

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-11320/3-3, од 29. 10. 2014. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата мр Душка Корњаче, под називом:

„Ефекти хиперхомоцистеинемије на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H₂S и CO)“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Проф. др Драган Ђурић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Физиологија, члан.

2. Извештај комисије о подобности теме

2.1. Кратка биографија кандидата

Мр Душко Корњача је рођен 13.08.1960. године у Чајничу (Република Српска), где је завршио основну и средњу школу.

Медицински факултет је уписао школске 1981/82 године у Крагујевцу, а дипломирао у Београду фебруара 1987. године.

Специјализацију из Интерне медицине је завршио 2005. године, а субспецијализацију из гастроентерологије и хепатологије 2010. године у Новом Саду.

У периоду од 1987-2007 године је радио у ДЗ "Васа Пелагић" у Чајничу, док је у периоду од 2007 – 2009 радио у Специјалној болници за интерне болести "Вита" у Новом Саду.

Од 2009. године је запослен у ФИП–комерцу д.о.о Београд, Пословница Нови Сад.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Ефекти хиперхомоцистеинемije на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H₂S и CO)“

Предмет: Испитивање ефеката хиперхомоцистеинемije на редокс статус, као и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова, са посебним освртом на значај сигналних гасовитих молекула у оствареном утицају.

Хипотеза: Акутна и субхронична хиперхомоцистеинемija могу повећати липидну пероксидацију и смањити активност антиоксидационог система заштите. Поред тога очекује се да повишене вредности хомоцистеина и хомоцистеин тиолактона мењају активност ензима ацетилхолинестеразе AchE у срчаном мишићу пацова, самостално и/или у садејству са различитим гасотрансмитерима од којих су најзначајнији NO, H₂S и CO.

2.3. Подобност кандидата

Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у рецензираном часопису, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Kornjaca D, Zivkovic V, Barudzic N, Jakovljevic V, Djuric D. The effects of vibroacoustically induced microvibrations on arterial blood pressure and oxidative stress in rats. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15(2): 83-88 **M52=1.5 бод**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

У последње две деценије се све већа пажња поклања непротеинској аминокиселини хомоцистеину као новом фактору ризика за развој кардиовасуларних болести (КВБ). Бројна истраживања показују висок степен повезаности између хиперхомоцистеинемije и повишеног ризика за настанак неког од ових болести. Управо на темељу тих сазнања, хомоцистеин се сматра новим и независним фактором ризика за настанак атеросклерозе.

Механизми којима хомоцистеин изазива поремећаје кардиоваскуларне хомеостазе су још увек недовољно изучени и непрецизно дефинисани. С обзиром на постојање слободне SH групе, хомоцистеин се сматра вероватно једном од најреактивнијих аминокиселина, што му омогућава да између осталог, врло лако може да оксидује и продукује реактивне врсте кисеоника. На тај начин индуковање оксидационог стреса представља мајоритетни механизам којим хомоцистеин директно оштећује васкуларни ендотел.

Ипак, оксидациони стрес који индукује хомоцистеин не мора да потенцира атерогенезу искључиво путем аутооксидације. Бројне *in vivo* студије, користећи васкуларна ткива, сугеришу да хиперхомоцистеинемija доводи до поремећаја васкуларне релаксације, стварањем супероксид анјон радикала (O₂⁻). O₂⁻ потом реагује са ендотелним азот моноксидом (NO), резултирајући у формирању пероксинитрита (ONOO⁻), што у крајњем, поред целуларних оштећења, ремети адекватну вазодилатацију. Поред тога, хомоцистеин може такође умањити и антиоксидациони потенцијал ендотелних ћелија. Недавна истраживања су показала да ендотелне ћелије третиране хомоцистеином имају снижену активност глутатион преоксидазе (GPx) што битно редукује њихов антиоксидациони капацитет

Са друге стране, ацетилхолинестераза (ацетилхолин ацетилхидролаза, AchE) представља серумску протеазу која хидролизује неуротрансмитер ацетилхолин. AchE се доминантно налази у неуромишићној спојници и холинергичким синапсама у мозгу где има превасходну сврху завршавања синаптичке неуротрансмисије. Поред тога у новије

