno porasla u obe eksperimentalne grupe tretirane doksorubicinom u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu. Sa druge strane indeks efektivnosti baroreceptorskog refleksa (BEI) je statistički značajno smanjen samo kod pacova u grupi DOX Phe 1, i to u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu. Nije bilo statistički značajne razlike kod ovih parametara između dve eksperimentalne grupe posle tretmana, osim BEI, gde primećujemo statistički značajno veću vrednost u grupi DOX Phe 2 (Tabela 5).

**Tabela 5. Krvni pritisak, srčana frekvencija, senzitivnost baroreceptorskog refleksa i indeks efektivnosti baroreceptorskog refleksa kod pacova tretiranih doksorubicinom.**

parametar	CONT (n=6)		DOX Phe 1 (n=9)		DOX Phe 2 (n=9)	
	pre	posle	pre	posle	pre	posle
<b>SBP</b> (mmHg)	109±1,9	110±2,2	106±2,5	102±2,0	106±2,1	105±2,8
<b>DBP</b> (mmHg)	79±0,8	77±2,5	74±2,0	74±3,0	77±1,6	74±3,0
<b>HR</b> (bpm)	290±6,2	269±7,5	290 ± 5,0	246±9,5*	290±5,0	272±16,5
<b>BRS</b> (ms/mmHg)	1,0±0,1	1,3±0,1	1,18±0,1	3,8±0,6**††	1,25±0,3	3,7±0,6*†
<b>BEI</b>	0,61±0,04	0,63±0,05	0,61±0,03	0,40±0,04**†	0,59±0,04	0,57±0,03#

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje šest pacova ± SEM.

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1;

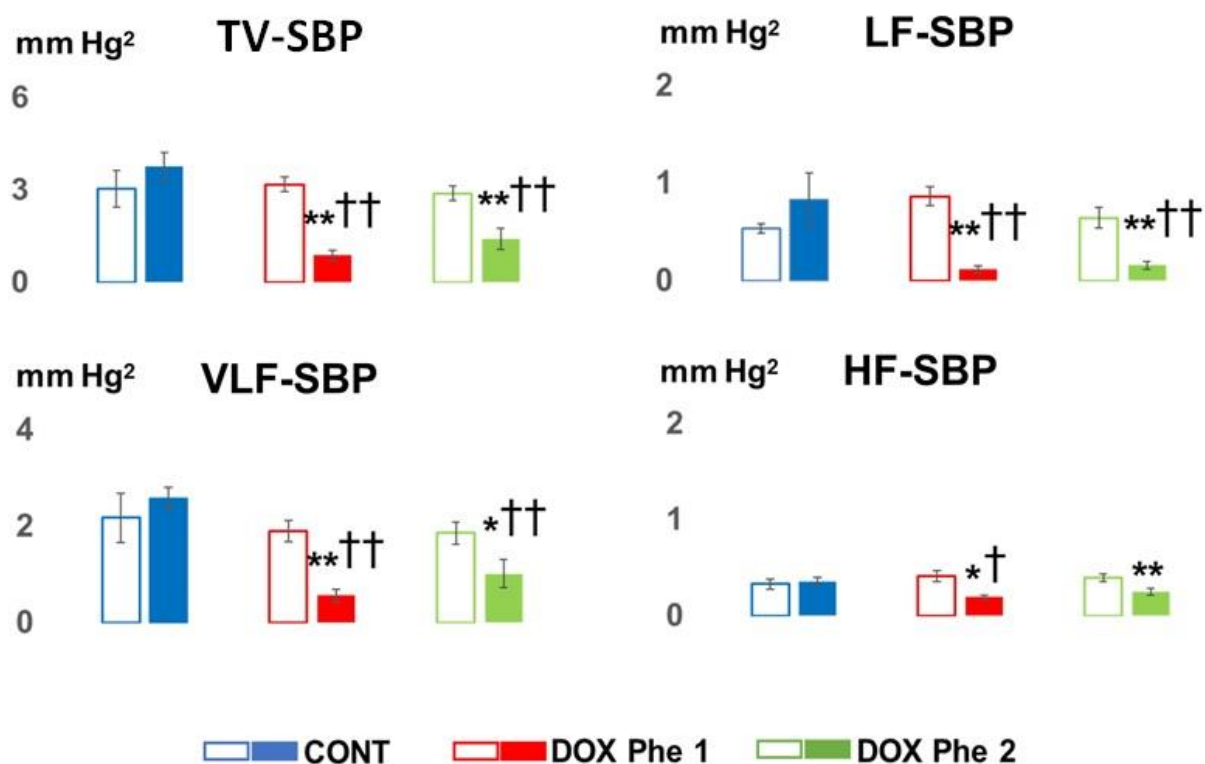
DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2;

SBP: sistolni krvni pritisak; DBP: dijastolni krvni pritisak; HR: srčana frekvencija; BRS: senzitivnost baroreceptorskog refleksa; BEI: indeks efektivnosti baroreceptorskog refleksa.

\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. početne vrednosti; †p<0,05; ††p<0,01 vs. CONT; #p<0,05; ##p<0,01 vs. DOX Phe 2

#### 4.3.2. Kratkotrajni varijabilitet sistolnog krvog pritiska

Spektralnom analizom kratkotrajnog varijabiliteta sistolnog krvnog pritiska uočavamo statistički značajno smanjenje vrednosti parametara SBP spektra, TV-SBP, VLF-SBP i LF-SBP, kod životinja u obe eksperimentalne grupe tretirane doksorubicinom u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu, osim kod parametra HF-SBP, kod životinja u DOX Phe 2 grupi, gde je došlo do statistički značajnog pada samo u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina. Nije bilo statistički značajne razlike vrednosti SBP spektra između dve eksperimentalne grupe posle tretmana. Kod pacova u kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajnih promena vrednosti parametara kratkog varijabiliteta SBP spektra (**Figura 2**).

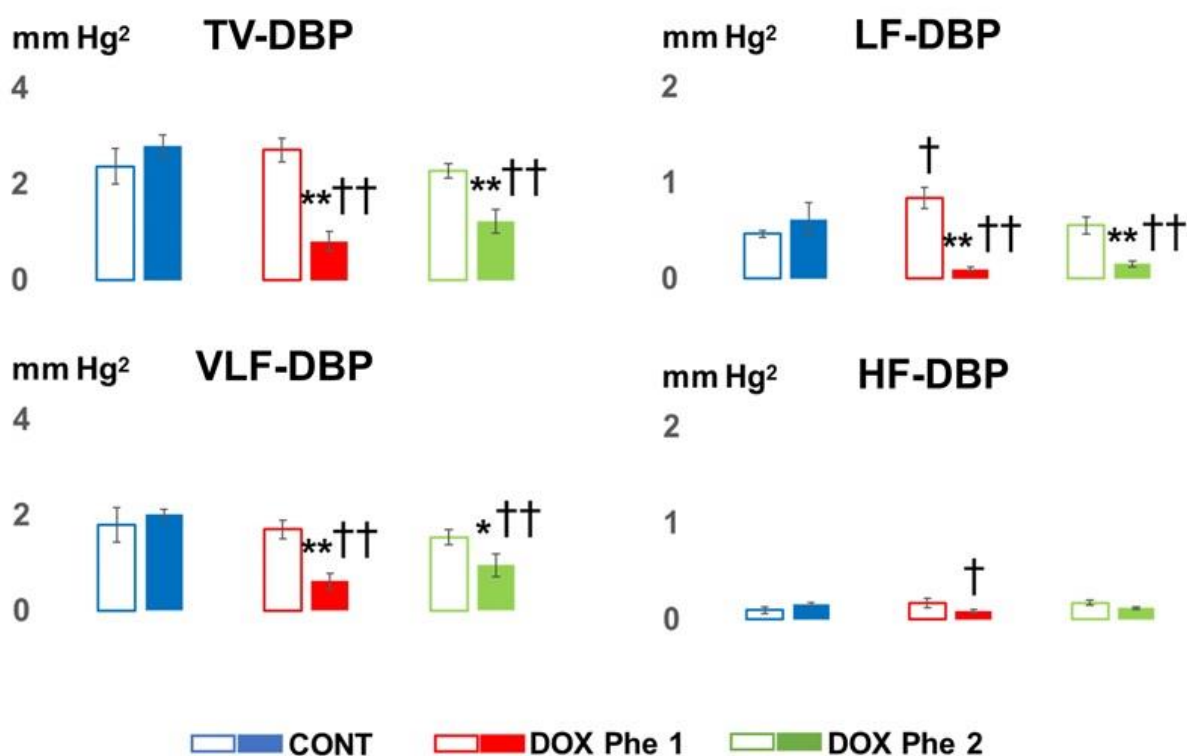


**Figura 2. Parametri SBP kratkotrajnog varijabiliteta kod pacova tretiranih doksorubicinom.** CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2; prazni stubići: vrednosti pre tretmana; puni stubići: vrednosti posle tretmana; TV-SBP: totalni SBP spektar; VLF-SBP: zona veoma niskih frekvenci SBP spektra; LF-SBP: zona niskih frekvenci SBP spektra; HF-SBP: zona visokih frekvenci SBP spektra.

\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. početne vrednosti; †p<0,05; ††p<0,01 vs. CONT

### 4.3.3. Kratkotrajni varijabilitet dijastolnog krvnog pritiska

Spektralnom analizom kratkotrajnog varijabiliteta dijastolnog krvnog pritiska uočavamo statistički značajno smanjenje vrednosti parametara DBP spektra, TV-DBP, VLF-DBP i LF-DBP, kod životinja u obe eksperimentalne grupe tretirane doksorubicinom u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu. Izuzetak je parametar HF-DBP, u DOX Phe 1 grupi, gde je došlo do statistički značajnog pada samo u odnosu kontrolnu grupu, dok kod životinja u DOX Phe 2 grupi za ovaj parametar nema statički značajnih razlika. Nije bilo statistički značajne razlike vrednosti DBP spektra između dve eksperimentalne grupe posle tretmana. Kod pacova u kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajnih promena vrednosti parametara kratkog varijabiliteta DBP spektra (**Figura 3**).



**Figura 3. Parametri DBP kratkotrajnog varijabiliteta kod pacova tretiranih doksorubicinom.**

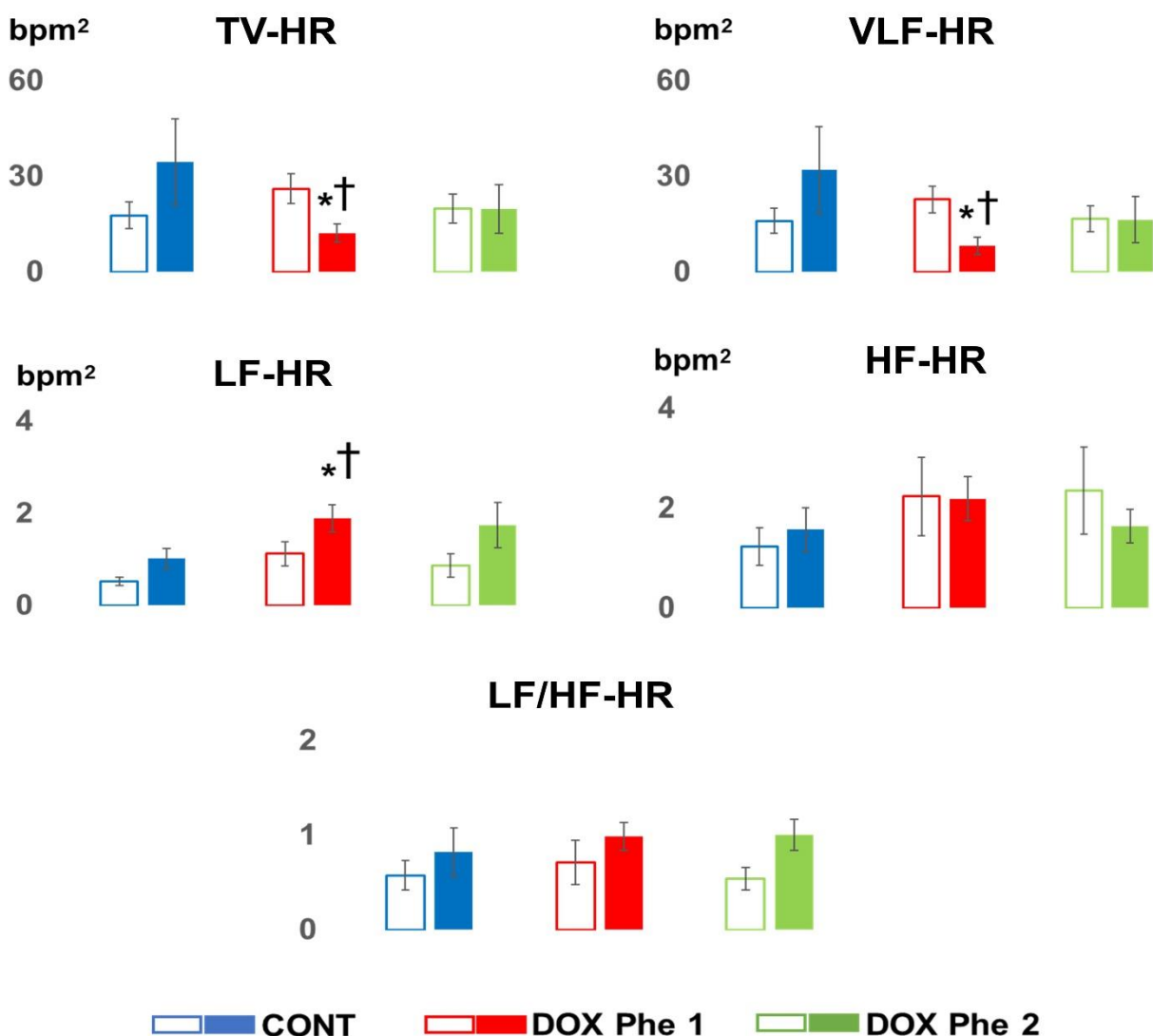
CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2; prazni stubići: vrednosti pre tretmana; puni stubići: vrednosti posle tretmana; TV-DBP: totalni DBP spektar; VLF-DBP: zona veoma niskih frekvenci DBP spektra; LF-DBP: zona niskih frekvenci DBP spektra; HF-DBP: zona visokih frekvenci DBP spektra.

