

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМИЉНО:		22. 09. 2022	
Орг.јед.	Број	Тема	Беридност
05	10085		

## 1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-651/42 од 13.09.2022. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Милице Јевтић** под називом:

**„Ефекти примене N-ацетилцистеина и  $\alpha$ -токоферола на локалне и системске параметре оксидационог стреса код механичке лезије гласница пацова“**

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. др **Тамара Николић Турнић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. др **Владимир Живковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
3. др **Александар Перић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета у Београду за ужу научну област *Оториноларингологија са максилофацијалном хирургијом*, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

## 2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат **Милица Јевтић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

## 2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

N-ацетилцистеин (NAC) је дериват аминокиселине L-цистеина. Садржи сулфхидрилну (тиол, H) групу. Најпознатији је по свом муколитичком дејству и као антидот код тровања парацетамолом. Сем тога, NAC поседује и антиоксидантно дејство. Захваљујући сулфхидрилној групи, N-ацетилцистеин има способност да директно везује реактивне врсте кисеоника (ROS), попут супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) и водоник пероксида ( $H_2O_2$ ). Као извор аминокиселине L-цистеина, прекурсора редукованог глутатиона (GSH), NAC учествује у регенерацији GSH и тиме индиректно доприноси антиоксидантној заштити. Оксидациони стрес прати многобројна патолошка стања и болести. Сходно томе, NAC је нашао своје место у примени код: цистичне фиброзе, хроничне опструктивне болести плућа, ангине пекторис, дијабетеса, неуропсихијатријских болести, контрастне нефропатије, тровања тешким металима, ХИВ/АИДС, ендометриозе и синдрома полицистичних јајника.

Витамин Е је липосолубилни, есенцијални витамин који представља неензимску компоненту антиоксидативне заштите. Обухвата четири изоформе токоферола и токотриенола. Заступљен је у свим ћелијама, као саставни део ћелијске мембране и липопотеина. алфа-токоферол, најзаступљенија изоформа витамина Е у људском организму, има најзначајнију биолошку улогу. Скорија истраживања показала су да витамин Е поседује антиинфламаторно, антиалергијско, антиатерогено, антихипертензивно, као и антиоксидантно дејство. Претпостављени механизам антиоксидантног дејства витамина Е инхибиција пропагације липидне пероксидације, при чему доминантно реагује са пероксил радикалима. Комбинована примена хидросолубилног (NAC) и липосолубилног антиоксиданса (алфа-токоферол), са различитим механизмима интрацелуларног деловања, има за циљ остваривање потенцирајућег синергизма. Показано је да NAC дозно-зависно повећава концентрацију алфа-токоферола, а да алфа-токоферол последично потенцира протективно, антиоксидантно дејство NAC-а.

## 2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Очекује се да ће примена поменутих агенаса (NAC и алфа-токоферола) деловати антиоксидативно што би помогло у зарастању рана гласница. Такође, примена антиоксиданса требало би да доведе до повећања депоновања хијалуронске киселине, повећања експресије проколагена тип I и bFGF (basic fibroblast growth factor) и других важних чинилаца у процесу зарастања ране. Резултати ове студије пружиће значајан допринос сагледавању терапијских могућности примене NAC и алфа-токоферола у оториноларингологији.

### 2.3. Наслов, циљ(еви) и хипотеза(е) докторске дисертације

**Наслов:** „Ефекти примене N-ацетилцистеина и  $\alpha$ -токоферола на локалне и системске параметре оксидационог стреса код механичке лезије гласница пацова“

**Циљеви:** Циљ ове студије је испитивање утицаја механичке лезије гласница пацова на локалне и системске параметре оксидационог стреса, као и утрђивање антиоксидантног појединачног и комбинованог дејства. У складу са главним циљем, постављени су и следећи специфични циљеви ове студије:

1. Испитати утицај механичке лезије гласница пацова на локалне и системске параметре оксидационог стреса и антиоксидантне заштите
2. Испитати и упоредити утицај појединачне и комбиноване примене N-ацетилцистеина и алфа -токоферола на локалне и системске параметре оксидационог стреса и антиоксидантне заштите код механичке лезије гласница пацова
3. Испитати и упоредити утицај појединачне и комбиноване примене N-ацетилцистеина и алфа -токоферола на патохистолошке промене код механичке лезије гласница
4. Утврдити корелацију свих добијених биохемијских и патохистолошких промена.