време је све више претпоставки да гасовити сигнални молекули (азот моноксид (NO), угљен моноксид (CO) и водоник сулфид (H₂S)), такође могу имати значајну улогу у ефектима хомоцистеина на функцију миокарда и коронарну циркулацију.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Ово истраживање би могло да донесе нове и до сада мало познате податке о активности AchE унутар срца и кардиоваскуларног система уопште. Такође, студија би могла да помогне у разумевању ефеката хиперхомоцистеинемije на оксидациони статус и продукцију гасотрансмитера (NO, H₂S и CO) у кардиоваскуларном систему. Имајући у виду све већи значај одређивања вредности хомоцистеина (као предиктора за развој КВБ) у клиничкој пракси, ова студија може да буде од интереса, поред осталог и као одлична основа за спровођење клиничких студија са овом медицинском тематиком.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљ истраживања је да се испитају ефекти акутне (индуковане ДЛ-хомоцистеином и ДЛ-хомоцистеин тиолактоном) и субхроничне хиперхомоцистеинемije (индуковане ДЛ-хомоцистеином) на концентрацију прооксидативних и активност антиоксидативних маркера у плазми пацова, као и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

Главна хипотеза студије је да повишене вредности хомоцистеина и хомоцистеин тиолактона повећавају липидну пероксидацију (МДА) и/или узорукују смањену активност антиоксидационих ензима заштите (SOD, CAT и GPx) као и мењају активност AchE у срчаном мишићу пацова, самостално и/или у садејству са различитим гасотрансмитерима од којих су најзначајнији NO, H₂S и CO.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Постоје назнаке да AchE може да има улогу у одржавању хомеостазе срца и кардиоваскуларног систем уопште. У том смислу, обзиром на доказано повећање активности AchE унутар централног нервног система у условима хиперхомоцистеинемije, поставља се претпоставка да ли хомоцистеин може и у срчаном мишићу да регулише активност овог ензима.

Повезаност метаболизма хомоцистеина, слободних радикала и гасотрансмитера у оквиру кардиоваскуларног система је још веома слабо истражена. Такође, врло је интересантно да у доступној литератури нема података о активности и евентуалној улози AchE у функцији срца, поготово у условима хиперхомоцистеинемije.

Имајући у виду клинички значај појаве хиперхомоцистеинемije, од интереса је да се испита утицај хомоцистеина и његовог тиолактон метаболита на оксидативни стрес, продукцију гасотрансмитера, као и активност ацетилхолинестеразе у срцу пацова.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Студија припада експерименталним истраживањима *in vitro*.

Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 140 пацова, Вистар албино соја, мушког пола, старости 10 недеља и телесне масе 250 ± 30 г. Животиње би се чувале у строго контролисаним условима (температура ваздуха 22 ± 1 °С, релативна влажност ваздуха 50%, циклус светлост:тама 12:12 часова, са почетком светлог периода у 9 часова), и са слободним приступом води и стандардној храни. Све експерименталне процедуре ће се радити у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и принципима етичности.

Етичка комисија Медицинског факултета у Београду је на својој седници одржаној 21. 02. 2013. године размотрила етичност процедура које су планиране да се спроведу у оквиру овог истраживања и дало је сагласност за извођење истих одлуком бр. 5287/1.

Материјал и методе

У студији је предложено једанаест (11) група (10 животиња у групи): 1) контролна група - апликација физиолошког раствора (1 ml 0.9% NaCl, pH 7.4, i.p.), 2) експериментална група - апликација ДЛ-хомоцистеин (8 mmol/kg тм, i.p.), 3) експериментална група - апликација ДЛ-хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм, i.p.), 4) експериментална група - апликација L-NAME (10 mg/kg тм, i.p.), 5) експериментална група - апликација цинкпротопорфирина IX (30 μ mol/kg тм, i.p.), 6) експериментална група – апликација ДЛ-пропаргилглицина (50 mg/kg тм, i.p.), 7) експериментална група – коапликација ДЛ-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и L-NAME (10 mg/kg тм, i.p.), 8) експериментална група – коапликација ДЛ-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и цинкпротопорфирина IX (30 μ mol/kg тм, i.p.), 9) експериментална група – коапликација ДЛ-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и ДЛ-пропаргилглицина (50 mg/kg тм, i.p.), 10) експериментална група – апликација физиолошког раствора (0.45 μ mol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана), 11) експериментална група – апликација ДЛ-хомоцистеина (0.45 μ mol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана).

У циљу изазивања акутне хиперхомоцистеинемije поменути експерименталним групама ће се интраперитонеално администрирати једна доза ДЛ-хомоцистеина (8 mmol/kg тм) и ДЛ-хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм). Шездесет (60) минута након апликације, животиње би се жртвовале ради прикупљања узорака крви (за мерење маркера оксидационог стреса) и узимања ткива срца у чијем хомогенату би се одређивала активност AchE. Субхронична хиперхомоцистеинемija ће бити изазвана апликацијом ДЛ-хомоцистеина (0.45 μ mol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана).

