

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-10274/3-4, од 28.11.2012. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Владимира Живковића, под називом:

„Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Naranjan Dhalla**, председник, редовни професор, Институт за кардиоваскуларна истраживања, Институт за физиологију, Медицински факултет, Винипег, Канада
2. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Olga Pechanova**, члан, редовни професор, Институт за нормалну и патолошку физиологију, Словачка Академија Наука, Братислава
4. **Проф. др Гвозден Росић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
5. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

2. Извештај комисије о подобности теме

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Владимир Живковић је рођен 26. 12. 1984. године у Крагујевцу. Завршио основну школу „Мирко Јовановић“ као носилац дипломе "Вук Караџић" и Прву крагујевачку гимназију. Уписао Медицински факултет у Крагујевцу 2003. године, завршио 23. 07. 2010. године са просечном оценом 8.65. Током студија од 2005. године је укључен у научно-истраживачки рад у оквиру лабораторије за Физиологију, Медицинског факултета у Крагујевцу, којом руководи Проф. др Владимир Јаковљевић. Од 2009. године сарађује и у наставном процесу, посебно на студијском програму ФАРМАЦИЈА. Од децембра 2010. године ради као сарадник у настави за ужу научну област Физиологија на свим студијским програмима на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Учествовао је на више научних конгреса у земљи и иностранству. Добитник награде за најбоље презентован рад на сесији Физиологија на 48. Конгресу студената медицине, стоматологије и фармације, Копаоник 2007 године. Добитник Young Investigator Travel Award на *Winnipeg Heart International Conference, Winnipeg, Canada, 12-15.10.2011.* Учесник пројекта

Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије из области основних истраживања **“Ефекти хомоцистеина и хомоцистеину сродних супстанци на кардиоваскуларни систем: улога гасних трансмитера (NO, CO и H₂S)”** (под шифром ОИ175043), као и билатералног пројекта у оквиру сарадње Србија-Словачка **“Ефекат инхибиције ренинских и (про)ренинских рецептора на кардиоваскуларни систем са посебним фокусом на гасне трансмитере”** (под шифром 680-00-140/2012-09/07). У склопу овог пројекта, добитник је стипендије Словачке владе за студијски боравак у Словачкој на Институту за нормалну и патолошку физиологију Словачке академије наука, коју треба да реализује почев од 01. 02. 2013. године у трајању од 6 (шест) месеци. Студент је треће године докторских академских студија, изборно подручје – Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положио је све програмом предвиђене испите на прве две године докторских академских студија са просеком 8.60, као и усмени докторантски испит са оценом 10 (десет). Говори енглески језик, служи се француским језиком и познаје рад на рачунарима. У својој листи референци до сада има 48 библиографских јединица, од чега 12 (дванаест) радова објављених у целини у часописима са SCI листе.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса“

Предмет: Евалуација ефеката акутне администрације хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могуће механизме добијених ефеката

Хипотеза: Основна хипотеза студије је да акутна апликација хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину, може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова. Такође, додатна хипотеза је да је овај ефекат у директној вези са гасним трансмитерима и оксидационим стресом.

2.3. Подобност кандидата

Кандидату је објављен један рад у целини у часопису са CC/SCI листе, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N, Djuric D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 2012 Nov; 370(1-2): 59-67 **M23 – 3 бода**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Дуго времена се веровало да је хиперхомоцистеинемија независан фактор ризика за атеросклерозу, међутим многобројне клиничке студије нису са сигурношћу потврдиле овакав закључак. Истовремено су утврђени многобројни штетни ефекти хомоцистеина, који су између осталог јасно повезани са оксидационим стресом, као и са „хомоцистеинилизацијом протеина“ (нежељено формирање веза између СН група аминокиселина). Ранија истраживања су показала да је хиперхомоцистеинемија удружена са штетним ремоделовањем и слабошћу срчаног мишића. Осим тога, постоје подаци који указују да акутно апликовани хомоцистеин доводи до смањења контракције срчаног

мишића, али и коронарне вазодилатације: ефеката у којима не учествују NO, али делимично учествује аденозин.

