

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.03.2023. godine, broj 14/XIII-3/3-BII, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Transkriptom leve komore srca pacova sa doksorubicinskom kardiomiopatijom“

kandidata dr Vladislava Pajovića, zaposlenog na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Nina Žigon.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

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

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Vladislava Pajovića napisana je na ukupno 68 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 7 tabela, 4 figure i 24 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i 3 priloga (Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i Izjava o korišćenju).

U **uvodu** je opisana hemijska struktura doksorubicina, mehanizmi antitumorskog dejstva i toksičnost doksorubicina, pre svega njegovo najteže neželjeno dejstvo – doksorubicinska kardiomiopatija. Opisani su molekularni mehanizmi nastanka, dijagnoza, prevencija i terapija doksorubicinske kardiomiopatije.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od mapiranja fenotipa kardiomiopatije izazvane doksorubicinom na osnovu ehokardiografskih, biohemijskih i autonomnih karakteristika metodom mašinskog učenja bez nadzora. Zatim određivanje transkriptoma leve komore srca koja ukazuje na promene genotipa leve komore kod kardiomiopatije izazvane doksorubicinom, te povezivanje dobijenih fenotipova i genotipa kardiomiopatije izazvane doksorubicinom.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o eksperimentalnoj studiji koja je sprovedena na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Univerziteta u Beogradu. Korišćene metode u ovom istraživanju su jasno opisane. Izvođenje eksperimenata odobreno je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta za rad sa oglednim životinjama i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (broj rešenja: 323-07-12661/2021-05). Eksperimentalni protokol je podrazumevao primenu doksorubicinskog modela kardiotoksičnosti, procenu preživljavanja i opšte toksičnosti eksperimentalnih životinja, kao i ehokardiografsku procenu srčane morfologije i funkcije, te registrovanje kardiovaskularnih parametara. Detaljno je opisana hirurška implantacija transmitera radi kontinuiranog merenja kardiovaskularnih parametara, ehokardiografija, patohistološka analiza, histomorfometrija i imunohistohemija, molekularno biološke tehnike neophodne za merenje ekspresije gena, odnosno analizu transkriptoma leve komore srca pacova i određivanje fenotipa i genotipa doksorubicinske kardiomiopatije metodom mašinskog učenja. U ovom poglavlju je navedena lista korišćenih supstanci, lista prajmera korišćenih u istraživanju i statistička analiza dobijenih podataka.

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

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

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 123 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Transkriptom leve komore srca pacova sa doksorubicinskom kardiomiopatijom”, autora Vladislava Pajovića, konstatujem da utvrđeno

podudaranje teksta iznosi 19%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je tzv. opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koja su proistekla iz njegove disertacije, što je u skladu članom sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Takođe, ovaj stepen podudarnosti posledica je slične metodologije doktorskih disertacija proisteklih iz iste laboratorije (korišćeni isti ultrazvučni i RT-qPCR aparat, mereni isti ultrazvučni parametri, korišćene iste hemijske supstance i prajmeri), kao i rezultat sličnih protokola za razvoj eksperimentalnog modela doksorubicinske kardiomiopatije ranijih istraživanja.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Najbitniji 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 (ejekciona frakcija leve komore) i statistički značajnim povećanjem NT-proBNP-a (N terminalni promoždani natriuretski peptid), koja se može klasifikovati kao sistolna srčana insuficijencija - HFrEF (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 - HFpEF (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 (teški lanac miozina 6), MYH6/MYH7 (teški lanac miozina 6/teški lanac miozina 7), APLN (apelin), APLNR (apelinski receptor), COL1A1 (kolagen), TTN (titin) i MYBPC3 (srčani miozin-vezujući protein C) i porasta ekspresije gena za MYH7 i CTFG (faktor rasta vezivnog tkiva) čime je pokazano da ovi geni ne utiču, odnosno nisu povezani sa vrstom fenotipa.

U grupi DOX Phe 1 je zabeležen je statistički značajan pad LVEF, frakcionalnog skraćenja 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. U grupi DOX Phe 2 životinje su imale očuvanu LVEF, a primećujemo i očuvane vrednosti funkcionalnog skraćenja 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

Vrednosti SBP (sistolni krvni pritisak) i DBP (dijastolni krvni pritisak) 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. 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.

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.

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. Kod životinja u DOX Phe 2 grupi je primećeno uvećanje kardiomiocita, praćeno karakterističnim duplim jedrima i grupisanjem jedara, odnosno nekrozom sa kontrakcijskim prugama. 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. Histološkom analizom bubrežnog tkiva su uočene tubularne i glomerularne dilatacije, kao znaci blage nefrotoksičnosti, kod životinja u obe eksperimentalne grupe.

Rezultati kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu su pokazali statistički značajan pad ekspresije gena za COL1A1, MYH6, MYH6/MYH7, MYBPC3, APLN, APLNR u grupi DOX Phe 1 u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno statistički značajan porast ekspresije CTGF u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu. Primećen je statistički značajan pad ekspresije gena za MYH6, MYH6/MYH7, 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.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

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 (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).

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). Biohemijske analize su pokazale da nije došlo do značajnijeg oštećenja bubrega i tkiva jetre, što se i nije očekivalo u ovakvom modelu doksorubicinske kardiotoksičnosti (Perazella, 2009).

Zabeležen je visok mortalitet kao posledica akutne toksičnosti doksorubicinom, a 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).

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).

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. S druge strane, 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).

Pokazano je da genska ekspresija APLN i APLNR smanjena kod ljudi sa srčanom infucijencijom (Pitkin i sar., 2010), kao i kod miševa tretiranih doksorubicinom (Hamada i sar., 2015). Ovo korelira sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju_gde je zabeležen visoko statistički značajan pad ekspresije APLN i APLNR kod jedinki u obe eksperimentalne grupe u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod ljudi je zabeležena promena genske ekspresije titina u mnogim kardiovaskularnim bolestima (LeWinter i Granzier, 2014), što je takođe zabeleženo u ovom istraživanju gde je statistički značajno smanjena ekspresija TTN u grupi DOX Phe 2.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Vladislav Pajović, Csenger Kovácsházi, Marija Kosić, Marko Vasić, Ljiljana Đukić, Gábor B Brenner, Zoltán Giricz, Dragana Bajić, Péter Ferdinandy, Nina Japundžić-Žigon.
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. M21 IF:4.46

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Transkriptom leve komore srca pacova sa doksorubicinskom kardiomiopatijom” dr Vladislava Pajovića, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju genetskih mehanizama, odnosno promeni genske ekspresije, kod pacova sa kardiomiopatijom indukovanom doksorubicinom. Ovaj rad prepoznaje da višestruki mehanizmi kardiotoksičnosti mogu da dovedu do različitih kliničkih prezentacija srčane slabosti izazvane dokorubicinom koje karakterišu promene ekspresije gena leve komore srca pacova i ukazati na nova ciljna mesta za delovanje lekova.

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

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

U Beogradu, 03. 04. 2023. god.

Članovi Komisije:

doc. dr Dragana Srebro

doc. dr Ljiljana Đukić

prof. dr Dragana Bajić

Mentor:

prof. dr Nina Žigon
