

ИЗВЈЕШТАЈ
О ОЦЈЕНИ ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ И КАНДИДАТА
ЗА ИЗРАДУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Одлуком Научно-наставног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци број: 18-3-905/2012. од 3.12.2012. године именована је Комисија за оцјену подобности теме и кандидата **мр сци др мед. Миладе Налесник**, за израду докторске тезе под називом:

„Биомаркери оксидативног стреса, инфламације и ендотелне дисфункције у *diabetes mellitus-u* тип 2“.

Чланови Комисије за оцјену подобности теме и кандидата су:

1. Др Злата Мујагић, ванредни професор, ужа научна област Медицинска биохемија, Фармацеутски факултет Универзитета у Тузли, предсједник;
2. Др Јасминка Николић, редовни професор, ужа научна област Медицинска биохемија, Медицински факултет Универзитета у Бањалуци, члан;
3. Др Љиљана Лакић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Бањалуци, члан.

Комисија за оцјену подобности теме и кандидата у наведеном саставу прегледала је материјал пријаве теме за израду докторске тезе кандидата мр сци др мед. Миладе Налесник и подноси слиједећи

И З В Ј Е Ш Т А Ј

1. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ, НАУЧНА И СТРУЧНА ДЈЕЛАТНОСТ КАНДИДАТА

• **Основни биографски подаци, дипломе и звања**

Милада Налесник рођена 15.06.1973. године у Бањалуци.
Адреса: Медицински факултет у Бањалуци, улица Саве Мркаља 14,
Бањалука
Телефон: +387 65 255 485
Телефакс: +387 51 234 123
Е-mail адреса: milada.nalesnik@gmail.com

Дипломе и звања

Основну школу и Гимназију завршила је у Бањалуци.

Основне студије:

Назив институције: Медицински факултет Универзитета у Бањалуци

Мјесто и година завршетка: Бањалука, 1999. године

Наслов дипломског рада: „Хормони штитне жлијезде у хроничној бубрежној инсуфицијенцији“, под менторством Проф. др Љиљане Лакић

Постдипломске студије:

Назив институције: Медицински факултет Универзитета у Бањалуци
Мјесто и година завршетка: Бањалука, децембар 2008. године
Наслов магистарског рада: „Каталитичке активности укупне и изоензимских форми аденозин деаминазе у реуматоидном артритису“,
под менторством Проф. др Јасминке Николић
Ужа научна област: Медицинска биохемија

Специјализација:

Назив институције: Медицински факултет Универзитета у Бањалуци
Мјесто и година завршетка: Бањалука, 2010. године
Ментор током специјалистичког стажа: Проф. др Славица Јандрић
Диплома: специјалиста физикалне медицине и рехабилитације

Избори у наставна и научна звања:

Медицински факултет Универзитета у Бањалуци: асистент, 2002. године
Медицински факултет Универзитета у Бањалуци: виши асистент, 2009. године

Професионално искуство:

ЈЗУ Дом здравља Бањалука, 1999.-2002. године
Медицински факултет Универзитета у Бањалуци, 2002. године - сад
Ужа научна област: Медицинска биохемија

Чланство у научним и стручним организацијама и удружењима:

Члан Коморе доктора медицине Републике Српске
Члан удружења физијатара Републике Српске

• **Библиографија**

Магистарски рад

„Каталитичке активности укупне и изоензимских форми аденозин деаминазе у реуматоидном артритису“,

Оригинални научни радови у часопису међународног значаја

1. Mehanović Nikolić J, Laloš-Miljuš J, **Stajčić-Nalesnik M**, Lakić Lj, Bobić Ž, Bogdanić J, Vajić N. The diagnostic value of anti-cyclic citrullined peptide antibodies, adenosine deaminase activity and other potential biomarkers for predicting and monitoring rheumatoid arthritis. J Med Biochem. 2008; 27 (3): 383-8.
2. **Nalesnik M**, Mehanović Nikolić J, Jandrić S. Adenosine deaminase and C-reactive protein in diagnosing and monitoring of rheumatoid arthritis. Medicinski glasnik. 2011; 8 (1): 163-8.
3. **Nalesnik M**, Mehanović Nikolić J, Bućma T. Adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis and monitoring of rheumatoid arthritis. J Med Biochem. 2012; 31(3): 217-21.

Оригинални научни радови у часопису од националног значаја

1. Uletilović S, Saničanin Ž, **Nalesnik M**. Spektrofotometrijsko određivanje nivoa oksalata u urinu. Glasnik hemičara i tehnologa Republike Srpske. 2003; 44: 421-5.

Радови у зборнику радова међународног научног скупа, штампани у цјелини

1. **Nalesnik M**, Mehanović Nikolić J. Comparison of methods of determining the catalytic activity of adenosine deaminase isoenzyme forms. Second congress of pharmacists of Bosnia and Herzegovina with International Participation 17-20. novembar 2011. Banjaluka. Zbornik radova: 420-2.