**Хипотезе:** На основу досадашњих знања из ове области, постављене су следеће хипотезе:

1. Очекује се да механичка лезија гласница може да изазове промене локалног и системског оксидационог статуса.
2. Очекује се да појединачна примена N-ацетилцистеина и алфа-токоферола може да испољи протективни ефекат на оксидативно оштећење код механичке лезије гласница.
3. Очекује се да примена алфа -токоферола у комбинацији са N-ацетилцистеином може да потенцира протективни ефекат на оксидативно оштећење код механичке лезије гласница.
4. Очекује се да појединачна и комбинована примена N-ацетилцистеина и алфа -токоферола могу да буду повезане са позитивним патохистолошким променама ткива гласница са механичком лезијом.

## 2.4. Методе истраживања

### 2.4.1. Врста студије

Експериментална студија на пацовима *in vivo* и материјалу животињског порекла *in vitro* и *ex vivo*.

### 2.4.2. Популација која се истражује

У овом истраживању ће се на експерименталном моделу лезије гласница испитивати ефекат N-ацетилцистеин (500 mg/kg) и/или алфа.токоферола (50 mg/kg) који ће се током три дана интраперитонеално апликовати пацовима. Након спроведених интервенција, животиње ће бити анестезиране (фиксном комбинацијом кетамина и ксилазина у концентрацији 100+10mg/kg) и потом жртвоване у циљу добијања биолошког материјала – ткива гласница и крвне плазме. У студији ће бити коришћени мужјаци пацова *Wistar albino* соја (Одељење за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинска академија Београд), старости 12 недеља, телесне масе 350-400 g. Животиње ће бити сврстане у 8 једнаких група (по 8 пацова) и чуване у стандардним условима (температура 22±1 °C, влажност ваздуха, циклус светлост/тама на 12 сати), по 4 животиње у сваком кавезу, уз неограничен приступ храни и води (*ad libitum*).

Сви експерименти ће се спровести у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експерименталним процедурама, као и у складу за важећим актима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и етичким принципима.

### 2.4.3. Узорковање

Испитиване животиње ће методом случајног узорка бити сврстане у 8 група (по 8 животиња у свакој групи) у зависности од примене одговарајућег агенса и примењене интервенције:

1. Група 1 – здраве животиње којима се током три дана интраперитонеално апликује физиолошки раствор (плацебо),
2. Група 2 – здраве животиње којима се током три дана интраперитонеално апликује N-ацетилцистеин (500 mg/kg),
3. Група 3 – здраве животиње којима се током три дана интраперитонеално апликује  $\alpha$ -токоферол (50 mg/kg),
4. Група 4 - здраве животиње којима се током три дана интраперитонеално апликује N-ацетилцистеин (500 mg/kg) и  $\alpha$ -токоферол (50 mg/kg),
5. Група 5 – здраве животиње којима се микрохируршки изазива лезија гласнице и током три дана интраперитонеално апликује физиолошки раствор (плацебо),

6. Група 6 – здраве животиње којима се микрохируршки изазива лезија гласнице и током три дана интраперитонеално апликује N-ацетилцистеин (500 mg/kg),
7. Група 7 – здраве животиње којима се микрохируршки изазива лезија гласнице и током три дана интраперитонеално апликује  $\alpha$ -токоферол (50 mg/kg) и
8. Група 8 – здраве животиње којима се микрохируршки изазива лезија гласнице и током три дана интраперитонеално апликује N-ацетилцистеин (500 mg/kg) и  $\alpha$ -токоферол (50 mg/kg)

Животињама из група 5, 6, 7 и 8 ће се под контролом флексибилног ендоскопа визуелизовати ларинкс и уз помоћ 25G (0,5 mm) игле изазвати лезија обе гласнице (први дан). Животињама група 2 и 6 ће се од другог дана интраперитонеално апликовати N-ацетилцистеин (500 mg/kg) свакодневно током три дана, животињама група 3 и 7 ће се у истом периоду интраперитонеално апликовати  $\alpha$ -токоферол (50 mg/kg), док ће се животињама група 1 и 5 интраперитонеално апликовати плацебо (физиолошки раствор). Животињама група 4 и 8 ће се у истом периоду интраперитонеално апликовати комбинација N-ацетилцистеина (500 mg/kg) и  $\alpha$ -токоферола (50 mg/kg). Након спроведених интервенција, спровешће се *ex vivo* и биохемијска истраживања.

