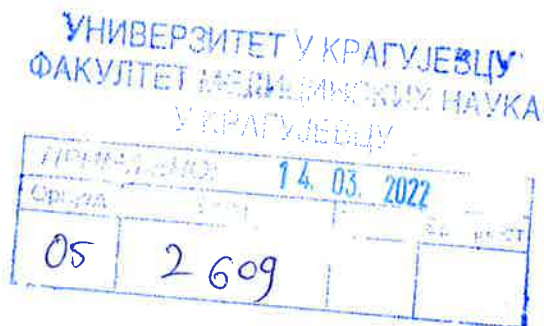


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-57/21 од 04.02.2022. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидаткиње др Мионе Вулетић под називом:

„Ефекти формулација на бази *Galium verum L.* у терапији афтозног стоматитиса код пацова“

Чланови комисије су:

1. Доц. др Раша Младеновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, председник;
2. Доц. др Ана Барјактаревић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан;
3. Проф. др Биљана Божин, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакогнозија и фитотерапија, члан;

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Миона Вулетић рођена је 23. 9. 1991. године у Крагујевцу, Република Србија. Основну школу „Јован Поповић“ завршила је у Крагујевцу. Прву крагујевачку гимназију завршила је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука у Крагујевцу

уписала је школске 2010/2011. године, а дана 27. 6. 2015. године завршила је Интегрисане академске студије стоматологије са просечном оценом 9,50 и стекла звање доктор стоматологије. Након завршених студија обавила је обавезан приправнички стаж и положила стручни испит 29. 6. 2016. године. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2015/2016. године. Тренутно је студент треће године са положеним усменим докторским испитом, изборно подручје Истраживања у стоматологији. Специјалистичке студије из гране медицине Превентивна и дечја стоматологија уписала је 1. 12. 2017. године. Тренутно је на трећој години специјалистичког стажа. У зимском семестру школске 2015/2016. године и у зимском семестру 2016/2017. године била је ангажована на студијском програму Интегрисаних академских студија стоматологије, Факултет медицинских наука у Крагујевцу, на месту фацитатора за ужу научну област Болести зуба и ендодонција. Од школске 2016/2017. године запослена је као сарадник у настави, а од школске 2018/2019. као истраживач-приправник за ужу научну област Превентивна и дечја стоматологија на Интегрисаним академским студијама стоматологије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Ефекти формулација на бази *Galium verum L.* у терапији афтозног стоматитиса код пацова

Предмет: Испитивање ефекта екстракта надземног дела биљке *Galium verum L.* на карактеристике рекурентног афтозног стоматитиса код пацова

Хипотеза: Терапија РАС раствором и гелом на бази екстракта добијених из надземног дела биљке *Galium verum L.* може да ублажи хистолошке промене карактеристичне за РАС

Терапија раствором на бази екстракта *Galium verum L.* може да ублажи инфламаторне промене карактеристичне за РАС

Терапија гелом на бази екстракта *Galium verum L.* може да ублажи инфламаторне промене карактеристичне за РАС

Терапија раствором и гелом на бази екстракта *Galium verum L.* може да смањи број ћелија и продукцију медијатора инфламације у лезијама РАС

Терапија раствором и гелом на бази екстракта *Galium verum L* утиче на концентрацију параметара оксидационог стреса у системској циркулацији и лезијама РАС

Постоји корелација између хистопатолошких и биохемијских промена код РАС пацова третираних екстрактом из надземних делова биљке *Galium Verum L*.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидаткиња је као први аутор објавила један рад у целини у часопису категорије М51 на једном од водећих светских језика, чиме је испунила услов за пријаву докторске дисертације:

Vuletic M, Papic M, Zivanovic S, Papic M. Recurrent aphtous stomatitis – An overview. *Ser J Exp Clin Res.* 2021. doi:10.2478/sjecr-2021-0058. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Рекуренти афтозни стоматитис (РАС) представља најчешће обољење оралне мукозе које се карактерише рекурентним епизодама солитарних или мултиплих болних улцерација. Етиологија РАС-а није у потпуности разјашњена, али се као предиспонирајући фактори за настанак обољења наводе: локална траума, генетски фактори, вирусне и бактеријске инфекције, нутритивне дефицијенције, дисфункције имунског или ендокриног система, оксидациони стрес, системска обољења и др. Поред имунске основе овог обољења, оксидациони стрес се наводи као један од главних узрока настанка афти. Мултифакторијална етиологија РАС-а може пореметити равнотежу између оксидационог и антиоксидационог статуса у организму и на тај начин довести до повећаног стварања слободних радикала и последичног оштећења ћелија.