Гасни трансмитер NO (продукт аминокиселине L-аргинина) је познат као секундарни гласник у многим хомеостатским процесима, али је, између осталог, повезан и са дисфункцијом ендотела и ендокарда. Ендотелна и ендокардна дисфункција се јављају услед деловања фактора ризика (укључујући и хомоцистеин), али и као резултат дисбаланса у продукцији/разградњи NO и O₂⁻. Терапијске стратегије које имају циљ да повећају продукцију NO (и/или смање његову разградњу) и на друге начине побољшају функције ендотела, односно да смање продукцију O₂⁻ (и/или повећају његову разградњу) представљају рационалан основ за истраживање на експерименталним моделима, као и за примену код људи.

Гасни трансмитер H₂S је у физиолошком смислу секундарни гласник, који се ствара у ћелијама сисара у метаболизму аминокиселине L-цистеина. Његова токсичност је описана још 1713. године. Показано је да стимулише АТФ-зависне калијумске канале у васкуларним глатким мишићним ћелијама, остварујући функцију ендогеног отварача ових канала и делујући протективно у исхемичном миокарду и септичком шоку. Значајне количине H₂S стварају се у мозгу, активношћу ензима цистатион бета синтазе (CBS), или у кардиоваскуларном систему и глаткој мускулатури, активношћу ензима цистатион гама лиаза (CSE), где синергистички са NO доводи до релаксације глатке мускулатуре аорте пацова, вазодилатације и хипотензије, такође делујући антиоксидантно и антипролиферативно. Ови ефекти су значајни за одржавање вредности артеријског крвног притиска и структуре крвних судова у физиолошким границама. Смањена продукција H₂S је доказана у глаткој мускулатури спонтано хипертензивних пацова, као и у експерименталној хипертензији индукованој блокадом ензима NO синтазе. Дефицит H₂S доприноси атерогенези код неких пацијената са хиперхомоцистеинемом. Описано је да H₂S инхибира оштећење срчаног мишића насталог акутном апликацијом хомоцистеина код пацова (интересантно је да и једна и друга супстанца садрже сумпор) мењајући активност респираторног ланца у митохондријама миокарда (ензими: сукцинат дехидрогеназа, цитохром оксидаза и манган супероксид дисмутаза). У регулацији активности H₂S укључени су S-аденозил L метионин (SAM) и пиридоксал фосфат (витамин Б6), који су такође значајни регулатори метаболизма хомоцистеина.

Гасни трансмитер CO се такође ендогено синтетише дејством специфичног ензима хем оксигеназе (HO-1), и укључен је у одржавање структуре и функције кардиоваскуларног система, али и у патофизиологији кардиоваскуларних обољења, заједно са NO и H₂S. Сматра се да HO-1 има позитивне улоге у хомеостази кардиоваскуларног система, имајући у виду продукцију антиоксидантних и вазомодуларних супстанци које настају активацијом овог ензима. Описано је да модулација кључних ензима у синтези NO и H₂S значајно мења експресију HO-1 и продукцију CO.

Улога оксидационог стреса у патогенези преко двеста акутних и хроничних болести (међу њима и многих кардиоваскуларних обољења) је до сада већ добро позната. Ипак међусобна интеракција оксидационог стреса и гасних трансмитера у условима хиперхомоцистеинемје као и могући ефекти на кардиоваскуларни систем нису скоро уопште испитивани.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Имајући у виду чињеницу да је улога оксидационог стреса у патогенези преко двеста акутних и хроничних болести (међу њима и многих кардиоваскуларних обољења) до сада већ добро позната, као и да до сада међусобна интеракција оксидационог стреса и гасних трансмитера у условима хиперхомоцистеинемije као и могући ефекти на кардиоваскуларни систем нису скоро уопште испитивани, ова студија се може сматрати пионирском и у светским размерама. Наиме, према доступним подацима, у нашој земљи није рађена слична студија, а, имајући у виду и све детаље дизајна, ни у свету.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљ истраживања је да се испитају ефекти акутне администрације хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и могуће механизме добијених ефеката. Такође, специфични циљеви истраживања су: испитати ефекте гасних сигналних молекула NO, H₂S и CO, у одржавању нормалне функције и структуре кардиоваскуларног система и испитати учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита (NO₂-), супероксид анјон радикала (O₂-), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H₂O₂) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију.