\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. početne vrednosti; †p<0,05; ††p<0,01 vs. CONT



#### 4.3.4. Kratkotrajni varijabilitet srčane frekvence

Spektralnom analizom kratkotrajnog varijabiliteta srčane frekvence uočava se statistički značajno smanjenje vrednosti parametara HR spektra, TV-HR, VLF-HR i LF-HR u grupi DOX Phe 1, u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu. Kod životinja u ovoj grupi, kod parametara HF-HR i LF/HF HR nema statički značajne razlike. Takođe, kod životinja koje pripadaju grupi DOX Phe 2 nema statistički značajne razlike ni kod jedne vrednosti parametara HR spektra. Nije bilo statistički značajne razlike vrednosti HR spektra između dve eksperimentalne grupe posle tretmana. Kod pacova u kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajnih promena vrednosti parametara kratkog varijabiliteta HR-a (**Figura 4**).



**Figura 4. Parametri HR kratkotrajnog varijabiliteta kod pacova tretiranih doksorubicinom.** CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2; prazni stubići: vrednosti pre tretmana; puni stubići: vrednosti posle tretmana; TV-HR: totalni HR spektar; VLF-HR: zona veoma niskih frekvenci HR spektra; LF-HR: zona niskih frekvenci HR spektra; HF-HR: zona visokih frekvenci HR spektra; LF/HF-HR: odnos zona niskih i visokih frekvenci HR spektra. \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. početne vrednosti; †p<0,05; ††p<0,01 vs. CONT

#### 4.4. Koncentracije markera srčane insuficijencije u krvi NT-proBNP-a

Određivanje koncentracije NT-proBNP-a, biohemijskog markera srčane insuficijencije, iz plazme ELISA testom je pokazala statistički značajni porast koncentracije NT-proBNP-a u obe eksperimentalne grupe tretirane doksorubicinom u odnosu na kontrolnu grupu. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji NT-proBNP-a između dve eksperimentalne grupe (**Tabela 6**).

**Tabela 6. Koncentracije NT-proBNP-a u krvi kod pacova tretiranih doksorubicinom.**

parametar	CONT (n=6)	DOX Phe 1 (n=9)	DOX Phe 2 (n=9)
NT-proBNP (pg/ml)	26,0 ± 10,4	270,0 ± 137,0 *	157,0 ± 68,0 *

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje šest pacova ± SEM.

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1;

DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2; NT-proBNP: N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida.

\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. CONT

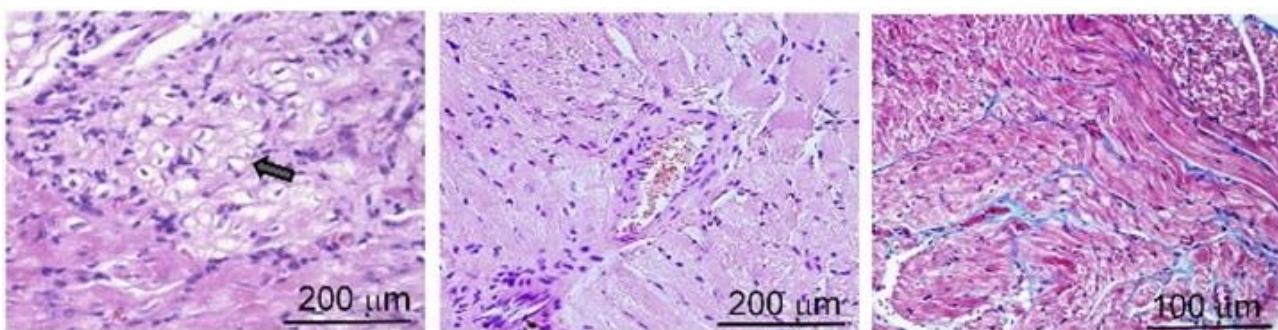


#### 4.5. Patohistološka analiza srčanog mišića

Histološka analiza srčanog tkiva pokazuje karakteristične promene koje se javljaju u dilatatornoj kardiomiopatiji, u eksperimentalnoj grupi koja je posle aplikacije doksorubicina ispoljila fenotip 1. Kod životinja u DOX Phe 1 se uočava intezivna miokardijalna vakuolizacija, leukocitna infiltracija, perivaskularna i intersticijalna fibroza (**Slika 13**). Kod jedinki u grupi DOX Phe 2 promene ukazuju na diskretne znake hipertrofije srčanog tkiva. Dominira uvećanje kardiomiocita koje karakteriše povećan broj jedara koja su grupisana i nekroza sa kontrakcijskim prugama (**Slika 14**). Kod životinja u obe eksperimentalne grupe se uočava intersticijalna i perivaskularna fibroza (**Slika 13, Slika 14**). Imunohistohemijsko bojenje na kaspazu-3, kao markera apoptoze i prisustva leukocita, odnosno LCA CD45 glikoproteina, je bilo pozitivno u obe eksperimentalne grupe tretirane doksorubicinom (**Slika 15**). Histološki nalaz srčanog tkiva u kontrolnoj grupi je bio bez patoloških promena (**Slika 16**).

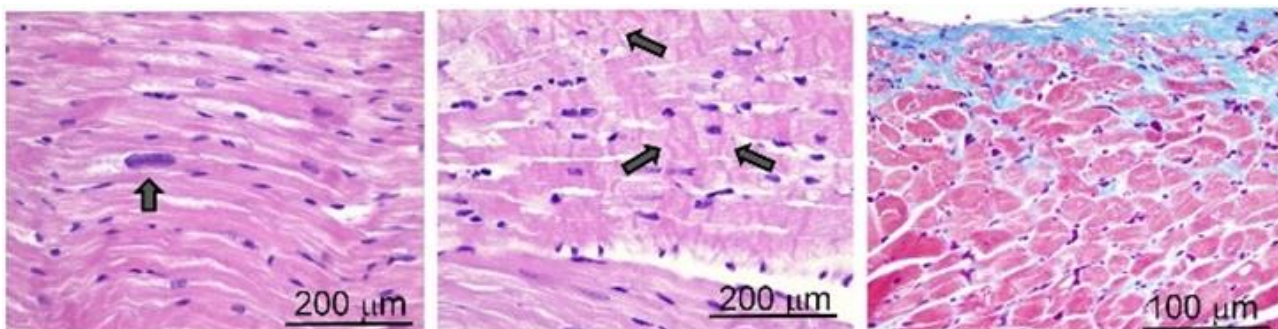
Na histomorfometrijskim mikrofotografijama poprečnog preseka srčanog tkiva se uočava veći poprečni presek srčanog tkiva kod životinja iz grupe DOX Phe 2, koji su razvile hipertrofične promene srčanog mišića, u odnosu na kontrolnu grupu i DOX Phe 1 grupu. Odnosno, uočavamo manji poprečni presek srčanog tkiva kod životinja u DOX Phe 1, koje su razvile promene koje odgovaraju dilatatornoj kardiomiopatiji, u odnosu na kontrolnu grupu i DOX Phe 2 grupu (**Slika 17**).

Histološkom analizom bubrežnog tkiva su uočene tubularne i glomerularne dilatacije kao znaci blage nefrotoksičnosti, dok su znaci masne infiltracije hepatocita kod životinja u obe eksperimentalne grupe uočeni histološkom analizom jetre.



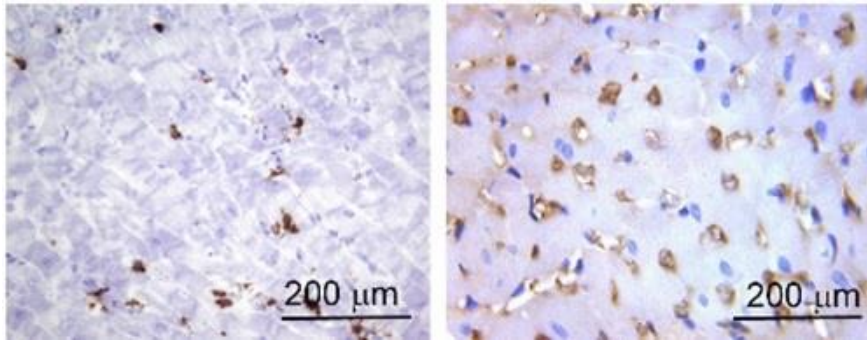
**Slika 13. Morfologija srca pacova tretiranih doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1.**

Levi panel: kardiomiocitna vakuolizacija; srednji panel: intersticijalna fibrozna infiltracija; desni panel: fibroza.



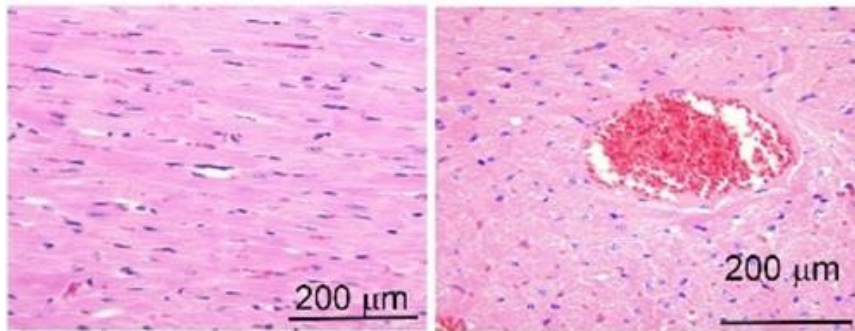
**Slika 14. Morfologija srca pacova tretiranih doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2.**

Levi panel: grupisanje jedara; srednji panel: nekroza u kontrakcijskim prugama; desni panel: fibroza.



**Slika 15. Morfologija srca pacova tretiranih doksorubicinom.**

Levi panel: prisustvo LCA CD45 glikoproteina; desni panel: markeri apoptoze.



**Slika 16. Morfologija srca pacova tretiranih fiziološkim rastvorom.**

Levi i desni panel: histološki nalaz zdravog srčanog tkiva, bez patoloških promena.

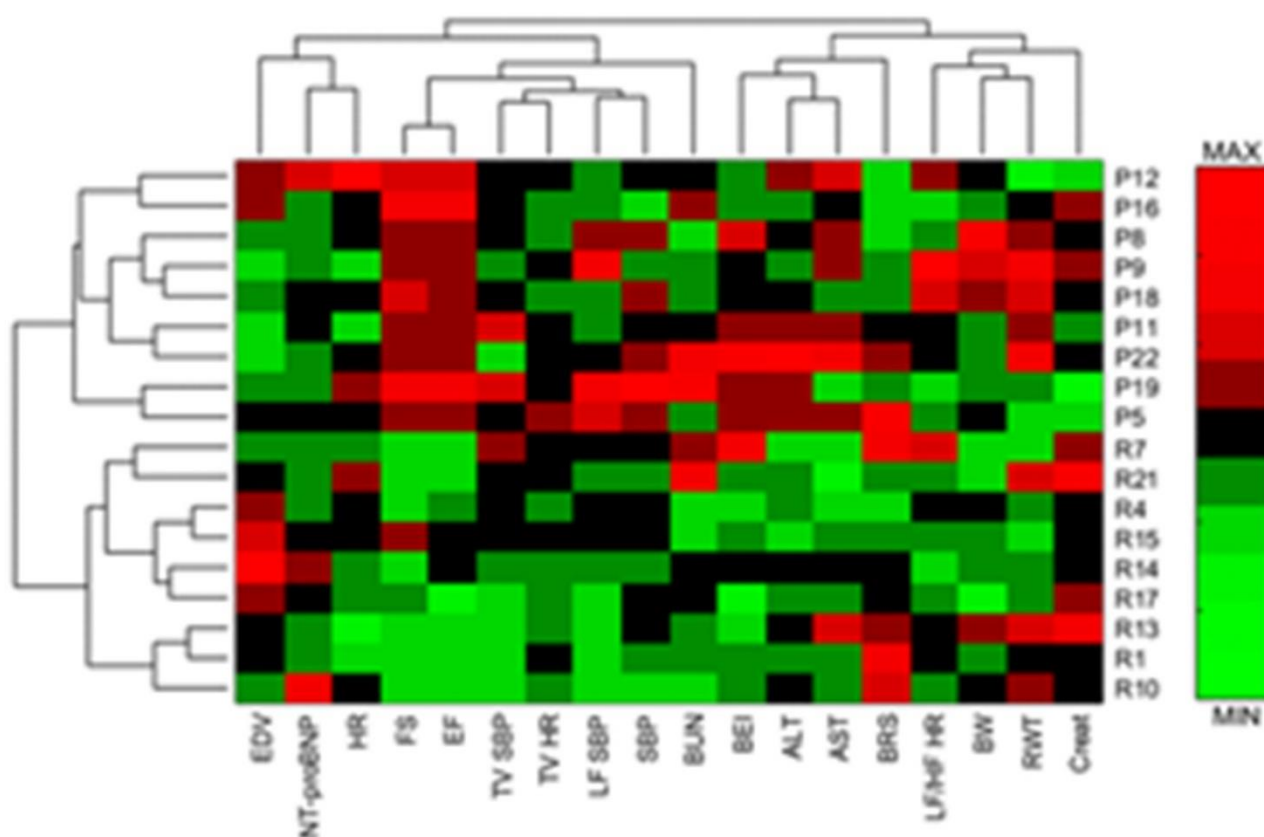


**Slika 17. Poprečni presek srčanog tkiva pacova tretiranih doksorubicinom.**

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2.