Терапија РАС-а је у највећем броју случајева симптоматска и подразумева примену оралних антисептичких раствора као што је 0,2% хлорхексидин у циљу сузбијања суперинфекције бактеријама. Такође су ефикасни и антибиотски раствори на бази тетрациклина, а за смањење болова локално се користе биоадхезивне пасте са анестетикама (20% бензокаин или 5% лидокаин спреј). Примена ласера у терапији РАС-а данас привлачи пажњу многих истраживача јер бројне студије показују да значајно ублажавају бол и скраћују период зарастања код пацијената са РАС-ом у односу на контролну групу. У случајевима када локална терапија афти није довољна, индикована је примена системске терапије пеницилином Г, док се за спречавање

настанка нових лезија примењују кортикостероиди (најчешће преднизон 25mg/kg). Као што је познато кортикостероиди су најефикаснији у терапији РАС-а, али због ограниченог поља примене неопходно је испитати алтернативне методе. Годинама уназад се у терапији РАС-а као алтернативна метода примењује фитотерпија јер поседују бољи безбедносни профил у односу на тренутно доступне синтетске лекове. Бројне студије су показале значајану редукцију величине улцерације код пацијената лечених природним препаратима, као и да полифеноли из биљака доприносе процесу зарастања улцерација на букалној слузници.

Galium verum L. (бороћац, Иванова трава, жуто ивањско цвеће) је вишегодишња зељаста биљка која припада породици Rubiaceae. Анализом фитохемијског састава су утврђена различита фармаколошки активна једињења на којима се заснива њено лековито својство. Иридоидни гликозиди, полифеноли, антрахинони, тритерпен, алкалоиди, етарска уља, пигменти и витамин С су активне сустранце које су присутне у надземном делу ове биљке. Захваљујући својим терапијским својствима, полифеноли су у последње време предмет истраживања, најчешће због свог антиоксидационог ефекта. Најзначајнији утицај иридоида на здравље огледа се у антиинфламационом, антимикробном и антиоксидационом деловању.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања

Имајући у виду претходно потврђене ефекте полифенола и иридоида у ублажавању инфламације и оксидационог стреса, претпостављамо да би примена екстракта ивањског цвећа могла допринети бржем зарастању улцерација букалне слузнице. Обзиром да традиционална примена *Galium verum L.* истиче ефикасност у терапији кожних промена, псоријазе и зарастању рана, сматрамо да би било од интереса испитивање његове потенцијалне улоге у терапији РАС.

Циљ истраживања

Главни циљ овог истраживања је испитати ефекат екстракта надземног дела биљке *Galium verum L.* на карактеристике рекурентног афтозног стоматитиса код пацова.

У складу са основним циљем истраживања дефинисани су следећи експериментални задаци:

1. Утврдити макроскопски присуство лезије РАС

2. Испитати утицај третмана раствором и гелом на бази екстракта добијеног из надземног дела биљке *Galium verum L.* на хистолошке промене узорака букалне слузнице код РАС пацова
3. Дефинисати и квантификовати инфламаторне промене у изолованим лезијама РАС третираних раствором и гелом на бази екстракта надземног дела биљке *Galium verum L.*
4. Утврдити концентрацију параметара оксидационог стреса у системској циркулацији и лезијама РАС код пацова третираних раствором и гелом на бази екстракта из надземног дела биљке *Galium verum L.*
5. Утврдити корелацију између хистопатолошких и биохемијских промена код РАС пацова третираних раствором и гелом на бази екстракта биљке *Galium verum L.*

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Иако су спроведена бројна експериментална и клиничка истраживања у вези терапије рекурентног афтозног стоматитиса, неопходно је испитати и алтернативне методе. Обзиром да је показано да лечење природним препаратима значајно доприноси редукцији величине улцерација, смањењу инфламације и оксидационог стреса, планирано истраживање има за циљ испитивање утицаја и потенцијалне улоге *Galium verum L.* у терапији афтозног стоматитиса.