Основна хипотеза студије је да акутна апликација хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину, може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова. Такође, додатна хипотеза је да је овај ефекат у директној вези са гасним трансмитерима и оксидационим стресом.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У многим досадашњим истраживањима су утврђени многобројни штетни ефекти хомоцистеина, који су између осталог јасно повезани са оксидационим стресом, као и са „хомоцистеинизацијом протеина“ (нежељено формирање веза између СН група аминокиселина). Ранија истраживања су показала да је хиперхомоцистеинемija удружена са штетним ремоделовањем и слабошћу срчаног мишића (2-5). Осим тога, постоје подаци који указују да акутно апликовани хомоцистеин доводи до смањења контракције срчаног мишића, али и коронарне вазодилатације: ефеката у којима не учествују NO, али делимично учествује аденозин.

С друге стране, гасни трансмитери: NO, CO, H₂S су верификовани као ендогени вазодилатори и предмет су актуелних интензивних истраживања. Њихова улога у кардиоваскуларном систему је дефинитивно потврђена као моћних вазоактивних супстанци. Међутим, нико до сада није покушао да успостави корелацију између учешћа ових медијатора у васкуларним ефектима хомоцистеина и његових метаболита, а поготову не да их доведе у корелацију са оксидационим стресом.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Експериментална студија

Експериментална популација

Планирано истраживање би обухватило 240 пацова (Вистар албино сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 50 г) којима би се изоловало срце и перфундовало методом ретроградне перфузије по Лангендорфу (Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O. 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/ЕЕС) и принципима етичности.

Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета Медицинских Наука Универзитета у Крагујевцу.

Материјал и методе

Истраживање ће бити подељено у шеснаест (16) експерименталних група (15 животиња у групи): 1) контролна група (перфузија комплексним Krebs-Hensenleit-овим физиолошким раствором), 2) апликација DL-хомоцистеина ($10 \mu\text{mol/l}$), 3) апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$), 4) апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$), 5) апликација N(ω)-нитро-L-аргинин метил естра (L-NAME) ($30 \mu\text{mol/l}$), 6) апликација цинкпротопорфирина IX ($10 \mu\text{mol/l}$), 7) апликација DL-пропаргилглицина ($10 \mu\text{mol/l}$), 8) ко-апликација DL-хомоцистеина ($10 \mu\text{mol/l}$) плус L-NAME ($30 \mu\text{mol/l}$), 9) ко-апликација DL-хомоцистеина ($10 \mu\text{mol/l}$) плус цинкпротопорфирина IX ($10 \mu\text{mol/l}$), 10) ко-апликација DL-хомоцистеина ($10 \mu\text{mol/l}$) плус DL-пропаргилглицина ($10 \mu\text{mol/l}$), 11) ко-апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$) плус L-NAME ($30 \mu\text{mol/l}$), 12) ко-апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$) плус цинкпротопорфирина IX ($10 \mu\text{mol/l}$), 13) ко-апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$) плус DL-пропаргилглицина ($10 \mu\text{mol/l}$), 14) ко-апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$) плус L-NAME ($30 \mu\text{mol/l}$), 15) ко-апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$) плус цинкпротопорфирина IX ($10 \mu\text{mol/l}$), 16) ко-апликација L-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида ($10 \mu\text{mol/l}$) плус DL-пропаргилглицина ($10 \mu\text{mol/l}$)

Вредност коронарног протока би се одређивала флоуметријски. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућило би се убацивање сензора (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе: а) $dp/dt \text{ max}$ - максимална стопа промене притиска у левој комори, б) $dp/dt \text{ min}$ - минимална стопа промене притиска у левој комори, в) SLVP - систолни притисак леве коморе, г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе, д) HR - срчана фреквенца и е) MBP - средњи перфузиони притисак.