## 4.6. Fenomapiiranje

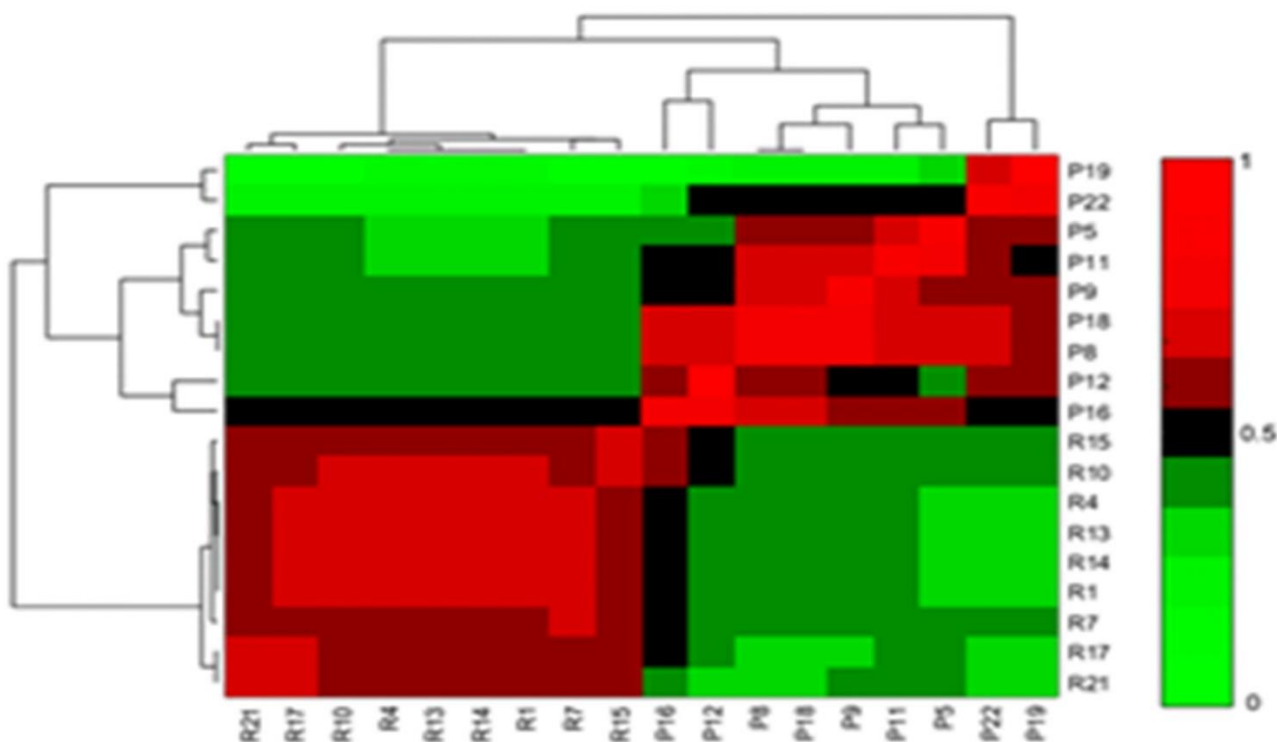
Formirana je multidimenzionalna toplotna mapa sa 18 parametara koji su pokazali nizak nivo korelacije ( $<0.6$ ) od 18 jedinki iz eksperimentalne grupe. Korišćeni su hemodinamski parametri (SBP i HR), ehokardiografski parametri (LVEDV, LVFS, LVEF i RWT), autonomni markeri kardiovaskularnog varijabiliteta (TV SBP, TV HR, LF SBP, LF/HF HR, BRS i BEI), biohemijski markeri (NT-proBNP, BUN, ALT, AST i Creat) i telesna masa (Slika 18). Toplotna mapa grupisanih parametara, odnosno vizualizovani matriks koegzistencije, pokazuje formiranje klastera za 4 parametra, LVEF, LVEDV, LVFS i BEI, a dendrogrami sa strane pokazuju da se jedinke raspoređuju u dva velika klastera, odnosno dve veće grupe, DOX Phe 1 i DOX Phe 2 (Slika 19). Redukcijom parametara iz multidimenzionalnog prostora na dve dimenzije i dodavanjem jedinki iz kontrolne grupe, dobijen je grafički prikaz na kome se vidi raspoređivanje jedinki u tri grupe. Jedinke iz eksperimentalne grupe su raspoređene u dva veća klastera, na isti način kao i u multidimenzionalnoj toplotnoj mapi, a jedinke iz kontrolne grupe su formirale svoj klaster (Slika 20).



**Slika 18. Multidimenzionalna toplotna mapa.**

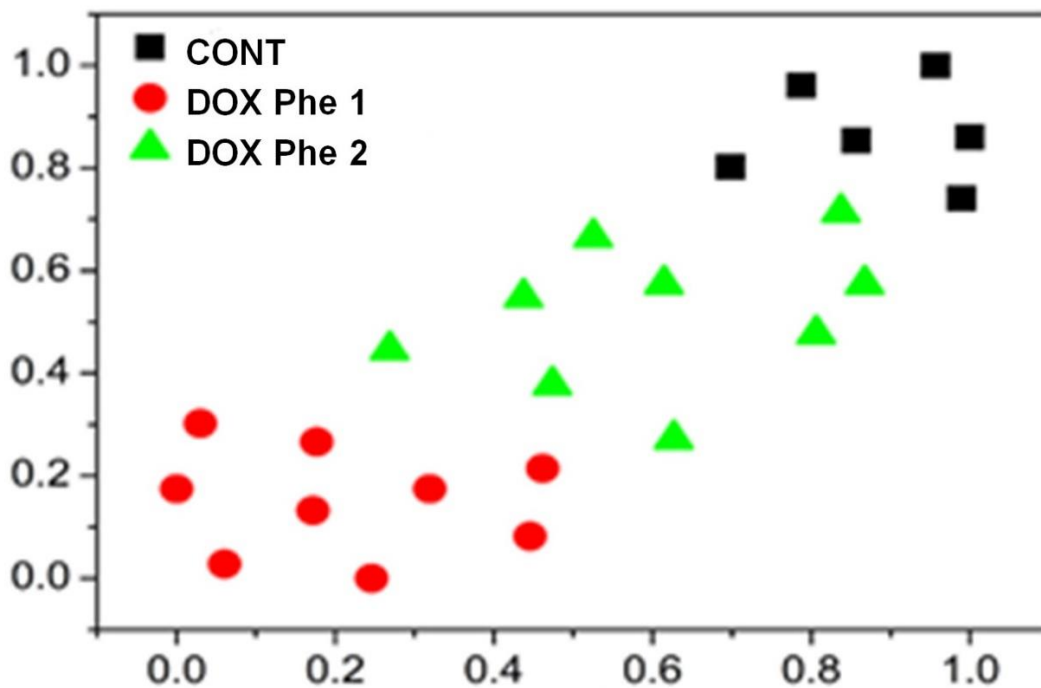
Crvena i zelena boja označavaju porast i pad vrednosti parametra pojedinačne jedinke u odnosu na srednju vrednost tog parametra svih jedinki. R1-P22: oznaka jedinki iz eksperimentalne grupe; EDV: end-dijastolni volumen; NT-proBNP: N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida; HR: srčana frekvencija; FS: frakcionalno skraćivanje; EF: ejectionna frakcija; TV-SBP: totalni SBP spektar; TV-HR: totalni HR spektar; LF-SBP: zona niskih frekvenci SBP spektra; SBP: sistolni krvni pritisak; BUN: azot uree u krvi; BEI: indeks efektivnosti baroreceptorskog refleksa; ALT: alanin aminotransferaza; AST: aspartat aminotransferaza; BRS: senzitivnost baroreceptorskog refleksa; LF/HF HR: odnos zona niskih i visokih frekvenci HR spektra; BW: telesna masa; RWT: relativno zadebljanje zida leve komore; Creat: kreatinin.





**Slika 19. Matriks koegzistencije.**

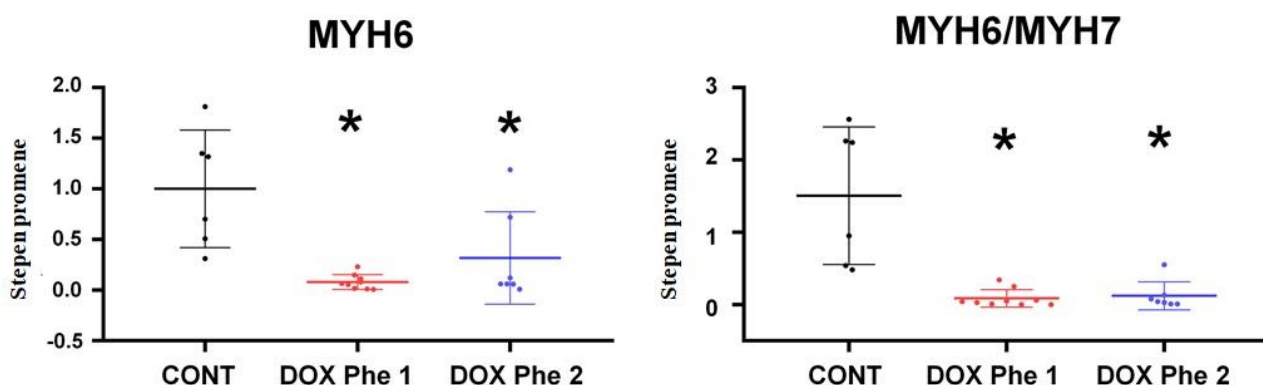
Crvena i zelena boja označavaju povećanu i smanjenu mogućnost svake jedinice da se nađe u istom klasteru. R1-P22: oznaka jedinice iz eksperimentalne grupe.



**Slika 20. Dvodimenzionalno klasterovanje jedinice na osnovu njihovih osobina.** CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2.

#### 4.7. Transkriptom leve komore srca

Rezultati kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu su pokazali statistički značajan pad ekspresije gena za MYH6, MYH6/MYH7 (Slika 21, levi grafikon), COL1A1, MYBPC3, APLN, APLNR u grupi DOX Phe 1 u odnosu na kontrolu grupu, odnosno statistički značajan porast ekspresije CTGF u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 7). Primećen je statistički značajan pad ekspresije gena za MYH6, MYH6/MYH7 (Slika 21, desni grafikon), TTN, VCAM1, APLN i APLNR, u grupi DOX Phe 2 u odnosu na kontrolnu grupu. Kod ostalih gena nije bilo statistički značajne razlike kod životinja u eksperimentalnim grupama u odnosu na jedinke iz kontrolne grupe. Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji gena između dve eksperimentalne grupe (Tabela 7).