2.7. Метод истраживања

2.7.1 Врста студије

Тип студије према коме ће бити спроведено истраживање је експериментална студија на животињама *in vivo*.

2.7.2. Експерименталне животиње

Истраживање ће се спровести на пацовима добијени из одгајалишта за пацове Војномедицинске академије, Београд. Пацови ће бити селектовани из Wistar albino соја, мушког пола ($n=60$), старости 6 недеља (просечне телесне масе око 200g). Све животиње биће одгајане под стандардним условима у виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, уз приступ води и храни *ad libitum*. Експерименталне животиње ће бити чуване према прописаним узгојним условима (температура 25°C, циклус светлост:тама 12:12 часова). Све планиране процедуре

одобила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број 01-305).

2.7.3. Узорковање

Свим животињама ће бити индукован РАС према описаном протоколу, након чега се бити сврстане у следеће групе:

1. Група – животиња којима је индукован РАС и којима ће рана бити третирана вехикулумом за израду раствора *Galium Verum L* – контролна група (n=20)
2. Група – животиња којима је индукован РАС на терапији 20% раствором *Galium verum L.*, три пута дневно (n=20)
3. Група – животиња којима је индукован РАС на терапији 20% гелом *Galium verum L.*, три пута дневно (n=20)

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле:

- Животиње са рекурентним афтозним стоматитисом

Зависне варијабле:

- Величина лезије
- Период зарастања лезије
- Хистолошки параметри (патохистолошки скор)
- Експресија релевантних маркера инфламације и оксидационог стреса
- Биохемијски параметри (параметри оксидационог стреса)

Индукција РАС

Улцерације на букалној слuzници ће бити индуковане, након анестезирања пацова комбинацијом кетамина и ксилазина, апликацијом 99,7% сирћетне киселине на букалну слuzницу левог образа коришћењем пластичног штапића чији је врх обложен ватом, дијаметра 4 mm, у трајању од 20 секунди. Овај поступак ће изазвати површну некрозу ткива која ће се развити у хроничну улцерацију са јасно одређеним границама два дана касније (нулти дан).

Развој лезије и макроскопске карактеристике ће бити праћене свакодневно, при чему ће се вршити мерење лезије планиметром.

На основу прегледа доступне литературе, одлучили смо да је за овај модел болести најефикаснији модалитет примене екстракта добијених из надземних делова биљке *Galium verum L.* у виду раствора и гела у концентracији од 20%, три пута дневно.

Одређиваће се квалитативно-квантитативни састав екстракта ивањског цвећа као и укупан садржај фенола и флавоноида. У циљу проналаска оптималне формулације која би била ефикасна у терапији РАС приступиће се изради течног и получврстог препарата на бази екстракта ивањског цвећа. У циљу добијања гела, екстракт ивањског цвећа ће се инкорпорирати у у хидрофилни гел карбомера.

Праћење уноса хране и воде

Унос хране и воде бележиће се свакодневно.

Жртвовање животиња и сакупљање узорака крви

Предвиђено трајање експеримента је 12 дана. Животиње ће бити жртвоване у различитим временским интервалима у периоду од 10 дана. По 5 животиња из сваке групе ће бити жртвоване нултог дана (два дана након апликације сирћетне киселине) како би се хистолошки потврдио развој афтозне лезије, а затим и на свака наредна три дана (3., 6. и 9. или 10 дана у зависности од макроскопских карактеристика лезије) до потпуног зарастања. Након жртвовања животиња у кетамин-ксилазин анестезији предвиђена је изолација букалног ткива и лезија РАС и припрема за даљу анализу. Узорци крви ће бити прикупљени за одређивање маркера оксидационог стреса.

Одређивање величине лезије

Развој и зарастање лезије биће свакодневно праћени одређивањем величине улцерације коришћењем планиметра почевши од нултог дана.

Хистолошке и морфометријске анализе

Након изолације афтозне лезије, ексцизијом букалног ткива, препарати ће бити фиксирани у 4% неутралном формалину, дехидрирана у растућим концентрацијама алкохола (70-100%), просветљени у ксилитолу, затим уроњени у парафинске блокове и сечени на 5µм дебљине. Бојење ће бити вршено стандардном хематоксилин-еозин методом (H&E). Препарати ће након бојења хематоксилин-еозином бити фотографисани дигиталним фотоапаратом повезаним са микроскопом (Olympus BX51, Tokyo, Japan). Анализа лезија вшиће се уз помоћ ImageJ 1.36 софтвера.