Испитиване супстанце ће се апликовати континуираном перфузијом (минимално 5 мин) док се не постигне стабилни коронарни проток. У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2).

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће, после ових истраживања и анализа, моћи да се изведу закључци о бољем сагледавању ефеката хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиоваскуларни систем, што може бити од интереса имајући у виду физиолошки и клинички значај хомоцистеина. У добијеним одговорима ће се проценити допринос гасних, ендогено синтетисаних сигналних молекула NO, H₂S и CO, као и појединих параметара оксидационог стреса, односно утврдити њихов значај у кардиоваскуларној хомеостази.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Током претходне четири деценије, истраживања спроведена широм света су утврдила да хомоцистеин (Hcy), семи-есенцијална аминокиселина, представља нов потентан и независан фактор ризика за атеросклерозу. С друге стране, механизам његовог дејства у кардиоваскуларном систему није до сада прецизно разјашњен. На основу познатих улога свих гасних трансмитера у кардиоваскуларном систему, као и њихових бочних веза са метаболизмом хомоцистеина, било би од непроцењивог значаја одредити који од ових трансмитера има најважнију улогу у кардиоваскуларним ефектима хомоцистеина и његових метаболита. Такође, оксидациони стрес је врло сложен механизам прооксидативне и антиоксидативне интеракције који резултира превагом прооксидантног система са следственим оштећењем и дисфункцијом биолошких структура.

Циљ ове студије је да се утврди међусобна интеракција оксидационог стреса и гасних трансмитера у условима хиперхомоцистеинемије као и могући ефекти на кардиоваскуларни систем.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Владимир Јаковљевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, док се за коментора предлаже **Проф. др Драган Ђурић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Физиологија.

2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Naranjan Dhalla**, председник, редовни професор, Институт за кардиоваскуларна истраживања, Институт за физиологију, Медицински факултет, Винипег, Канада
2. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Olga Pechanova**, члан, редовни професор, Институт за нормалну и патолошку физиологију, Словачка Академија Наука, Братислава
4. **Проф. др Гвозден Росић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
5. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове Др Владимира Живковића 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 да развије нов приступ изучавању ефеката хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину у кардиоваскуларном систему.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза Др Владимира Живковића бити од великог научног и практичног значаја у смислу тумачења ефеката хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину у кардиоваскуларном систему, са посебним освртом на улогу гасних трансмитера и оксидационог стреса.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Др Владимира Живковића под називом „Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса“ и одобри њену израду.

Проф. др Naranjan Dhalla, председник, редовни професор, Институт за кардиоваскуларна истраживања, Институт за физиологију, Медицински факултет, Винипег, Канада

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

Проф. др Olga Rechanova, члан, редовни професор, Институт за нормалну и патолошку физиологију, Словачка Академија Наука, Братислава

Проф. др Гвозден Росић, члан, редовни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

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

У Крагујевцу, 18. 01. 2013.

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES
KRAGUJEVAC**

1. Decision of the Faculty Board

In accordance with the decision No 01-10274/3-4 of 28 November 2012 made by the Board for Teaching and Research of the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac the Evaluation Committee undertaking the approval and assessment of candidate MD Vladimir Živković's PhD thesis entitled

**“EFFECTS OF HOMOCYSTEINE AND HOMOCYSTEINE-RELATED
COMPOUNDS ON CARDIODYNAMICS AND CORONARY FLOW IN ISOLATED
RAT HEART: THE ROLE OF GASOTRANSMITTERS AND OXIDATIVE STRESS”**

has been appointed and consists of the following members:

1. **Prof. Naranjan S. Dhalla, PhD**, Chairman, Distinguished Professor, Institute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, Faculty of Medicine, Winnipeg, Canada
2. **Prof. Dragan Đurić, MD, PhD**, member, Full Professor of Physiology, School of Medicine, University of Belgrade
3. **RNDr Olga Pechanova, DSc.**, member, Full Professor, Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava
4. **Prof. Gvozden Rosić, MD, PhD**, member, Full Professor of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
5. **Prof. Vladimir Jakovljević, MD, PhD**, member, Associate Professor of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