**Slika 21. Genska ekspresija MYH6 i MYH6/MYH7 u kardiomiocitima kod pacova tretiranih doksorubicinom.**

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. CONT

**Tabela 7. Genska ekspresija u kardiomiocitima kod pacova tretiranih doksorubicinom.**

Funkcija	Gen	CONT (n=6)	DOX Phe 1 (n=9)	DOX Phe 2 (n=9)
Inflamacija	IL1b	1,00 ± 0,13	0,87 ± 0,08	1,23 ± 0,21
	IL6	1,00 ± 0,15	1,06 ± 0,08	1,52 ± 0,25
Fibroza	FN1	1,00 ± 0,34	0,68 ± 0,17	0,58 ± 0,11
	COL1A1	1,00 ± 0,31	0,24 ± 0,08 *	0,32 ± 0,14
Receptori	ADRB1	1,00 ± 0,16	0,99 ± 0,11	1,24 ± 0,15
	ADRB2	1,00 ± 0,07	0,77 ± 0,07	1,04 ± 0,16
	AGTR1A	1,00 ± 0,07	0,80 ± 0,07	1,17 ± 0,20
	NR3C2	1,00 ± 0,23	1,05 ± 0,23	0,70 ± 0,12

<b>Remodelovanje</b>	<b>CTGF</b>	1,00 ± 0,16	1,61 ± 0,22 *	1,80 ± 0,32 *
	<b>NPPB</b>	1,00 ± 0,06	1,10 ± 0,15	1,28 ± 0,18
<b>Strukturni proteini</b>	<b>MYH6</b>	1,00 ± 0,24	0,08 ± 0,03 **	0,32 ± 0,13 *
	<b>MYH7</b>	1,00 ± 0,39	2,96 ± 1,21	2,60 ± 0,66
	<b>MYH6/MYH7</b>	1,00 ± 0,39	0,09 ± 0,04 **	0,12 ± 0,07 **
	<b>TNNT2</b>	1,00 ± 0,24	0,58 ± 0,15	0,93 ± 0,28
	<b>TNNI3</b>	1,00 ± 0,29	0,62 ± 0,14	0,90 ± 0,22
	<b>TTN</b>	1,00 ± 0,12	0,70 ± 0,13	0,53 ± 0,07 *
	<b>ACTC1</b>	1,00 ± 0,13	0,97 ± 0,11	0,61 ± 0,11
	<b>MYBPC3</b>	1,00 ± 0,12	0,58 ± 0,11 *	1,03 ± 0,39
<b>Homeostaza kalcijuma</b>	<b>RYR2</b>	1,00 ± 0,26	0,49 ± 0,12	0,61 ± 0,19
	<b>ATP2A2</b>	1,00 ± 0,32	0,61 ± 0,19	1,06 ± 0,33
	<b>VACM1</b>	1,00 ± 0,14	0,81 ± 0,18	0,57 ± 0,06 *
<b>Kardioprotekt vna</b>	<b>APLN</b>	1,00 ± 0,26	0,22 ± 0,06 **	0,28 ± 0,11 **
	<b>APLNR</b>	1,00 ± 0,29	0,17 ± 0,04 **	0,15 ± 0,07 **

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje šest pacova ± SEM.

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1;

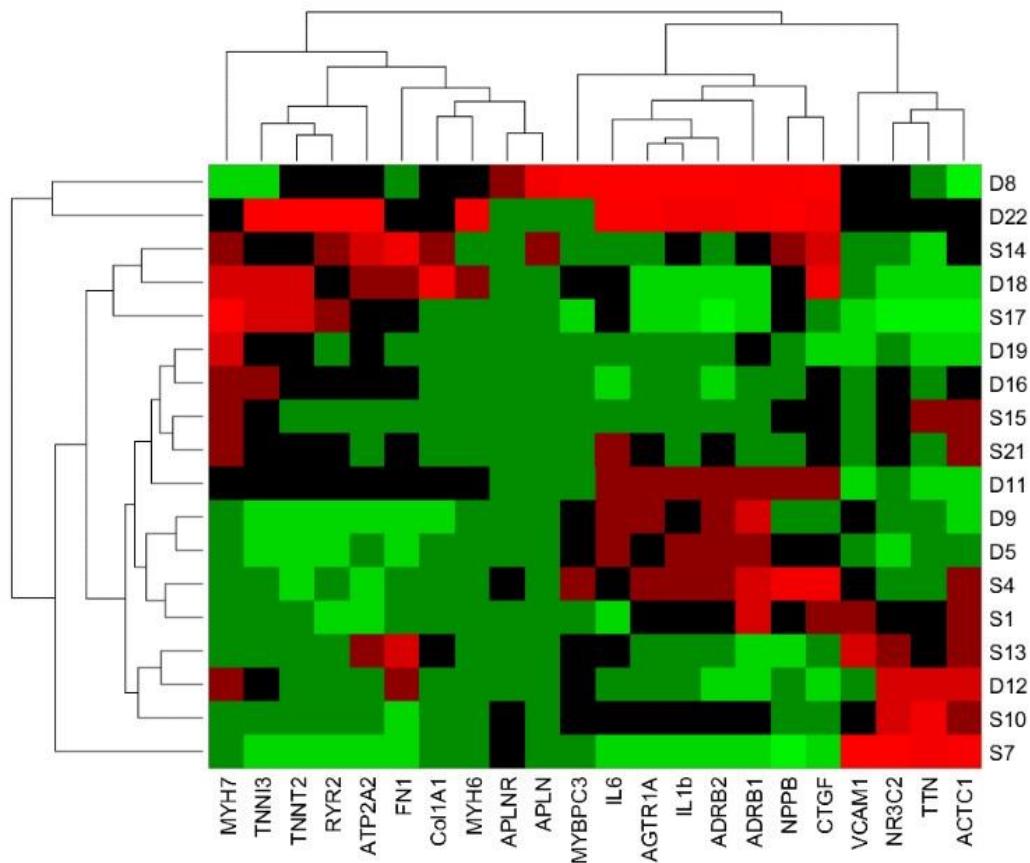
DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2.

IL1 $\beta$ : interleukin 1 beta; IL6: interleukin 6; FN1: fibronektin 1; COL1A1: kolagen tip 1 alfa 1; ADRB1: beta-adrenergički receptor tip 1; ADRB2: beta-adrenergički receptor tip 2; AGTR1A: angiotenzinski II receptor tip 1a; NR3C2: nuklearni receptor podfamilije 3 grupe C tip 2 (kodira protein za mineralokortikoidni receptor); CTGF: faktor rasta vezivnog tkiva; NPPB: natriuretski peptid tipa B; MYH6: teški lanac miozina tip 6; MYH7: teški lanac miozina tip 7; TNNT2: troponin T tip 2; TNNI3: troponin I tip 3; TTN: titin; ACTC1: alfa aktin srčanog mišića 1; MYBPC3: srčani miozin-vezujući protein C; RYR2: rijanodinski receptor tip 2; ATP2A2: ATPaza sarkoplazmatičnog retikuluma koja pumpa Ca; VACM1: protein za mobilizaciju kalcijuma aktiviran vazopresinom; APLN: apelin; APLNR: apelinski receptor.

\*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. CONT; †p<0,05; ††p<0,01 vs. DOX Phe 1

## 4.8. Genotipizacija

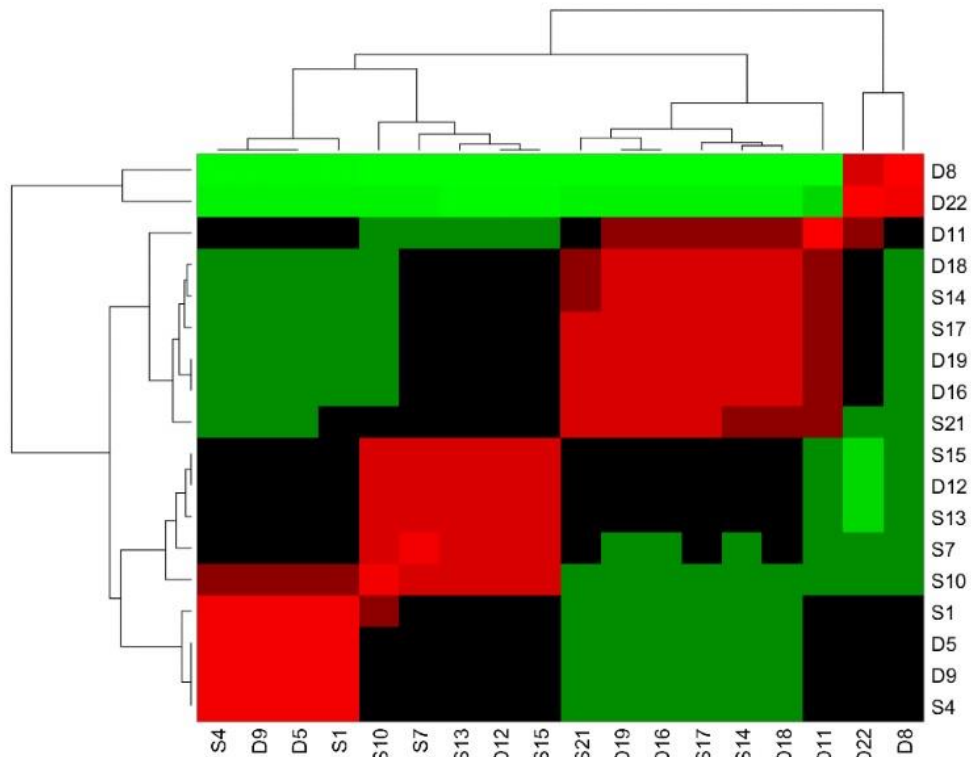
Multidimenzionalna toplotna mapa (Slika 22) i formirani matriks koegzistencije (Slika 23) vrednosti ekspresije gena koji su promenjeni kod pacova koji su tretirani doksorubicinom i redukcija parametara, odnosno vrednosti ekspresije ovih gena, iz multidimenzionalnog prostora na dve dimenzije (Slika 24) nisu pokazali značajnu klasterizaciju niti podudarnost sa fenotipovima doksorubicinske kardiomiopatije.



**Slika 22. Multidimenzionalna toplotna mapa.**

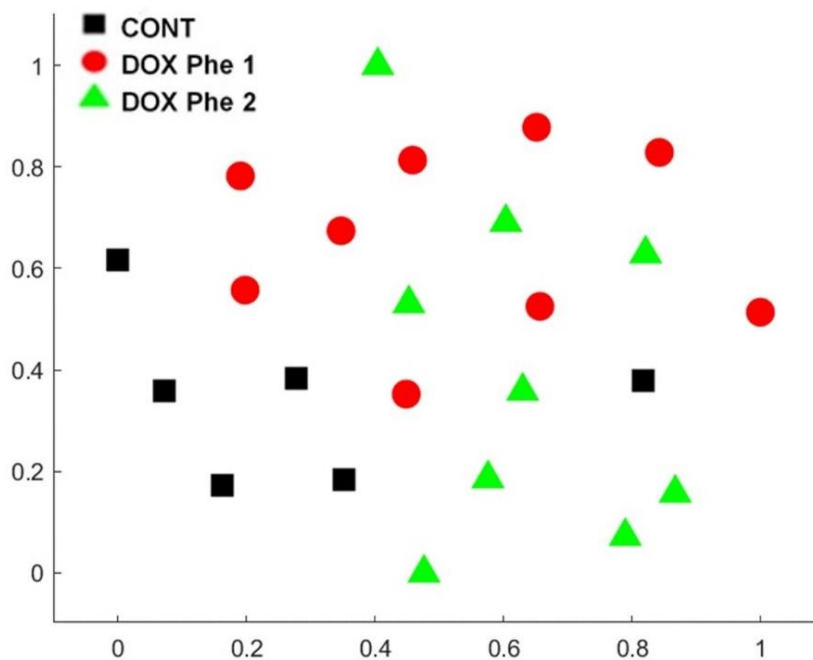
Crvena i zelena boja označavaju porast i pad vrednosti parametra pojedinačne jedinice u odnosu na srednju vrednost tog parametra svih jedinica. S1-D22: oznaka jedinice iz eksperimentalne grupe.

IL1 $\beta$ : interleukin 1 beta; IL6: interleukin 6; FN1: fibronektin 1; COL1A1: kolagen tip 1 alfa 1; ADRB1: beta-adrenergički receptor tip 1; ADRB2: beta-adrenergički receptor tip 2; AGTR1A: angiotenzinski II receptor tip 1a; NR3C2: nuklearni receptor podfamilije 3 grupe C tip 2 (kodira protein za mineralokortikoidni receptor); CTGF: faktor rasta vezivnog tkiva; NPPB: natriuretski peptid tipa B; MYH6: teški lanac miozina tip 6; MYH7: teški lanac miozina tip 7; TNNT2: troponin T tip 2; TNNT3: troponin I tip 3; TTN: titin; ACTC1: alfa aktin srčanog mišića 1; MYBPC3: srčani miozin-vezujući protein C; RYR2: rijanodinski receptor tip 2; ATP2A2: ATPaza sarkoplazmatičnog retikuluma koja pumpa Ca; VACAM1: protein za mobilizaciju kalcijuma aktiviran vazopresinom; APLN: apelin; APLNR: apelinski receptor.



**Slika 23. Matriks koegzistencije.**

Crvena i zelena boja označavaju povećanu i smanjenu mogućnost svake jedinke da se nađe u istom klasteru. S1-D22: oznaka jedinki iz eksperimentalne grupe.



**Slika 24. Dvodimenzionalno klasterovanje jedinki na osnovu njihovih osobina.**

CONT: kontrolna grupa; DOX Phe 1: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 1; DOX Phe 2: pacovi tretirani doksorubicinom koji su ispoljili fenotip 2.