Патохистолошка анализа афтозне лезије, према којој ће бити одређен скор (12), ће обухватити следеће параметре:

0. Нема улцерације – обновљено везивно ткиво
1. Нема улцерације – фиброза + блага хронична инфламација
2. Постоји улцерација – фиброза + средња хронична улцерација
3. Постоји улцерација - хронична улцерација, гранулационо ткиво
4. Постоји улцерација – акутни процес инфламације (дилатација крвних судова, инфаламторни инфлитрат са неутрофилима)

Узорци букалне слузнице биће подвргнути и Picro-Sirius Red бојењу у циљу квантификације колагена.

Одређивање параметара инфламације и оксидационог стреса

Из букалне слузнице евакуишаће се афтозна лезија и оставити на -80°C до хомогенизације. Након тога ће се применом квантитативне реакције ланчане полимеризације у реалном времену (Quantitative Real-time PCR, qRtPCR) одређивати експресија гена укључених у инфламацију и оксидациони стрес.

Маркери оксидационог стреса ће се одређивати из плазме, еритроцита и афтозне лезије. Након центрифугирања, из плазме би се одређивали следећи биомаркери оксидационог стреса (индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид NO- (у облику нитрита), супероксид анион радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2)), док би се у лизату еритроцита мерили следећи ензими антиоксидационе заштите (каталаза (CAT), супероксид-дизмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH)). Осим тога, из афтозних лезија би се мерили: TBARS, CAT, SOD и GSH. Сви поменути параметри би се мерили на одговарајућим таласним дужинама спектрофотометријски (UV 1800, Shimatzu, Јапан).

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка израчуната је на основу података о разликама у величини оралних лезија између група пацова третираних различитим облицима препарата меда у студији сличног дизајна (13). Студијски узорак је израчунат узимајући алфа (α) од 0.05 и снагу студије од 0.80 за Т -тест (два независна узорка), упоређујући групе између себе (у оба смера), према статистичком програму G*Power 3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у

испитиваним параметрима између група, утврђен је број пацова према групама и он износи 20 за сваку од група. За потребе овог истраживања биће укључено 75 пацова због могућности неразвијања болести или непланираних утинућа.

2.7.6. Статистичка анализа

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво биће испитано да ли добијене вредности имају нормалну расподелу (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Ако је број анализираних вредности већи од 50 користићемо Kolmogorov-Smirnov тест, а уколико је мањи од 50 за проверу користићемо Shapiro-Wilk тест. Уколико вредности имају нормалну расподелу користиће се параметарски Student-ово t тест, док у случају када вредности немају нормалну расподелу биће коришћен непараметарски Mann-Whitney-ев тест. Резултати експеримента биће изражени као средња вредност \pm стандардна грешка (енгл. Standard Error, SE). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматраће се када је $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекујемо да примена *Galium Verum L.* у терапији рекурентног афтозног стоматитиса има утицај на развој и величину афтозне лезије као и да доприноси бржем зарастању. Такође, очекујемо да ће код пацова третираних ивањским цвећем постојати мањи патохистолошки скор, у односу на контролну групу пацова који су без терапије, као и да ће им бити детектовани нижи нивои параметара оксидационог стреса. На основу досадашњих литературних података показано је да ниједан терапијски модалитет није у потпуности успешан и не утиче на уклањање узрока већ само на симптоме болести. С обзиром да је овај терапијски модалитет у потпуности неистражен у терапији PAC-а, наша студија би допринела бољем разумевању овог фитотерапијског приступа. У том смислу, сазнања ове студије могу бити од користи за будућа клиничка истраживања у овој области, и допринети евентуалном укључењу *Galium Verum L.* као адјувантог средства у лечењу PAC.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Рекуренти афтозни стоматитис (PAC) је најчешће улцерозно обољење оралне мукозе које се карактерише појавом рецидивирајућих, болних улцерација, овалног или