2. The Report on the Dissertation

2.1. Short Biography of the Candidate

Vladimir Živković, MD, was born 26 December 1984 in Kragujevac. He finished primary school "Mirko Jovanović" as a holder of the special diploma "Vuk Karadžić" and High School "Prva kragujevačka gimnazija". He enrolled in the Faculty of Medicine in Kragujevac in 2003, and graduated from the Faculty on 23 July 2010 with GPA of 8.65. During his study, since 2005 he has been involved in scientific research in the laboratory of Physiology, of the Faculty of Medicine in Kragujevac, conducted by PhD Vladimir Jakovljević. Beginning 2009 he participated in the teaching process, especially in the degree program in Pharmacy. Since

December 2010 he has worked as a Teaching Assistant for the scientific field of Physiology at all degree programs at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac. He participated in many scientific conferences at home and abroad. He was awarded for the best paper presented at the session of Physiology at 48th Congress of students of Medicine, Dentistry and Pharmacy, Kopaonik 2007. He also received *Young Investigator & Travel Award* attending the *Winnipeg Heart International Conference*, Winnipeg, Canada, 12-15 October 2011. He participates in the project **EFFECTS OF HOMOCYSTEINE AND HOMOCYSTEINE-RELATED COMPOUNDS ON CARDIOVASCULAR SYSTEM: THE ROLE OF GASOTRANSMITTERS (NO, CO and H₂S)** (Grant OI 175043) supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia in the field of basic research, and in the project **EFFECT OF RENIN AND PRORENIN RECEPTOR INHIBITION ON CARDIOVASCULAR SYSTEM WITH EMPHASIS ON GASOTRANSMITTERS** (Code: 680-00-140/2012-09/07). Within the last mentioned project he has been granted a scholarship for a 6-month study at the Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, which is supposed to begin 1 February 2013 and provided by the Slovak government. Vladimir Živković is a III-year doctoral student, majoring Experimental and Applied Physiology and Sports Medicine. He passed all the examinations prescribed for the first two years of doctoral studies with GPA 8.60, and doctoral oral exam with a score of 10 (ten). He is fluent in English, has some knowledge of French and is computer-literate. He has published 48 units, 12 of which were full-length papers published in journals on SCI Journal List.

2.2. Title, subject and hypothesis of the doctoral dissertation

Title: "The Effects of homocysteine and homocysteine-related compounds on cardiodynamics and coronary flow in isolated rat heart: the role of gasotransmitters and oxidative stress"

Subject: Evaluation of the effects of acute administration of homocysteine and homocysteine-related compounds on the cardiac muscle and coronary circulation of the isolated rat heart, and the possible mechanisms of the effects obtained

Hypothesis: The study investigates the hypothesis that acute application of homocysteine and homocysteine-related compounds can have deleterious effect on the myocardium and coronary circulation in the isolated rat heart. In addition, another hypothesis is that the effect is directly related to the gasotransmitters and oxidative stress.

2.3. Eligibility for doctoral candidacy

The candidate has published a full-length paper in a journal in the CC/SCI Journal List, as a first author, which meets the requirements for submission of a doctoral dissertation:

Živković V, Jakovljević V, Đorđević D, Vuletić M, Barudžić N, Đurić D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 2012 Nov; 370(1-2): 59-67.

2.4. Research overview

For a long time, it was believed that hyperhomocysteinemia was an independent risk factor for atherosclerosis. However, it has not been proven with certainty in many clinical trials. At the same time numerous harmful effects of homocysteine have been identified, which are, among other things, clearly associated with oxidative stress, as well as “protein *homocysteinylation*“ (unwanted bond formation between CH groups of amino acids). Previous studies have shown that hyperhomocysteinemia is associated with adverse cardiac remodeling and heart muscle weakness. In addition, some data suggest that acutely administered homocysteine produces a decrease of cardiac contractility and coronary vasodilation – the effects without participation of NO, but with partial participation of adenosine.