Специфична активност AchE у ткивном хомогенату срца би се одређивала *in vitro* методом по Ellman-у. Метода се заснива на реакцији бојеног реагенса (5,5-дитио-бис-2-нитробензоева киселина, ДТНБ) са производом хидролизе тиохолинског супстрата, ацетилхолин-јодида (AchI), тиохолином, при чему настаје једињење 5-тио-2-нитробензоат-жуте боје, чији је интезитет сразмеран специфичној активности AchE.

Одговарајућа заперимина хомогената испитиваног ткива се разблажује адекватном запремином фосфатног пуфера рН=8 (40 μ l хомогената ткива срца у 580 μ l фосфатног пуфера) и преинкубирана на температури 37 °С, 10 минута. Након преинкубације се додаје 20 μ l бојеног реагенса ДТНБ и 10 μ l супстрата AchE, сукцесивно, и припремљена смеша се инкубира на температури 37 °С, 5 минута. Ензимска реакција се зауставља додавањем 50 μ l натријум-додецил-сулфата (СДС). Промена апсорбанце се мери колориметријски на 420 nm таласне дужине. Активност AchE се изражава као $\Delta A/\text{мин} \times \text{mg}$ протеина.

У прикупљеним узорцима крви спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи параметри оксидационог стреса: ниво малонилдиалдехида (МДА) као индикатора липидне пероксидације, активност каталазе (CAT), супероксид дизмутазе (SOD) и глутатион пероксидазе (GPx). Наведени параметри оксидационог стреса би се одређивали у контролним условима, затим у акутној серији експеримената, и након субхроничне апликације ДЛ-хомоцистеина. У групи која ће бити подвргнута субхроничној апликацији ДЛ-хомоцистеина би се поред поменутих маркера мерила и концентрација укупног хомоцистеина у плазми, и упоредила са контролним условима.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да повишене вредности хомоцистеина и хомоцистеин тиолактона повећавају липидну пероксидацију и/или узорукују смањену активност антиоксидационих ензима заштите као и мењају активност AchE у срчаном мишићу пацова, самостално и/или у садејству са различитим гасотрансмитерима од којих су најзначајнији NO, H₂S и CO. Добијени резултати о присуству и активности ензима AchE у срцу могу бити важни у бољем и комплетнијем разумевању функције миокарда. Поред тога резултати који се тичу утицаја хиперхомоцистеинемije на оксидациони статус и продукцију гасотрансмитера у кардиоваскуларном систему могу бити значајни за јасније разумевање ових комплексних молекуларних интеракција. Сви поменути налази могу бити утолико вреднији уколико се узме у обзир ефекат хомоцистеина (као новог маркера за настанак различитих патофизиолошких процеса у кардиоваскуларном систему), на активност поменутог ензима у срцу.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Повезаност метаболизма хомоцистеина, слободних радикала и гасотрансмитера у оквиру кардиоваскуларног система је још веома слабо истражена. Имајући у виду клинички значај појаве хиперхомоцистеинемije, главни циљ ове студије је да испита утицај хомоцистеина и његовог тиолактон метаболита на оксидативни стрес, продукцију гасотрансмитера, као и активност ацетилхолинестеразе у срцу пацова. Планирано истраживање би било подељено у једанаест група. У узорима крви би се спектрофотометријски мерила концентрација про-оксидационих и активност антиоксидационих маркера, док би се у хомогенату ткива срца одређивала активност AchE. Ово истраживање би могло да донесе нове и до сада мало познате податке о ефектима хиперхомоцистеинемije на оксидациони статус и продукцију гасотрансмитера (NO, H₂S и CO) у кардиоваскуларном систему. Поред тога, добијени резултати о присуству и активности ензима AchE у срцу, могу бити важни у бољем и комплетнијем разумевању функције миокарда.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Експериментална физиологија.

2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Проф. др Драган Ђурић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Физиологија, члан.

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове мр Душка Корњаче комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ донесе нове и до сада мало познате податке о активности AchE унутар кардиоваскуларног система као и о ефекатима хиперхомоцистеинемije на оксидациони статус и продукцију гасотрансмитера у поменутом систему.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза мр Душка Корњаче бити од великог научног и практичног значаја у смислу разумевања комплексних молекуларних интеракција које учествују у настанку кључних (пато)физиолошких процеса у кардиоваскуларном систему.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата мр Душка Корњаче под називом „**Ефекти хиперхомоцистеинемije на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H₂S и CO)**“ и одобри њену израду.

Проф. др Владимир Јаковљевић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија

Доц. др Владимир Живковић, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија

Проф. др Драган Ђурић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Физиологија

У Крагујевцу, 11. 11. 2014.