округлог облика, јасно ограничено еритематозним халоом. У зависности од величине и трајања улцерације, разликују се три клиничке форме афтозног стоматитиса. Терапија је у највећем броју случајева симптоматска, а најчешће се примењују антисептички раствори. Већ дуже време се као алтернативна метода у терапији РАС примењује фитотерапија. Једна од коришћених биљака у фитотерапији је *Galium verum L.* која има широк спектар дејства. У традиционалној медицини користи се у терапији кожных промена, псоријазе и зарастања рана због чега сматрамо да може имати потенцијалну примену у терапији РАС. Циљ овог истраживања је испитати ефекат екстракта надземног дела биљке *Galium verum L.* на карактеристике рекурентног афтозног стоматитиса код пацова. У истраживању ће бити коришћено 75 пацова Wistar albino соја којима ће бити индукован рекурентни афтозни стоматитис. Животиње ће бити подељене у три групе: контролна група (без терапије), група третирана раствором *Galium verum L.* и група третирана гелом на бази екстракта *Galium verum L.* Жртвовање ће бити спроведено у различитим временским интервалима у периоду од 10 дана. Развој и зарастање лезије биће свакодневно праћено одређивањем величине улцерације коришћењем планиметра. Такође, у узорцима ткива букалне слузнице биће спроведене хистолошке и морфометријске анализе, квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену и биће мерени параметри оксидационог стреса. Маркери оксидационог стреса одређиваће се и у узорцима крви. Очекујемо да ће примена *Galium verum L.* довести до смањења величине лезије, степена инфламације, патохистолошког скорa и разлике у концентрацији параметара оксидационог стреса, и смањити период зарастања лезије. Примена *Galium verum L.* у терапији рекурентног афтозног стоматитиса ће имати утицај на развој и величину афтозне лезије као и да ће допринети бржем зарастању.

3. Предлог ментора

Због мултидисциплинарности ове студије за ментора ове докторске дисертације предлаже се доц. др Јована Брадић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија. Доц. др Јована Брадић испуњава услове за менторе докторских дисертација у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама. Истовремено поседујући одговарајуће стручне и научне компетенције које су у вези са предложеном темом.

3.1. Компетентност ментора

Радови доц. др Јоване Брадић

1. Andjic M, Božin B, Dragicin N, Kocovic A, Jeremic J, Tomovic M, Milojevic Samanovic A, Kladar N, Čapo I, Jakovljevic V, **Bradic J**. Formulation and Evaluation of *Helichrysum italicum* Essential Oil-Based Topical Formulations for Wound Healing in Diabetic Rats. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):813.
2. **Bradic J**, Jeremic N, Petkovic A, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Tomovic M. Cardioprotective effects of Galium verum L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2019; 11:1-8.
3. **Bradic J**, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, Turnic TN, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of Galium verum L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:4235405.
4. Milic P, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, **Bradic J**, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Bolevich S, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Arsic A, Mitrovic M, Jakovljevic V, Vucic V. Effects of different dietary regimes alone or in combination with standardized Aronia melanocarpa extract supplementation on lipid and fatty acids profiles in rats. *Mol Cell Biochem*. 2019; 461:141-150.
5. Jakovljevic V, Milic P, **Bradic J**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2018; 20(1). pii: E6.

4. Научна област дисертације

Стоматологија, Медицина

5. Научна област чланова комисије

1. Доц. др Раша Младеновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, председник;
2. Доц. др Ана Барјактаревић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан;
3. Проф. др Биљана Божин, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакогнозија и фитотерапија, члан;

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидаткиња др Миона Вулетић испуњава све услове прописане Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука да приступи изради докторске дисертације.

Комисија је утврдила да се ради о оригиналном научном делу које има за циљ да испита ефекат екстракта надземног дела биљке *Galium verum L.* на карактеристике рекурентног афтозног стоматитиса код пацова. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија је јасна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидаткиње др Мионе Вулетић: „ Ефекти формулација на бази *Galium verum L.* у терапији афтозног стоматитиса код пацова“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:


Доц. др Раша Младеновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Дечја и превентивна стоматологија, председник



Доц. др Ана Барјактаревић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан



Проф. др Биљана Божин, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Фармакогнозија и фитотерапија, члан



У Крагујевцу, _____ 2022. године