The gasotransmitter NO (a product of L-arginine) is known as a second messenger in many homeostatic processes, but, among other things, it is associated with endocardial endothelial dysfunction which occurs due to the effects of risk factors (including homocysteine), but also as a result of imbalance between the production and degradation of NO and O_2^- . Therapeutic strategies that will increase production of NO (and/or reduce its degradation), and otherwise improve endothelial function and reduce the production of O_2^- (and/or increase its degradation) provide a rational basis for research using experimental models, as well as for use in humans.

Physiologically, the gasotransmitter H_2S is a second messenger which is produced in mammalian cells by the metabolism of L-cysteine. Its toxicity was discussed even in 1713. It has been shown to stimulate the ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle cells, acting as an endogenous opener of these channels and exerting cardioprotective effects in myocardial ischemia and septic shock. Significant amounts of H_2S are produced in the brain by cystathionine beta-synthase (CBS), or in the cardiovascular system and smooth muscles by cystathionine gamma-lyase (CSE), which synergistically with NO induces

relaxation in rat aorta smooth muscle, vasodilation and hypotension, along with antioxidant and antiproliferative effects. These effects are important for the maintenance of normal arterial blood pressure and vascular structure. Reduction of H₂S was detected in the smooth muscles of spontaneously hypertensive rats and in experimental hypertension induced by blockade of NO synthase. Deficit in H₂S levels contributes to atherogenesis in some patients with hyperhomocysteinemia. H₂S was found to prevent damage to the heart muscle resulting from acute homocysteine administration in rats (Interestingly enough, both substances contain sulphur.) by changing the activity of mitochondrial respiratory chain (enzymes: succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, and manganese superoxide dismutase). Activity of H₂S is regulated by S-adenosyl-L-methionine (SAM) and pyridoxal phosphate (vitamin B6), which are also important regulators of homocysteine metabolism.

The gasotransmitter CO is endogenously synthesized using the enzyme heme oxygenase-1 (HO-1), and is involved in maintaining the structure and function of the cardiovascular system, and also in the pathophysiology of cardiovascular diseases, together with NO and H₂S. It is believed that HO-1 has a positive role in the homeostasis of the cardiovascular system, i.e. production of antioxidants and vaso-modular substances generated by this enzyme. Modulation of key enzymes in the synthesis of NO and H₂S significantly changes HO-1 expression and CO production.

The role of oxidative stress in the pathogenesis of more than 200 of acute and chronic diseases (including many cardiovascular diseases) is by now well known. However, mutual interactions between oxidative stress and gasotransmitters in hyperhomocysteinemia, as well as the possible effects on the cardiovascular system, have not yet been thoroughly investigated.

2.5. Significance and Purpose of Research

The significance of the study

Bearing in mind that the role of oxidative stress in the pathogenesis of more than 200 of acute and chronic diseases (including many cardiovascular diseases) is by now well known, and that interactions between oxidative stress and gasotransmitters in hyperhomocysteinemia and the possible effects on the cardiovascular system have almost not been investigated, this study can be considered a pioneering work worldwide. According to available data, no similar study has been conducted either in our country or, taking into account all the details of the design – in the world.

Objectives and hypotheses of the study

The main objective of the research is to investigate the effects of acute administration of homocysteine and homocysteine-related compounds on cardiac muscle and coronary circulation in isolated rat heart, and the possible mechanisms of the effects obtained. Also, the specific aims of this study are: to examine the effects of gaseous signaling molecules – NO, H₂S and CO – in the maintenance of normal function and structure of the cardiovascular system and to examine the effects of different parameters of oxidative stress (nitrite (NO₂⁻), superoxide anion radical (O₂⁻), lipid peroxides (TBARS) and hydrogen peroxide (H₂O₂) on cardiodynamic parameters of the heart rate and coronary circulation.

The main hypothesis of the study is that acute application of homocysteine and homocysteine-related compounds can have harmful effects on the heart muscle and coronary circulation in isolated rat heart. Besides, there is an additional hypothesis that this effect is directly related to the gasotransmitters and oxidative stress.