## 5. DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja su pokazali postojanje dva klinička fenotipa kod pacova koji su razvili kardiomiopatiju izazvanu doksorubicinom. Jedna grupa životinja je razvila kardiomiopatiju sa statistički značajnim smanjenjem LVEF i statistički značajnim povećanjem NT-proBNP-a, koja se može klasifikovati kao sistolna srčana insuficijencija - HF<sub>r</sub>EF (engl. *heart failure with reduced ejection fraction*). Kod druge grupe životinja razvila se hipertrofija srčanog mišića sa očuvanom LVEF i umerenim povećanjem NT-proBNP-a što odgovara karakteristikama dijastolne disfunkcije - HF<sub>p</sub>EF (engl. *heart failure with preserved ejection fraction*). Transkriptom leve komore srca pacova je pokazao promenu genske ekspresije kod jedinki u obe fenotipske grupe u odnosu na zdrave pacove iz kontrolne grupe. Kod obe fenotipske grupe došlo je do komparabilnog smanjenja ekspresije gena za MYH6, MYH6/MYH7, APLN, APLNR, COL1A1, TTN, MYBPC3 i VCAM1, te porasta ekspresije gena za MYH7 i CTFG čime je pokazano da ovi geni ne utiču, odnosno nisu povezani sa vrstom fenotipa.

Kardiomiopatija je izazvana pojedinačnom intravenskom dozom doksorubicina od 5 mg/kg. Ovaj eksperimentalni model doksorubicinske kardiomiopatije je već pokazao odgovarajuće ehokardiografske i histološke promene srčanog mišića u prethodnim istraživanjima sprovedenim u našoj laboratoriji (Cheah i sar., 2017; Kosić i sar., 2022), koje se mogu naći i kod doksorubicinske kardiomiopatije kod ljudi (Nebigil i Désaubry, 2018). Model doksorubicinske kardiomiopatije je inicijalno preuzet iz literature (Duncan i sar., 1998; Rasmussen i sar., 1989). Intravenski način aplikacije doksorubicina je izabran jer se u kliničkoj praksi doksorubicin standardno primenjuje intravenskim putem, ali i kako bi se sprečila ozbiljna neželjena dejstva na druga tkiva, kao što je to slučaj kod intraperitonealne primene doksorubicina (Vasić i sar., 2019).

Kod životinja u obe eksperimentalne grupe su patohistološkom analizom nađene promene koje su karakteristične za kardiomiopatiju. Kod jedinki u DOX Phe 1 grupi je dominantna vakuolizacija kardiomiocita, infiltracija polimorfonukleara, perivaskularna i intersticijalna fibroza. Slične patohistološke promene su zabeležene u prethodnim istraživanjima u kojima je korišćen isti model doksorubicinske kardiotoksičnosti (Lončar-Turukalo i sar., 2015; Cheah i sar., 2017; Vasić i sar., 2019). Kod životinja u DOX Phe 2 grupi je primećeno uvećanje kardiomiocita, praćeno karakterističnim duplim jedrima i grupisanjem jedara, odnosno nekrozom sa kontrakcijskim prugama. Ovakav patohistološki nalaz odgovara promenama koje se dešavaju u hipertrofiji i povećanoj stimulaciji srčanog tkiva od strane simpatikusa. Na histomorfometrijskim mikrofotografijama poprečnog preseka srčanog tkiva se uočava veći poprečni presek srčanog tkiva kod životinja iz grupe DOX Phe 2 u odnosu na jedinke iz grupe DOX Phe 1 i kontrolnu grupu, odnosno manji poprečni presek u grupi DOX Phe 1 u odnosu na kontrolnu grupu. Ove vrednosti u potpunosti koreliraju sa dilatatornim promenama u srcu koje su se razvile u grupi sa redukovanom LVEF, DOX Phe 1, odnosno promenama u smeru blage hipertrofije u grupi sa očuvanom LVEF, DOX Phe 2. Kod jedinki u obe eksperimentalne grupe imunohistohemijsko bojenje je bilo pozitivno na CD45 glikoprotein, markere prisustva leukocita i kaspazu-3, marker apoptoze. Njihovo prisustvo je znak nastanka oksidativnog stresa i apoptotskih procesa, kao glavnih mehanizama doksorubicinske kardiotoksičnosti.

Histološkom analizom bubrežnog tkiva su uočene tubularne i glomerularne dilatacije, kao znaci blage nefrotoksičnosti, kod životinja u obe eksperimentalne grupe. Takođe su uočeni i znaci masne infiltracije hepatocita. Ipak, biohemijske analize su pokazale da nije došlo do značajnijeg oštećenja tkiva bubrega i jetre, što se i nije očekivalo u ovakvom modelu doksorubicinske kardiotoksičnosti (Perazella, 2009). Vrednosti BUN-a su blago povišene u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu, ali su vrednosti i dalje u fiziološkim granicama za pacove. Vrednosti kreatinina, ALT-a i AST-a su takođe bile u fiziološkim granicama za pacove, bez statističke razlike u odnosu na jedinke iz kontrolne grupe. Ovakvi rezultati pokazuju dodatnu prednost primenjenog modela

izazivanja doksorubicinske kardiomiopatije, jer oštećenje bubrega i jetre ne doprinosi oštećenju srčanog mišića. Samim tim može se zaključiti da smrtni ishod kod životinja tretiranih doksorubicinom se najverovatnije desio zbog fibroze srčanog tkiva koja utiče na srčanu funkciju, odnosno dovodi na kraju do ireverzibilne srčane insuficijencije i fatalnih aritmija.

Prvi simptomi doksorubicinske toksičnosti kod životinja u eksperimentalnoj grupi su počeli da se javljaju tri nedelje od aplikacije doksorubicina. Uočen je smanjeni unos hrane i vode i statistički značajan pad telesne mase kod jedinki u obe eksperimentalne grupe, smanjena motorna aktivnost, propadanje krzna, crvenilo oko očiju. U petoj nedelji su zabeleženi prvi slučajevi razvoja srčane insuficijencije kod životinja tretiranih doksorubicinom, dok su sve životinje iz eksperimentalne grupe razvile srčanu insuficijenciju do desete nedelje nakon aplikacije doksorubicina. Zabeležen je visok mortalitet kao posledica akutne toksičnosti doksorubicinom, što je u skladu prethodnim istraživanjima koja su sprovedena korišćenjem ovog modela doksorubicinske kardiotoksičnosti (Lončar-Turukalo i sar., 2015; Cheah i sar., 2017; Vasić i sar., 2019).

Ehokardiografsko merenje je pokazalo postojanje dva klinička fenotipa kod životinja tretiranih doksorubicinom. U grupi DOX Phe 1 je zabeležen je statistički značajan pad LVEF, frakcionalnog skraćanja leve komore, debljine međukomorskog septuma i zadnjeg zida leve komore u sistoli i dijastoli, kao i statistički značajan porast end-dijastolnog volumena i prečnika leve komore u sistoli i dijastoli. Pad relativne debljine zida i povećanje volumena leve komore odgovara promenama koje se dešavaju kod sistolne srčane insuficijencije, odnosno dijagnostikovanju dilatatorne kardiomiopatije kod jedinki koje su razvile srčanu insuficijenciju sa smanjenom LVEF. U grupi DOX Phe 2 životinje su imale očuvanu LVEF, a primećujemo i očuvane vrednosti funkcionalnog skraćanja leve komore, odnosno statistički značajan porast debljine međukomorskog septuma i zadnjeg zida leve komore u sistoli i dijastoli, statistički porast indeksa mase leve komore, kao i statistički značajan pad prečnika leve komore u sistoli. Očuvana LVEF, zadebljanje međukomorskog septuma i zadnjeg zida komora i smanjenje prečnika leve komore su znaci hipertrofije srčanog mišića i odgovaraju promenama koje se sreću u dijastolnoj srčanoj insuficijenciji, odnosno kod životinja koje su razvile srčanu insuficijenciju sa očuvanom LVEF. LVEF je najvažniji ehokardiografski parametar koji se u kliničkoj praksi prati prilikom terapije doksorubicinom.

U mnogobrojnim prethodnim istraživanjima gde je proučavana srčana insuficijencija, životinje koje smo klasifikovali ovde u grupu sa očuvanom LVEF su smatrane zdravim jedinkama. Međutim, hemodinamski parametri i histologija srčanog tkiva su pokazali da i kod ovih životinja postoji oštećenje srčanog tkiva i smanjenje srčane funkcije, te da njih takođe treba ozbiljno uzeti u razmatranje prilikom ispitivanja doksorubicinske kardiostoksičnosti.

Vrednosti SBP i DBP u obe eksperimentalne grupe su bile u fiziološkim granicama, bez statistički značajnih razlika. Međutim, kratkotrajni varijabilitet SBP i DBP spektra pokazuje statistički značajan pad u svim frekvencijalnim zonama u obe eksperimentalne grupe u odnosu na vrednosti pre aplikacije doksorubicina i u odnosu na kontrolnu grupu, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Lončar-Turukalo i sar., 2015; Cheah i sar., 2017; Vasić i sar., 2019). Pod bazalnim fiziološkim uslovima najveći deo SBP i DBP spektra se odnosi na oscilacije u VLF zoni koje potiču od spontane miogene aktivnost malih krvnih sudova (Jensen i sar., 1984). Na VLF-SB i VLF-DBP oscilacije utiče veliki broj vazoaktivnih molekula, najviše renin-angiotenzin sistem (Ponchon i Elghozi, 1996; Japundzic-Zigon, 2001; Japundzić-Zigon i sar., 2004) i baroreceptorski refleks (Cerutti i sar., 1994). LF oscilacije SBP i DBP spektra, pre svega LF-SBP kao i LF/HF-HR su markeri simpatičke aktivnosti i uticaja na arterijske krvne sudove (Japundzic i sar., 1990) i povećavaju se u hiperadrenergičkim stanjima (Oz i sar., 1995; Šarenac i sar., 2011), kao što je srčana insuficijencija. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da nije došlo do povećanja LF-SBP oscilacija, štaviše, došlo je do statistički značajnog smanjenja ovih frekvenci u obe eksperimentalne grupe. Objašnjenje za ovakav rezultat je posledično oštećenje vaskularnog endotela od strane doksorubicina, koje utiče na

smanjenu pokretljivost, odnosno smanjeni motilitet krvnih sudova (Yamada i sar., 2012). Dodatno, povećana sinteza vazoaktivnih molekula je povezana sa smanjenom funkcijom bubrega i jetre (Dharmani i sar., 2007; Grace i sar., 2013) i dovodi do smanjenja VLF oscilacija SBP i DBP spektra što ima suprotni efekat povećanoj simpatičkoj aktivnosti, odnosno u ovim eksperimentima smanjuje očekivani porast LF oscilacija oba spektra. HF zona SBP spektra u obe eksperimentalne grupe je statistički značajno smanjena, dok kod HF zone DBP spektra nije bilo značajnijih promena.

Srčana frekvencija je očekivano statistički značajno smanjena u odnosu na početne vrednosti kod pacova u DOX PHE 1 grupi, odnosno kod životinja sa redukovanom LVEF. Kod životinja u grupi DOX Phe 2 nije bilo statistički značajne promene srčane frekvence, što se povezuje sa očuvanim vrednostima LVEF i diskretnim znacima hipertrofije. Poznato je da je fiziološka osnova HR varijabiliteta neurogenog porekla (Cerutti i sar., 1991; Japundzic-Zigon, 1998). Posmatrano u bazalnim fiziološkim uslovima, aktivnost nerva vagusa, koji je deo parasimpatičkog sistema, generiše sve frekvencijalne zone HR spektra. Uticaj simpatikusa na HR spektar, odnosno pre svega na LF-HR, postoji u fiziološki stresnim situacijama. Na HF-HR varijabilitet, pored nerva vagusa, uticaj ima i respiracija (Japundzic-Zigon, 1998). Zbog ovoga se odnos LF i HF zone HR spektra uzima kao marker simpatovagalnog uticaja na rad srčanog mišića (Cerutti i sar., 1991). Analizom rezultata kratkotrajnog varijabiliteta HR-a je uočen značajan statistički pad TV-HR i VLF-HR oscilacija u DOX Phe 1 grupi, odnosno statistički značajan porast LF-HR u istoj toj grupi u odnosu na početne vrednosti i kontrolnu grupu. Pad ukupnog HR varijabiliteta je loš prognostički znak kod ljudi sa srčanom insuficijencijom sa redukovanom LVEF (Tubaro i sar., 2021). Sa druge strane kod životinja u DOX Phe 2 grupi nije bilo statistički značajnih razlika ni u jednoj frekvencionalnoj zoni HR spektra, što je u korelaciji sa očuvanim vrednostima srčane frekvence, odnosno očuvanoj morfologiji srčanog tkiva. Kako srčana insuficijencija svakako spada u hiperadrenergička stanja (Japundzic-Zigon, 1998), povećani uticaj simpatikusa, a smanjeni uticaj parasimpatikusa objašnjava smanjenje TV-HR i VLF-HR varijabiliteta, odnosno povećanje LF-HR varijabiliteta u grupi DOX Phe 1. Povećani broj respiracija, kao posledica smanjenog protoka krvi kroz organizam usled srčane insuficijencije, utiče na to da HF-HR varijabilitet ne bude smanjen i pored smanjenog uticaja parasimpatikusa. Izostanak statistički značajnog smanjenja ili povećanja bilo kog dela HR spektra u grupi DOX Phe 2 se može objasniti time da su ove životinje pretrpele manje oštećenje srčanog tkiva i imale više očuvanu srčanu funkciju u odnosu na životinje u grupi DOX Phe 1. Shodno tome i aktivnost simpatikusa kao kompenzatornog mehanizma kod ovih životinja je bila slabije prisutna, a parasimpatikus nije bio potisnut u tolikoj meri kao što je slučaj kod životinja u DOX Phe 1 grupi. Odnos LF- HR i HF-HR je statistički nepromenjen u obe eksperimentalne grupe, pored već navedenih razloga, i zbog gubitka senzitivnosti srčanog tkiva na kateholamine kao posledica dugotrajne simpatičke stimulacije (Robison i Giri, 1986).