#### 2.4.4. Варијабле које се мере у студији

##### **Биохемијске анализе биомаркера системског оксидационог статуса**

Приликом жртвовања би се узимала венска крв из које би се спектрофотометријски одређивале вредности параметара редокс статуса. Након центрифугирања, из плазме би се одређивале вредности про-оксидационих маркера:

1. индекс липидне пероксидације, TBARS ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина),
2. азот моноксид у форми нитрита,  $\text{NO}_2^-$  ( $\text{nmol}/\text{ml}$ ),
3. супероксид анјон радикал,  $\text{O}_2^-$  ( $\text{nmol}/\text{ml}$ ),
4. водоник пероксид,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{nmol}/\text{ml}$ ),

док би се из еритроцита одређивале активност антиоксидационих ензима:

5. каталаза, CAT ( $\text{U}/\text{mg}$  протеина),
6. супероксид дисмутаза SOD ( $\text{U}/\text{mg}$  протеина),
7. глутатион пероксидаза мерен кроз концентрацију редукованог глутатиона, GSH ( $\text{mg}/\text{g}$  протеина).

##### **Патохистолошке и имунохистохемијске анализе**

У препарату ткива гласница би се имунохистохемијски одређивала експресија 4-хидрокси-2-ноненала (4-HNE), маркера липидне пероксидације, а такође би се спровела и хистолошка анализа ткива гласница. Узорци ткива гласница би се након жртвовања и препарисања фиксирани у пуферизованом формалину и уградили у парафинске калупе, а потом секли и бојили хематоксилин/еозином за стандардну хистолошку анализу, односно обележавали специфичним антителима за имунохистохемијску анализу.

#### 2.4.5. Снага студије и величина узорка

Пројекција узорка је изведена на основу претходно публикованих резултата из сличног истраживања у коме је испитиван ефекат примене антиоксиданса на експресију 4-HNE, параметра оксидационог стреса, након изазивања механичке лезије гласница. На основу резултата претходне студије, за Т-тест два независна узорка (алфа 0,05, снага студије 0,8), коришћењем одговарајућег рачунарског програма - G\*Power 3 добија се број од по 6 експерименталних животиња у свакој групи. Наведени број животиња је повећан на 8 животиња по експерименталној групи сходно методолошким препорукама за корекцију претпостављене непараметарске дистрибуције података као и због броја експерименталних животиња које неће бити део завршне анализе (очекивани губитак током третмана). Имајући у виду да ће истраживањем бити обухваћено осам група, укупан узорак је утврђен на 64 експерименталне животиње.

#### 2.4.6. Статистичка анализа

За проверу хомогености варијансе добијених резултата користиће се *Levene-ов тест*. За проверу нормалности расподеле користиће се *Shapiro-Wilk-ов тест*. За тестирање разлика између група користиће се двофакторска ANOVA са одговарајућом *post-hoc* анализом.  $p$  вредност мања од 0.05 сматраће се статистички значајном. Целокупна статистичка анализа биће одрађена у статистичком пакету SPSS, верзија 20.0 (*IBM SPSS Statistics 20*).

## 2.5. Значај истраживања за развој науке

На основу доступне литературе може се закључити да је за антиоксидативни потенцијал N-ацетилцистеина и алфа-токоферола заслужна специфична хемијска структура и присуство сулфидрилне групе, па примена ових суплемената има велики потенцијал у многим болестима које су посредоване оксидационим стресом. Очекујемо да ће механичка лезија повећати степен оксидативног оштећења у ткиву гласница и крвној плазми, а да ће појединачна примена NAC-а и  $\alpha$ -токоферола испољити протективно дејство на оксидативно оштећење изазвано механичком лезијом гласница, како у ткиву гласница, тако и у системској циркулацији. Такође, очекујемо да ће примена комбинације ова два антиоксиданса испољити синергистички антиоксидантни ефекат.