2.6. Relationship to previous research

Numerous studies have identified a vast array of harmful effects of homocysteine, which are, among other things, clearly associated with oxidative stress, as well as with "*protein homocysteinylation*" (unwanted bond formation between CH groups of amino acids). Previous studies have shown that hyperhomocysteinemia is associated with adverse cardiac remodeling and heart muscle weakness. In addition, some data suggest that acutely administered homocysteine produces a decrease of cardiac contractility and coronary vasodilation – the effects without participation of NO, but with partial participation of adenosine.

On the other hand, gasotransmitters NO, CO, and H₂S have been confirmed endogenous mediators to exert vasodilator effects and are currently subject to intensive research. They appear to be powerful vasoactive substances in the cardiovascular system. However, no attempt has been made to establish a correlation between the role of these mediators in the vascular effects of homocysteine and its metabolites, let alone the correlation with oxidative stress.

2.7. Research methods

Type of study

Experimental study

Experimental Population

The research will be conducted on 240 rats (male Wistar-Albino rats 8 weeks old, weighing 250 ± 50 g) whose hearts will be perfused according to the Langendorff retrograde perfusion technique (Langendorff apparatus, Experimetria Ltd., 1062 Budapest, Hungary) at constant coronary perfusion pressure of 70 cmH₂O. All experimental procedures will be performed in accordance with prescribed standards (**Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (86/609/EEC)**) and ethical principles.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for the welfare of experimental animals of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac.

Materials and Methods

The animals will be divided into sixteen (16) experimental groups (15 animals per group): 1) control group (perfusion with Krebs-Hensenleit saline), 2) application of DL-Homocysteine (10 μ mol/l), 3) application of DL-Homocysteine thiolactone hydrochloride (10 μ mol/l), 4) application of L-Homocysteine thiolactone-hydrochloride (10 μ mol/l), 5) application of N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (30 μ mol/l), 6) application of Zinc protoporphyrin IX (10 μ mol/l), 7) application of DL-Propargylglycine (10 μ mol/l), 8) co-application of DL-Homocysteine (10 μ mol/l) plus L-NAME (30 μ mol/l), 9) co-application of DL-Homocysteine (10 μ mol/l) plus Zinc protoporphyrin IX (10 μ mol/l), 10) co-application of DL-Homocysteine (10 μ mol/l) plus DL-Propargylglycine (10 μ mol/l), 11) co-application of DL-Homocysteine thiolactone hydrochloride (10 μ mol/l) plus L-NAME (30 μ mol/l), 12) co-application of DL-Homocysteine thiolactone hydrochloride (10 μ mol/l) plus Zinc protoporphyrin IX (10 μ mol/l), 13) co-application of DL-Homocysteine thiolactone hydrochloride (10 μ mol/l) plus DL-Propargylglycine (10 μ mol/l), 14) co-application of L-Homocysteine thiolactone hydrochloride (10 μ mol/l) plus L-NAME (30 μ mol/l), 15) co-application of L-Homocysteine thiolactone hydrochloride (10 μ mol/l) plus Zinc protoporphyrin IX (10 μ mol/l), 16) co-application of L-Homocysteine thiolactone hydrochloride (10 μ mol/l) plus DL-Propargylglycine (10 μ mol/l).

The coronary flow will be measured by flowmetry. After establishing the stability of the heart rate, removal of the left atrium and penetration through the mitral valve will allow the sensor (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) to be positioned in the left ventricle for direct and continuous monitoring of parameters related to the left

ventricular function: a) dp/dt max – the maximum rate of change in left ventricular pressure, b) dp/dt min – the minimum rate of change in left ventricular pressure, v) SLVP – systolic left ventricular pressure, g) DLVP – diastolic left ventricular pressure, f) HR – heart rate, and e) the MBP – mean blood pressure.

Test substances will be applied using continuous perfusion (minimum 5 min) until steady coronary flow has been achieved. Samples of the coronary venous effluent will be used to determine the following parameters of oxidative stress using spectrophotometric methods: index of lipid peroxidation measured as TBARS, nitric oxide in the form of nitrite (NO_2^-), superoxide anion radical (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2).