U obe eksperimentalne grupe je zabeležen visoko statistički značajan porast BRS-a u odnosu na kontrolnu grupu i na vrednosti pre početka aplikacije doksorubicina. Porast ovih vrednosti može da ukazuje na aktivaciju kompenzatornog mehanizma uključenog u održavanje fiziološki normalne cirkulacije u krvotoku koja je usled oštećenja srca oslabljena. Vrednost BEI-a je statistički značajna smanjena u grupi sa redukovanom LVEF, DOX Phe 1, dok u grupi DOX Phe 2 nije bilo statistički značajnih promena vrednosti. Kako je BEI odnos vrednosti SBP-a i PI, inverzne vrednosti HR-a, onda je i očekivan pad BEI-a u grupi DOX Phe 1 gde smo već konstatovali statistički značajan pad vrednosti srčane frekvence.

Kod jedinki u obe eksperimentalne grupe se beleži statistički visoko značajan porast vrednosti NT-proBNP-a u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi DOX Phe 1 porast vrednosti NT-proBNP-a je čak deset puta u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u grupi DOX Phe 2 vrednost NT-proBNP-a šest puta veća od kontrolne grupe. Upoređivanjem vrednosti ovog parametra između dve grupe se uočava manji porast vrednosti kod jedinki u DOX Phe 2 grupi, što odgovara manjem oštećenju srčanog tkiva i više očuvanoj srčanoj funkciji u odnosu na jedinke u DOX Phe 1 grupi. NT-proBNP je uz vrednost

LVEF najvažniji i najpouzdaniji parametar, odnosno marker kojim se prati razvoj doksorubicinske kardiotoksičnosti. Njegovo povećano lučenje iz kardiomiocita pretkomora nastaje kao posledica povećanog istezanja zida pretkomora miokarda usled povećanog priliva venske krvi u srce, te je pouzdan pokazatelj dekompenzovane kardiomiopatije (Sarhene i sar., 2019; Pfeffer i sar., 2019). Statistički značajno povećanje enzima CK i LDH u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu dodatno doprinosi tvrdnji o oštećenju kardiomiocita od strane doksorubicina, iako ovi enzimi nisu specifični za srčano tkivo.

Transkriptom leve komore srca pacova sa doksorubicinskom kardiomiopatijom je obuhvatao analizu ekspresije gena koji su na osnovu njihove primarne uloge podeljeni u nekoliko grupa. Prvu grupu čine geni koji imaju funkciju u nastanku inflamacije: interleukin 1 beta (IL1 $\beta$ ) i interleukin 6 (IL6); zatim, geni koji imaju funkciju u procesu fibroze: fibronektin 1 (FN1) i kolagen tip 1 alfa 1 (COL1A1); geni koji kodiraju receptore u srcu koji su deo simpatičkog sistema: beta-adrenergički receptor tip 1 (ADRB1), beta-adrenergički receptor tip 2 (ADRB2), angiotenzinski II receptor tip 1a (AGTR1A) i mineralokortikoidni receptor (nuklearni receptor podfamilije 3 grupe C tip 2 - NR3C2); geni koji imaju funkciju u remodelovanju srčanih ćelija: faktor rasta vezivnog tkiva (CTGF) i natriuretski peptid tipa B (NPPB); geni koji kodiraju proteine koji ulaze u sastav sarkomera, odnosno strukturne proteine kardiomiocita: teški lanac miozina tip 6 (MYH6), teški lanac miozina tip 7 (MYH7), troponin T tip 2 (TNNT2) i troponin I tip 3 (TNNI3), titin (TTN), alfa aktin srčanog mišića 1 (ACTC1) i srčani miozin-vezujući protein C (MYBPC3); geni koji imaju funkciju u homeostazi kalcijuma: rijanodinski receptor tip 2 (RYR2), ATPaza sarkoplazmatskog retikuluma koja pumpa Ca (ATP2A2) i protein za mobilizaciju kalcijuma aktiviran vazopresinom (VACM1); kao i geni koji imaju kardioprotektivnu ulogu: apelin (APLN) i apelinski receptor (APLNR).

Transkriptom leve komore srca pacova tretiranih doksorubicinom pokazao je promenu ekspresije gena u obe fenotipske grupe: smanjenje ekspresije gena za teški lanac miozina tip 6, odnosa teškog lanca miozina 6 i teškog lanca miozina 7, apelin, apelinski receptor i povećanje ekspresije gena za faktor rasta vezivnog tkiva.

Teški lanac miozina tip 6 (MYH6) i teški lanac miozina tip 7 (MYH7) su proteini koji ulaze u sastav debelog filameta sarkomere kardiomiocita i imaju ulogu u kontrakciji srčanog mišića. Promena ekspresije gena za miozin je povezana sa hipertrofičnim kardiomiopatijama (Barrick i Greenberg, 2021). Posle rođenja, MYH6 se uglavnom nalazi u kardiomiocita u pretkomorama, zbog čega se naziva i adultni oblik miozina, dok se MYH7 nalazi u kardiomiocitima komora kao fetalna forma miozina (Schiaffino and Reggiani, 1996). U obe eksperimentalne grupe je uočen statistički značajan pad ekspresije MYH6 i statistički značajan pad odnosa MYH6 i MYH 7 u odnosu na kontrolnu grupu. Iako statistika nije pokazala značajnost, može se primetiti rast ekspresije MYH7 u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu. Pad ekspresije MYH6, odnosa MYH6 i MYH7 i porast ekspresije MYH7 kod pacova i ljudi sa srčanom insuficijencijom je već pokazana u mnogim prethodnim istraživanjima (Scheuermann i Boyer 2013; Gacita i sar., 2021; Hsieh i sar., 2022). Promena odnosa MYH6 i MYH 7 sa adultnog odnosa na odnos koji više odgovara embrionalnom periodu ukazuje na molekularne kompenzatorne mehanizme koji su pokrenuti zbog nastale doksorubicinske kardiomiopatije, odnosno srčane insuficijencije. Iako promene u obe eksperimentalne grupe idu u istom pravcu i između njih nema statistički značajne razlike, veći pad ekspresije MYH6 u DOX Phe 1 grupi nego u DOX Phe 2 odgovara prethodnim istraživanjima gde je kod ljudi sa dilatatornom kardiomiopatijom zabeležen veliki pad ekspresije gena za MYH6 (Dhar i sar., 2016).

Geni sa kardioprotektivnom ulogom su apelin (APLN) i apelinski receptor (APLNR). APLN je peptid koga sekretuju u najvećoj meri adipociti, ali i ćelije kardiovaskularnog sistema, gastrointestinalnog sistema i CNS-a. Vezivanjem za apelinske receptore u različitim tkivima i sistemima ostvaruje svoje mnogobrojne funkcije. Među njima su uloga u embrionalnom razvoju

kardiomiocita, uticaj na krvni pritisak stimulisanjem vazodilatacije, stimulisanje kontrakcije srčanog mišića i uticaj na energetski metabolizam (Hu i sar., 2021). Svojim vazodilatatornim i pozitivno inotropnim dejstvom, APLN i APLNR imaju kardioprotektivno dejstvo kod kardiovaskularnih oboljenja (Goideescu i Vida-Simiti, 2015). Pokazano je da genska ekspresija APLN i APLNR smanjena kod ljudi sa srčanom insuficijencijom (Pitkin i sar., 2010), kao i kod miševa tretiranih doksorubicinom (Hamada i sar., 2015). Ovo korelira sa našim istraživanjem gde je zabeležen visoko statistički značajan pad ekspresije APLN i APLNR kod jedinki u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje da smanjeno kardioprotektivno dejstvo ovih gena dodatno doprinosi razvoju srčane insuficijencije kod pacova u našem eksperimentu.

Značajnu funkciju u remodelovanju srčanih ćelija imaju geni za faktor rasta vezivnog tkiva (CTGF). CTGF ima ulogu u ćelijskoj proliferaciji, zarastanju rana, rastu tumora i fibrozi tkiva (Chen i sar., 2020). Posebno bitna uloga CTGF je u autokrinoj regulaciji fibroze srčanih ćelija (Dorn i sar., 2018). Inhibicija CTGF dovodi do većeg remodelovanja i disfunkcije leve komore, što ukazuje na to da aktivnost CTGF ima protektivnu ulogu u srčanom tkivu (Szabó i sar., 2014). U našem istraživanju jedinke u obe eksperimentalne grupe su imale statistički značajan porast ekspresije gena za CTGF, koji povezujemo sa aktivacijom kompenzatornih mehanizama.

Ekspresija gena za kolagen tip 1 alfa 1 i srčani miozin-vezujući protein C je smanjena samo u grupi DOX Phe 1, dok je ekspresija gena za titin i protein za mobilizaciju kalcijuma aktiviran vazopresinom smanjena samo u grupi DOX Phe 2.

U procesu fibroze značajnu ulogu ima gen za kolagen tip 1 alfa 1 (COL1A1). COL1A1 je protein koji ulazi u sastav mnogih struktura u ljudskom organizmu, hrskavice, kostiju, tetiva, kože, sklere, kao i u sastav srčanog mišića. U srčanom tkivu osim strukturne uloge, COL1A1 obezbeđuje čvrstinu mišićnog zida i doprinosi većoj snazi prilikom kontrakcija komora (Jalil i sar., 1989). Istraživanja su pokazala da koncentracija COL1A1 u plazmi se može koristiti kao serumski biomarker za srčanu insuficijenciju, odnosno pro-fibrotički marker (Hua i sar., 2020). Kod jedinki u eksperimentalnoj grupi je zabeležen pad ekspresije COL1A1, kao posledica narušene morfološke strukture srčanog tkiva, posebno kod jedinki u DOX Phe 1 grupi koje su na osnovu fenotipskih karakteristika pretrpele veća oštećenja srčanog tkiva. Srčani miozin-vezujući protein C (MYBPC3) je glavni regulatorni protein sarkomere srčanih ćelija. Odgovoran je za kordinisani rad ostalih proteina koje smo već pominjali kao sastavni deo sarkomera (Flashman i sar., 2004). Za razliku od titina, ovde se statistički značajno smanjena ekspresija gena za MYBPC3 u odnosu na kontrolnu grupu javlja u grupi DOX Phe 1, odnosno grupi koja ima smanjenje LVEF, što govori u prilog većem strukturnom oštećenju srčanog tkiva koje su pretrpele jedinke u ovoj grupi. U grupi sa očuvanom LVEF, DOX Phe 2, nije bilo statistički značajnih promena ekspresije ovog gena, što korelira sa više očuvanom kontraktilnom funkcijom i blagim hipertrofičnim promenama kod životinja iz ove grupe.

Titin (TTN) se od svih proteina koji ulaze u sastav sarkomere srčane ćelije smatra najvažnijim strukturnim proteinom jer obezbeđuje elastičnost srčanom mišiću i obezbeđuje adekvatan odgovor na mehanički stres koji se registruje. Kod ljudi je zabeležena promena genske ekspresije titina u mnogim kardiovaskularnim bolestima (LeWinter i Granzier, 2014). Statistički značajno smanjena ekspresija TTN u grupi DOX Phe 2, sa očuvanom LVEF, govori u prilog tome da su jedinke u ovoj grupi izgubile elastičnost srčanog mišića i imaju hipertrofične promene. S druge strane kod jedinki u grupi DOX Phe 1, koje imaju dilatatorne promene, nema statistički značajne promene ekspresije ovog gena u odnosu na kontrolnu grupu, iako se i tu može uočiti da je došlo do pada ekspresije gena za titin. U homeostazi kalcijuma značajnu ulogu ima gen za protein za mobilizaciju kalcijuma aktiviran vazopresinom (VCAM1). VCAM1 povećava koncentraciju kalcijuma unutar ćelije kada se vazopresin veže za njega. Osim toga ima ulogu u regulaciji signalnih puteva ćelijskog ciklusa, pre svega MAPK (Burnatowska-Hledin i sar., 2000). S obzirom da mehanizmi doksorubicinske kardiotoksičnosti uključuju promenu nivoa kalcijuma u ćeliji i inhibiciju MAPK signalnog puta, ideja

je bila da se proveriti da li je došlo do promene genske ekspresija ovog gena. Izmeren je statistički značajan pad ekspresije gena za VCAM1 kod pacova u grupi DOX Phe 2 u odnosu na kontrolnu grupu, dok kod pacova u DOX Phe 1 grupi nije bilo statistički značajne promene ovog gena u odnosu na jedinke iz kontrolne grupe.