## 2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Како су резултати конзервативног и хируршког третмана ожиљака гласница неизвесни, неопходно је ставити акценат на превенцију њиховог настанка. С обзиром на то да је фономикрохирургија један од етиолошких чинилаца за настанак ожиљка гласнице, као и на значај одржавања редокс равнотеже у процесу зарастања ране, ово истраживање би допунило досадашња сазнања о улози оксидационог стреса у зарастању оперативних рана гласница и превенцији ожиљака гласница.

## 2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Милица Јевтић је завршила Интегрисане академске студије медицине на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу школске 2011/2012. године, на ком је 2017. године дипломирала са просечном оценом 9,54 и стекла стручно звање доктора медицине. Од школске 2017/2018. године ангажована је као фацитатор у настави за ужу научну област Оториноларингологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Од 2020. године запослена је у Универзитетском клиничком центру Крагујевац, као лекар на специјализацији на Клиници за оториноларингологију. Публиковала је као први аутор 1 рад категорије M51 и 1 рад у часопису M23 категорије чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

- **Jevtić M, Milić D, Jovanović M, Relić N, Jevtović A, Božović N.** Lymphoepithelial Carcinoma of the Palatine Tonsil. Ser J Exp Clin Res. 2021. doi: 10.2478/sjecr-2021-0039 M51

### 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже доц. др Јасмина Стојановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Оториноларингологија.

Доц. др Јасмина Стојановић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

#### 3.1 Компетентност ментора

Радови доц. др Јасмине Стојановић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Šarić Z, Subotić M, Bilibajkić R, Barjaktarović M, **Stojanović J**. Supervised speech separation combined with adaptive beamforming. *Comput Speech Lang*. 2022;101409.
2. Punišić S, Jovičić ST, Subotić M, **Stojanović J**. Psychoacoustic evaluation of acoustic features distortion in fricative consonant of speech. *Appl Acoust*. 2021;171:107564.
3. **Stojanović J**, Belić B, Erdevički L, Jovanović S, Jovanović M, Srećković S. Quality of Life in Dysphonic Children Measured on Pediatric Voice-Related Quality of Life (PVRQOL) Scale in Serbia. *Acta Clinica Croatica*. 2021;60(1.):75-81.
4. Relic N, Jevtic M, Belic B, Petrovic-Rodic D, Jevtovic A, Bozovic N, Jovanovic M, **Stojanovic J**. Presentation of a rare case of laryngeal schwannoma with short literature review. *Vojnosanit Pregl*. 2020.
5. **Stojanović J**, Ilić N, Stanković P, Arsenijević P, Erdevički Lj, Belić B, Živić Lj, Banković D. Risk factors for the appearance of minimal pathologic lesions on vocal folds in vocal professionals. *Vojnosanit Pregl*. 2012;69(11): 973-7.

#### 4. Научна област дисертације

Медицина.

Предмет истраживања се односи на испитивање ефеката примене N-ацетилцистеина и  $\alpha$ -токоферола на локалне и системске параметре оксидационог стреса код механичке лезије гласница пацова. Предмет истраживања, циљ и постављене хипотезе и методолошки приступ истраживању су међусобно усклађени, а предложени ментор има научне компетенције које су подударне са предметом истраживања.



## 5. Научна област чланова комисије

1. др **Тамара Николић Турнић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
1. др **Владимир Живковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
2. др **Александар Перић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета у Београду за ужу научну област *Оториноларингологија са максилофацијалном хирургијом*, члан.

Сви предложени чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Милице Јевтић имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Милица Јевтић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Милице Јевтић, под називом „Ефекти примене **N**-ацетилцистеина и **α**-токоферола на локалне и системске параметре оксидационог стреса код механичке лезије гласница пацова“ и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

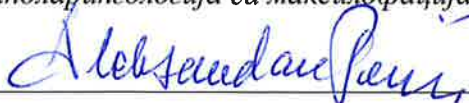
**др Тамара Николић Турнић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник



**др Владимир Живковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;



**др Александар Перић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета у Београду за ужу научну област *Оториноларингологија са максилнофацијалном хирургијом*, члан.



У Крагујевцу, 15.09.2022. године