2.8. Expected results

After this research it is expected to provide a better understanding of the effects of homocysteine and homocysteine-related compounds on the cardiovascular system, which may be of interest given the physiological and clinical significance of homocysteine. The outcomes will provide the assessment of contribution of endogenously synthesized gaseous signaling molecules – NO, CO and H_2S , and some parameters of oxidative stress, and will help to determine their role in cardiovascular homeostasis.

2.9. Basic Dissertation Structure

Over the past four decades, researches conducted around the world have found that homocysteine (Hcy), a semi-essential amino acid, is a novel and independent risk factor for atherosclerosis. On the other hand, the mechanism of its activity in the cardiovascular system has not been fully elucidated. Based on the known role of gaseous transmitters in the cardiovascular system, and their inverse relationship with homocysteine metabolism, it would be of utmost importance to determine which of these transmitters has the most important role in cardiovascular effects of homocysteine and its metabolites. Besides, oxidative stress is a very complex mechanism of pro-oxidative and antioxidative interaction resulting in predominance of pro-oxidative effects and, consequently, damage and dysfunction of biological structures.

The objective of this study is to determine mutual interactions between oxidative stress and gasotransmitters in hyperhomocysteinemia, as well as the possible effects on the cardiovascular system.

2.10. Proposed Dissertation Supervisor

PhD Vladimir Jakovljević, Associate Professor in the field of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, is the proposed dissertation supervisor and PhD Dragan Đurić, Full Professor in the field of Physiology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, is a proposed co-supervisor.

2.11. Scope of Doctoral Dissertation

Medicine. Area of Expertise: Physiology

2.12. Evaluation Committee – Areas of Expertise

1. **Prof. Naranjan S. Dhalla, PhD**, Chairman, Distinguished Professor, Institute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, Faculty of Medicine, Winnipeg, Canada
2. **Prof. Dragan Đurić, MD, PhD**, member, Full Professor of Physiology, School of Medicine, University of Belgrade
3. **RNDr Olga Pechanova, DSc.**, member, Full Professor, Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava
4. **Prof. Gvozden Rosić, MD, PhD**, member, Full Professor of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
5. **Prof. Vladimir Jakovljević, MD, PhD**, member, Associate Professor of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Conclusions of the Evaluation Committee

1. On the basis of the results of research conducted so far and published papers, the Committee concludes that candidate Vladimir Živković, MD, has shown the appropriate competence in scholarly exposition and meets the requirements to prepare the doctoral dissertation.
2. The doctoral dissertation proposal is scientifically well justified and clearly outlined, the investigation is well-organized, and the proposed methodology is clear. It is original scientific research which aims to develop a new approach to the investigation of the effects of homocysteine and homocysteine-related substances in the cardiovascular system.
3. The Committee believes that the dissertation of candidate Vladimir Živković, MD, will be of great scientific and practical importance regarding the effects of homocysteine and homocysteine-related substances in the cardiovascular system, with the special emphasis on the role of gasotransmitters and oxidative stress.
4. The Committee recommends that the Board for Teaching and Research of the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac accept the doctoral dissertation proposal of the candidate candidate Vladimir Živković, MD, entitled **EFFECTS OF HOMOCYSTEINE AND HOMOCYSTEINE-RELATED COMPOUNDS ON CARDIODYNAMICS AND CORONARY FLOW IN ISOLATED RAT HEART: THE ROLE OF GASOTRANSMITTERS AND OXIDATIVE STRESS** and approved its realisation.

Prof. Naranjan S. Dhalla, PhD, Chairman, Distinguished Professor, Institute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, Faculty of Medicine, Winnipeg, Canada

Prof. Dragan Đurić, MD, PhD, member, Full Professor of Physiology, School of Medicine, University of Belgrade

RNDr Olga Pechanova, DSc., member, Full Professor, Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Prof. Gvozden Rosić, MD, PhD, member, Full Professor of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Prof. Vladimir Jakovljević, MD, PhD, member, Associate Professor of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Kragujevac, January 18th, 2013