Upoređivanjem genske ekspresije između dve eksperimentalne grupe nisu dobijene statistički značajne razlike. Na osnovu dobijenih rezultata ovog istraživanja, iako su jasno identifikovana dva klinička fenotipa kod životinja koji su razvili kardiomiopatiju izazvanu doksorubicinom, te pokazana jasna promena genske ekspresije za određeni broj gena u obe fenotipske grupe u odnosu na kontrolnu grupu, možemo samo da konstatujemo izostanak dva različita genotipa kod pacova koji su razvili doksorubicinsku kardiomiopatiju. Dakle, možemo da zaključimo da transkriptom ukazuje na razlike između fenotipa ali da je unapred određen izbor gena nedovoljan da tehnikom mašinskog učenja ukaže na postojanje dva genotipa. Da bismo odbacili tu pretpostavku neophodno bi bilo uporediti ekspresiju svih gena u levoj komori srca pacova oba fenotipa metodom RNK sekvenciranja.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Na osnovu hemodinamskih, ehokardiografskih, biohemijskih i autonomnih karakteristika metodom mašinskog učenja bez nadzora utvrđeno je da postoje dva fenotipa kardiomiopatije kod pacova tretiranih doksorubicinom. DOX Phe 1 koji odgovara srčanoj insuficijenciji sa redukovanom ejectionom frakcijom i DOX Phe 2 koji odgovara srčanoj insuficijenciji sa očuvanom ejectionom frakcijom.

2. Transkriptom leve komore srca pacova tretiranih doksorubicinom pokazao je promenu ekspresije gena u obe fenotipske grupe: smanjenje ekspresije gena za teški lanac miozina tip 6, odnosa teškog lanca miozina 6 i teškog lanca miozina 7, apelin, apelinski receptor i povećanje ekspresije gena za faktor rasta vezivnog tkiva. Ekspresija gena za kolagen tip 1 alfa 1 i srčani miozin-vezujući protein C je smanjena samo u grupi DOX Phe 1, dok je ekspresija gena za titin i protein za mobilizaciju kalcijuma aktiviran vazopresinom smanjena samo u grupi DOX Phe 2.

3. Obzirom da je promena ekspresije većine gena koji se menjanju pod uticajem doksorubicina bila zajednička za DOX Phe 1 i DOX Phe 2, metodom mašinskog učenja bez nadzora utvrđen je samo jedan genotip.

## 7. LITERATURA

Aliprantis AO. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. Vol. 19, The EMBO Journal. 2000. p. 3325–36.

American Society of Health System Pharmacists. ASHP Best Practices 2017-2018: Position & Guidance Documents of Ashp. 2017. 785 p.

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius var. caesius*. Vol. 11, Biotechnology and Bioengineering. 1969. p. 1101–10.

Barrick SK, Greenberg MJ. Cardiac myosin contraction and mechanotransduction in health and disease. *J Biol Chem*. 2021 Nov;297(5):101297.

Bien S, Riad A, Ritter CA, Gratz M, Olshausen F, Westermann D, et al. The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67(21):10428–35.

Bhattacharya B, Mukherjee S. Cancer Therapy Using Antibiotics. Vol. 06, Journal of Cancer Therapy. 2015. p. 849–58.

Blum RH, Carter SK. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med*. 1974 Feb;80(2):249–59.

Brown L, Fenning A, Chan V, Loch D, Wilson K, Anderson B, et al. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. Vol. 11, Heart, Lung and Circulation. 2002. p. 167–73.

Burgess DJ, Doles J, Zender L, Xue W, Ma B, McCombie WR, et al. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 1;105(26):9053–8.

Burnatowska-Hledin M, Zhao P, Capps B, Poel A, Parmelee K, Mungall C, et al. VACM-1, a cullin gene family member, regulates cellular signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Jul;279(1):C266–73.

Cadeddu C, Mercurio V, Spallarossa P, Nodari S, Triggiani M, Monte I, et al. Preventing antineoplastic drug-related cardiomyopathy: old and new therapeutic strategies. *J Cardiovasc Med*. 2016 May;17 Suppl 1 Special issue on Cardiotoxicity from Antineoplastic Drugs and Cardioprotection:e64–75.

Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Civelli M, et al. Response to Letters Regarding Article, “Early Detection of Anthracycline Cardiotoxicity and Improvement With Heart Failure Therapy.” *Circulation*. 2016 Jan 26;133(4):e363.

Carvalho RA, Sousa RPB, Cadete VJJ, Lopaschuk GD, Palmeira CMM, Bjork JA, et al. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology*. 2010 Apr 11;270(2-3):92–8.

Cerutti C, Barres C, Paultre C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am J Physiol*. 1994 May;266(5 Pt 2):H1993–2000.

Cerutti C, Gustin MP, Paultre CZ, Lo M, Julien C, Vincent M, et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol*. 1991 Oct;261(4 Pt 2):H1292–9.



- Cheah HY, Šarenac O, Arroyo JJ, Vasić M, Lozić M, Glumac S, et al. Hemodynamic effects of HPMA copolymer based doxorubicin conjugate: A randomized controlled and comparative spectral study in conscious rats. *Nanotoxicology*. 2017 Mar;11(2):210–22.
- Chen Z, Zhang N, Chu HY, Yu Y, Zhang ZK, Zhang G, et al. Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Oct 29;8:593269.
- Christenson ES, James T, Agrawal V, Park BH. Use of biomarkers for the assessment of chemotherapy-induced cardiac toxicity. *Clin Biochem*. 2015 Mar;48(4-5):223–35.
- Colombo A, Sandri MT, Salvatici M, Cipolla CM, Cardinale D. Cardiac complications of chemotherapy: role of biomarkers. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2014 Jun;16(6):313.
- Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019 Mar;46(3):204–15.
- Cummings J, Willmott N, Hoey BM, Marley ES, Smyth JF. The consequences of doxorubicin quinone reduction in vivo in tumour tissue. *Biochem Pharmacol*. 1992 Dec 1;44(11):2165–74.
- Curigliano G, Lenihan D, Fradley M, Ganatra S, Barac A, Blaes A, et al. Management of cardiac disease in cancer patients throughout oncological treatment: ESMO consensus recommendations. *Ann Oncol*. 2020 Feb;31(2):171–90.
- Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: Comparison to necropsy findings. Vol. 57, *The American Journal of Cardiology*. 1986. p. 450–8.
- Dhar K, Moulton AM, Rome E, Qiu F, Kittrell J, Raichlin E, et al. Targeted myocardial gene expression in failing hearts by RNA sequencing. *J Transl Med*. 2016 Nov 25;14(1):327.
- Dharmani M, Mustafa MR, Achike FI, Sim MK. Effects of angiotensin 1-7 on the actions of angiotensin II in the renal and mesenteric vasculature of hypertensive and streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2007 Apr 30;561(1-3):144–50.
- Dong J, Chen H. *Cardiotoxicity of Anticancer Therapeutics*. Vol. 5, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2018.
- Dorn LE, Petrosino JM, Wright P, Accornero F. CTGF/CCN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2018 Aug;121:205–11.
- Duncan R, Coatsworth JK, Burtles S. Preclinical toxicology of a novel polymeric antitumour agent: HPMA copolymer-doxorubicin (PK1). *Hum Exp Toxicol*. 1998 Feb;17(2):93–104.
- Fan GC, Zhou X, Wang X, Song G, Qian J, Nicolaou P, et al. Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1270–9.
- Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res*. 2004 May 28;94(10):1279–89.
- Foppa M, Duncan BB, Rohde LEP. Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? *Cardiovasc Ultrasound*. 2005 Jun 17;3:17.

- Franco YL, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer*. 2018 Sep 11;10:131–41.
- Fred ALN, Jain AK. Combining multiple clusterings using evidence accumulation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*. 2005 Jun;27(6):835–50.
- Frey BJ, Dueck D. Clustering by passing messages between data points. *Science*. 2007 Feb 16;315(5814):972–6.
- Gacita AM, Fullenkamp DE, Ohiri J, Pottinger T, Puckelwartz MJ, Nobrega MA, et al. Genetic Variation in Enhancers Modifies Cardiomyopathy Gene Expression and Progression. *Circulation*. 2021 Mar 30;143(13):1302–16.
- Ghigo A, Li M, Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul;1863(7 Pt B):1916–25.
- Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol*. 2008 Aug 1;26(22):3777–84.
- Gil-Gil MJ, Bellet M, Bergamino M, Morales S, Barnadas A, Manso L, et al. Long-Term Cardiac Safety and Survival Outcomes of Neoadjuvant Pegylated Liposomal Doxorubicin in Elderly Patients or Prone to Cardiotoxicity and Triple Negative Breast Cancer. Final Results of the Multicentre Phase II Caprice Study. *Front Oncol*. 2021 Jul 9;11:645026.
- Goidescu CM, Vida-Simiti LA. The Apelin-APJ System in the Evolution of Heart Failure. *Clujul Med*. 2015 Jan 28;88(1):3–8.
- Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM. Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 1980 Mar 27;597(1):1–14.
- Grace JA, Klein S, Herath CB, Granzow M, Schierwagen R, Masing N, et al. Activation of the MAS receptor by angiotensin-(1-7) in the renin-angiotensin system mediates mesenteric vasodilatation in cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013 Oct;145(4):874–84.e5.
- Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:707–36.
- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and possible hydroxyl radical formation stimulated by the self-reduction of a doxorubicin-iron (III) complex. *Biochem Pharmacol*. 1984 Jun 1;33(11):1725–8.
- Hamada J, Baasanjav A, Ono N, Murata K, Kako K, Ishida J, et al. Possible involvement of downregulation of the apelin-APJ system in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Apr 15;308(8):H931–41.
- Hand DJ, McLachlan GJ, Basford KE. Mixture Models: Inference and Applications to Clustering. Vol. 38, *Applied Statistics*. 1989. p. 384.
- Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J*. 1996 Mar;17(3):354–81.
- Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab*. 2000 Sep;71(1-2):436–44.

- Hsieh J, Becklin KL, Givens S, Komosa ER, Lloréns JEA, Kamdar F, et al. Myosin Heavy Chain Converter Domain Mutations Drive Early-Stage Changes in Extracellular Matrix Dynamics in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 16;10:894635.
- Hua X, Wang YY, Jia P, Xiong Q, Hu Y, Chang Y, et al. Multi-level transcriptome sequencing identifies COL1A1 as a candidate marker in human heart failure progression. *BMC Med.* 2020 Jan 6;18(1):2.
- Hu G, Wang Z, Zhang R, Sun W, Chen X. The Role of Apelin/Apelin Receptor in Energy Metabolism and Water Homeostasis: A Comprehensive Narrative Review. *Front Physiol.* 2021 Feb 10;12:632886.
- Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. Vol. 124, *Journal of Clinical Investigation.* 2014. p. 617–30.
- Jain AK, Dubes RC. *Algorithms for Clustering Data.* 1988. 320 p.
- Jain D, Russell RR, Schwartz RG, Panjra GS, Aronow W. Cardiac Complications of Cancer Therapy: Pathophysiology, Identification, Prevention, Treatment, and Future Directions. *Curr Cardiol Rep.* 2017 May;19(5):36.
- Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res.* 1989 Jun;64(6):1041–50.
- Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T, Selman C, Julian D, et al. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Lett.* 2004 Nov 19;577(3):483–90.
- Japundzic N, Grichois ML, Zitoun P, Laude D, Elghozi JL. Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. *J Auton Nerv Syst.* 1990 Jun;30(2):91–100.
- Japundzić-Zigon N, Milutinović S, Jovanović A. Effects of nonpeptide and selective V1 and V2 antagonists on blood pressure short-term variability in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 2004 May;95(1):47–55.
- Japundzic-Zigon N. Effects of nonpeptide V1a and V2 antagonists on blood pressure fast oscillations in conscious rats. *Clin Exp Hypertens.* 2001 May;23(4):277–92.
- Japundzic-Zigon N. Physiological mechanisms in regulation of blood pressure fast frequency variations. *Clin Exp Hypertens.* 1998 May;20(4):359–88.
- Jensen RA, Acton EM, Peters JH. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: comparison of electrocardiogram, transmembrane potential, and structural effects. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984 Jan;6(1):186–200.
- Kaye S, Merry S. Tumour cell resistance to anthracyclines--a review. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1985;14(2):96–103.
- Keung EC, Toll L, Ellis M, Jensen RA. L-type cardiac calcium channels in doxorubicin cardiomyopathy in rats morphological, biochemical, and functional correlations. *J Clin Invest.* 1991 Jun;87(6):2108–13.

- Kosić M, Nešić Z, Glumac S, Vasić M, Pajović V, Savić B, et al. Paroxetine mitigates cardiac remodelling by doxorubicin and increases survival. *Biomed Pharmacother.* 2022 Jan;145:112411.
- LeWinter MM, Granzier HL. Cardiac titin and heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014 Mar;63(3):207–12.
- Li XR, Cheng XH, Zhang GN, Wang XX, Huang JM. Cardiac safety analysis of first-line chemotherapy drug pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2022 Aug 16;15(1):96.
- Li W, Fu J, Ding Y, Liu D, Jia N, Chen D, et al. Low density lipoprotein-inspired nanostructured lipid nanoparticles containing pro-doxorubicin to enhance tumor-targeted therapeutic efficiency. *Acta Biomater.* 2019 Sep 15;96:456–67.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402–8.
- Lončar-Turukalo T, Vasić M, Tasić T, Mijatović G, Glumac S, Bajić D, et al. Heart rate dynamics in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Physiol Meas.* 2015 Apr;36(4):727–39.
- Lozić M, Greenwood M, Šarenac O, Martin A, Hindmarch C, Tasić T, et al. Overexpression of oxytocin receptors in the hypothalamic PVN increases baroreceptor reflex sensitivity and buffers BP variability in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 2014 Oct;171(19):4385–98.
- Maaten L van der, van der Maaten L, Hinton G. Visualizing non-metric similarities in multiple maps. Vol. 87, *Machine Learning.* 2012. p. 33–55.
- McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Rev Esp Cardiol.* 2022 Jun;75(6):523.
- McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017 Feb;31(1):63–75.
- Menna P, Salvatorelli E, Gianni L, Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity. *Top Curr Chem.* 2008;283:21–44.
- Mihm MJ, Yu F, Weinstein DM, Reiser PJ, Bauer JA. Intracellular distribution of peroxynitrite during doxorubicin cardiomyopathy: evidence for selective impairment of myofibrillar creatine kinase. *Br J Pharmacol.* 2002 Feb;135(3):581–8.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):185–229.
- Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi G, Calafiore AM, Mancuso C, et al. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J.* 1998 May;12(7):541–52.
- Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2016 Mar;10:17–24.

- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 May;296(5):H1466–83.
- Nebigil CG, Désaubry L. Updates in Anthracycline-Mediated Cardiotoxicity. *Front Pharmacol*. 2018 Nov 12;9:1262.
- Novo G, Cadeddu C, Sucato V, Pagliaro P, Romano S, Tocchetti CG, et al. Role of biomarkers in monitoring antineoplastic cardiotoxicity. *J Cardiovasc Med*. 2016 May;17 Suppl 1 Special issue on Cardiotoxicity from Antineoplastic Drugs and Cardioprotection:e27–34.
- Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Jun;52(6):1213–25.
- Oikonomou E, Anastasiou M, Siasos G, Androulakis E, Psyrri A, Toutouzas K, et al. Cancer Therapeutics-Related Cardiovascular Complications. Mechanisms, Diagnosis and Treatment. *Curr Pharm Des*. 2018;24(37):4424–35.
- Onoda T, Sakai M, Yamada S. Careful Seeding Method based on Independent Components Analysis for k-means Clustering. Vol. 4, *Journal of Emerging Technologies in Web Intelligence*. 2012.
- Oosting J, Struijker-Boudier HA, Janssen BJ. Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats. *J Hypertens*. 1997 Apr;15(4):391–9.
- Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol*. 2007 Apr 12;117(1):6–15.
- Oz O, Eliash S, Cohen S, Akselrod S. Insight into blood-pressure control in SHR via the response to acute hemorrhage: a spectral analysis approach. *J Auton Nerv Syst*. 1995 Nov 6;55(3):146–54.
- Perazella MA. Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Jul;4(7):1275–83.
- Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ Res*. 2019 May 24;124(11):1598–617.
- Pitkin SL, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. *Br J Pharmacol*. 2010 Aug;160(7):1785–95.
- Ponchon P, Elghozi JL. Contribution of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems to short-term variability of blood pressure in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1996 Feb 15;297(1-2):61–70.
- Raj S, Franco VI, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2014 Jun;16(6):315.
- Rasmussen IM, Schou HS, Hermansen K. Cardiotoxic effects and the influence on the beta-adrenoceptor function of doxorubicin (Adriamycin) in the rat. *Pharmacol Toxicol*. 1989 Jul;65(1):69–72.
- Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother*. 2021 Jul;139:111708.

- Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure. Vol. 115, Cardiovascular Research. 2019. p. 1838–49.
- Robison TW, Giri SN. Effect of chronic administration of doxorubicin on cardiac adenylate cyclase activity in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986 Apr 29;136(2):745–52.
- Salazar-Mendiguchía J, González-Costello J, Roca J, Ariza-Solé A, Manito N, Cequier A. Anthracycline-mediated cardiomyopathy: basic molecular knowledge for the cardiologist. *Arch Cardiol Mex*. 2014 Jul;84(3):218–23.
- Santos DS dos, dos Santos DS, dos Santos Goldenberg RC. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Mechanisms to Development of Efficient Therapy. *Cardiotoxicity*. 2018.
- Šarenac O, Lozić M, Drakulić S, Bajić D, Paton JF, Murphy D, et al. Autonomic mechanisms underpinning the stress response in borderline hypertensive rats. *Exp Physiol*. 2011 Jun;96(6):574–89.
- Sarhene M, Wang Y, Wei J, Huang Y, Li M, Li L, et al. Biomarkers in heart failure: the past, current and future. *Heart Fail Rev*. 2019 Nov;24(6):867–903.
- Sawaya H, Sebag IA, Plana JC, Januzzi JL, Ky B, Tan TC, et al. Assessment of echocardiography and biomarkers for the extended prediction of cardiotoxicity in patients treated with anthracyclines, taxanes, and trastuzumab. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2012 Sep 1;5(5):596–603.
- Scheuermann JC, Boyer LA. Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *EMBO J*. 2013 Jul 3;32(13):1805–16.
- Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*. 1996 Apr;76(2):371–423.
- Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Ghigliotti G, Barisione C, Manca V, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 15;69(3):736–45.
- Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sci*. 2021 Aug 1;278:119527.
- Sun J, Wei Q, Zhou Y, Wang J, Liu Q, Xu H. A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. *BMC Syst Biol*. 2017 Oct 3;11(Suppl 5):87.
- Szabó Z, Magga J, Alakoski T, Ulvila J, Piuhola J, Vainio L, et al. Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertension*. 2014 Jun;63(6):1235–40.
- Thavendiranathan P, Grant AD, Negishi T, Plana JC, Popović ZB, Marwick TH. Reproducibility of echocardiographic techniques for sequential assessment of left ventricular ejection fraction and volumes: application to patients undergoing cancer chemotherapy. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jan 8;61(1):77–84.
- Timm KN, Tyler DJ. The Role of AMPK Activation for Cardioprotection in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020 Apr;34(2):255–69.

- Tocchetti CG, Cadeddu C, Di Lisi D, Femminò S, Madonna R, Mele D, et al. From Molecular Mechanisms to Clinical Management of Antineoplastic Drug-Induced Cardiovascular Toxicity: A Translational Overview. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Jun 20;30(18):2110–53.
- Tscheschner H, Meinhardt E, Schlegel P, Jungmann A, Lehmann LH, Müller OJ, et al. CaMKII activation participates in doxorubicin cardiotoxicity and is attenuated by moderate GRP78 overexpression. *PLoS One*. 2019 Apr 29;14(4):e0215992.
- Tubaro M, Vranckx P, Price S, Bonnefoy E, Vrints C. *The ESC Textbook of Intensive and Acute Cardiovascular Care*. Oxford University Press, USA; 2021. 1088 p.
- Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki KI, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci*. 2006 Jun;101(2):151–8.
- Vasić M, Lončar-Turukalo T, Tasić T, Matić M, Glumac S, Bajić D, et al. Cardiovascular variability and  $\beta$ -ARs gene expression at two stages of doxorubicin - Induced cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019 Jan 1;362:43–51.
- Vedam K, Nishijima Y, Druhan LJ, Khan M, Moldovan NI, Zweier JL, et al. Role of heat shock factor-1 activation in the doxorubicin-induced heart failure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jun;298(6):H1832–41.
- Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is proapoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 2002 Nov 1;367(Pt 3):729–40.
- Wang S, Leonard SS, Ye J, Ding M, Shi X. The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr(VI)-induced p53 activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Sep;279(3):C868–75.
- Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol*. 1992 Dec;19(6):670–86.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995 Nov 24;270(5240):1326–31.
- Xing M, Yan F, Yu S, Shen P. Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLoS One*. 2015 Jul 23;10(7):e0133569.
- Xu MF, Tang PL, Qian ZM, Ashraf M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. Vol. 68, *Life Sciences*. 2001. p. 889–901.
- Yamada T, Egashira N, Bando A, Nishime Y, Tonogai Y, Imuta M, et al. Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radic Biol Med*. 2012 Apr 15;52(8):1285–93.
- Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2017 Mar 16;7:44735.

**PUBLIKOVANI RADOVI PROISTEKLI KAO REZULTAT ISTRAŽIVANJA U OKVIRU  
DOKTORATA:**

Pajović V, Kováčsházi C, Kosić M, Vasić M, Đukić L, Brenner GB, Giricz Z, Bajić D, Ferdinandy P, Japundžić-Žigon N. **Phenomapping for classification of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats.** Toxicology and Applied Pharmacology 2021 Jul 15;423:115579. doi:10.1016/j.taap.2021.115579.



## BIOGRAFIJA

Vladislav Pajović je rođen 16.01.1987. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Šestu beogradsku gimnaziju završio je u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisuje 2006. godine. Diplomirao je 24. decembra 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,48/10.

Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu, na modulu Medicinska farmakologija, upisao je 2016. godine. Specijalizaciju iz Kliničke farmakologije je upisao 2018. godine. Od marta 2016. godine angažovan je kao istraživač saradnik na projektu Funkcionalna genomika hipotalamusa i medule u hipertenziji indukovanoj hroničnim stresom, III41013, pod rukovodstvom prof. dr Nine Žigon.

Od 2017. godine zaposlen je kao saradnik u nastavi na Katedri za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Reizabran je u isto zvanje 2018. godine. U zvanje asistenta na istoj katedri je izabran 2019. godine, a 2022. godine je reizabran u isto zvanje.

Odlukom veća naučnih oblasti medicinskih nauka od 07.06.2022. godine odobrena mu je teza doktorske disertacije pod naslovom: Transkriptom leve komore srca pacova sa doksorubicinskom kardiomiopatijom.

Vladislav Pajović je položio sve ispite predviđene planom i programom Doktorskih akademskih studija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za smer Medicinska farmakologija sa prosečnom ocenom 9,43/10. Glavni rezultat višegodišnjeg rada je prvo autorstvo u radu objavljenom 2021. godine u istaknutom međunarodnom časopisu (M21) - *Toxicology and Applied Pharmacology* pod nazivom: "Phenomapping for classification of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats".

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Владислав Пајовић**

Број индекса: **5079/2016**

### Изјављујем

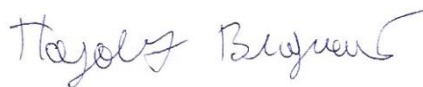
да је докторска дисертација под насловом

### **ТРАНСКРИПТОМ ЛЕВЕ КОМОРЕ СРЦА ПАЦОВА СА ДОКСОРУБИЦИНСКОМ КАРДИОМИОПАТИЈОМ**

- 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.

У Београду, 05.04.2023.

**Потпис аутора**



---

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: **Владислав Пајовић**

Број индекса: **5079/2016**

Студијски програм: **Докторске академске студије, Медицинска фармакологија**

Наслов рада: **ТРАНСКРИПТОМ ЛЕВЕ КОМОРЕ СРЦА ПАЦОВА СА ДОКСОРУБИЦИНСКОМ КАРДИОМИОПАТИЈОМ**

Ментор: **проф. др Нина Жигон**

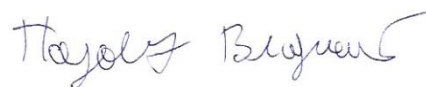
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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.

У Београду, 05.04.2023

**Потпис аутора**



---

## Изјава о коришћењу

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

### **ТРАНСКРИПТОМ ЛЕВЕ КОМОРЕ СРЦА ПАЦОВА СА ДОКСОРУБИЦИНСКОМ КАРДИОМИОПАТИЈОМ**

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)

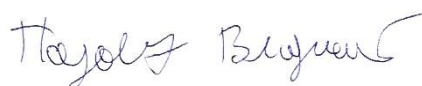
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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).

У Београду, 05.04.2023

Потпис аутора



---