Радови у зборнику радова националног научног скупа, штампани у цјелини

1. **Nalesnik M**, Mehanović Nikolić J. Terapijski principi i laboratorijsko praćenje reumatskih bolesti u dječijem uzrastu. Dvanaesti simpozijum farmaceuta i biohemičara Republike Srpske 07.-10. oktobar 2010. Teslić. Zbornik radova: 104-8.
2. Bućma T, Sladojević I, **Nalesnik M**, Grubiša-Vujasinović S, Popović D. Optimalno vrijeme za početak rehabilitacije nakon hirurškog liječenja hernije diska lumbosakralnog segmenta kičmenog stuba. Drugi kongres doktora medicine Republike Srpske 26.-29. maj 2011. Banja Vrućica, Teslić. Zbornik radova 25-9.
4. Bućma T, Sladojević I, **Nalesnik M**, Grubiša-Vujasinović S, Gajić D Primjena opšteg i specifičnog kineziterapijskog programa kod pacijenata nakon operacije diskus hernije. 4. Kongres fizijatara Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem 19.-22. septembar 2012. Banjaluka. Zbornik radova: 75-6.

Универзитетски помоћни уџбеник

1. Nikolić J, Vukanović B, **Nalesnik M**. Priručnik za praktičnu i seminarsku nastavu iz medicinske biohemije i hemije, Banjaluka 2010.
2. Nikolić J, Vukanović B, **Nalesnik M**. Priručnik za praktičnu i seminarsku nastavu iz medicinske biohemije i hemije, Banjaluka 2012.

Пројекти

1. Jandrić S, Nikolić J, Laloš-Miljuš, Aksentić V, Krčum B, **Nalesnik M**. Biohemijski markeri u dijagnosticiranju i praćenju osteoporoze i reumatoidnog artritisa. Ministarstvo nauke i tehnologije Republike Srpske, 2005. – saradnik na projektu.
2. Mehanović Nikolić J, Laloš-Miljuš J, Lakić Lj, **Stajčić-Nalesnik M**, Bogdanić J, Vajić N. Novi aspekti laboratorijske dijagnostike reumatoidnog artritisa. Ministarstvo nauke i tehnologije Republike Srpske, 2007. – saradnik na projektu.

2. ЗНАЧАЈ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА „Биомаркери оксидативног стреса, инфламације и ендотелне дисфункције у *diabetes mellitus-u* тип 2“

• Значај истраживања

Основне стратегије контроле ДМ тип 2 су превенција, рана дијагноза и системско праћење терапије. Обзиром да је оксидативни стрес доминантни покретач атеросклерозе, као макроваскуларне компликације ДМ тип 2, праћење биомаркера

оксидативног стреса је веома значајно за правилан терапијски третман и бољу контролу болести. Аутор пројекта ове докторске тезе је адекватним избором више биохемијских маркера повезао оксидативни стрес, инфламацију и ендотелну дисфункцију, које карактеришу DM тип 2. Недовољан је број истраживања оваквог типа, а нарочито везаних за мијелопероксидазу (Myeloperoxidase, MPO), прооксидативни ензим, који се ослобађа из азурофилних гранула, инфламацијом активираних леукоцита, моноцита и макрофага. Тако ослобођени ензим, као дио урођеног имуног система одбране, доводи до стварања слободних радикала и реактивних кисеоничних врста. MPO може проузроковати оксидативна оштећења ендотела крвних судова, што потврђује да повећана активност овог ензима дјелује атерогено. Обзиром да значајну улогу у развоју атеросклеротских лезија има инфламаторни одговор, у потпуности је оправдано одређивања hsCRP (High-sensitivity C-reactive Protein), као високо осјетљивог биомаркера инфламације и субклиничке атеросклерозе у DM. Пројекат докторске тезе укључује и одређивање укупног антиоксидативног капацитета плазме обољелих од DM тип 2, као и утврђивање атерогених индекса у пацијената са и без терапије статинима. Значај овог истраживања огледа се у томе да ће дати смјернице за правовремено укључивање медикаментне хиполипемичне терапије. Смјернице засноване на доказима, тј. одређивању утврђених биомаркера, вишеструко су значајне за обољеле од DM тип 2, јер одлука љекара о укључивању хиполипемичне терапије, осим очекиваног смањења кардиоваскуларног ризика, може да има и низ нежељених ефеката.

- **Преглед истраживања**

Најновији статистички подаци показују да ће глобална преваленца *diabetes mellitus*-а (DM), процијењена на 366 милиона обољелих у 2011. години, порастати на 522 милиона до 2030. године [1, 2].

Diabetes mellitus је стање хроничне хипергликемије, узроковане заједничким дјеловањем генетских и многобројних фактора спољашње средине. Настаје услед апсолутног и релативног недостатка инсулина, који доводе до поремећаја метаболизма угљених хидрата, липида и протеина [3,4]. DM се манифестује карактеристичном клиничком сликом, а у току болести се прогресивно развијају промјене на крвним судовима у виду атеросклерозе и микроангиопатије [3]. Основна етиолошка класификација подразумјева постојање: тип 1 DM, тип 2 DM, других специфичних облика DM и гестацијског DM [5]. Тип 1 DM је аутоимуна болест, коју карактерише губитак β -ћелија панкреаса, што доводи до потпуног дефицита инсулина. На тип 1 DM односи се 5-10 % новооткривених случајева годишње [3]. Тип 2 DM карактерише инсулинска резистенција и дисфункција β -ћелија панкреаса, као и много већа заступљеност у одраслој популацији, тако да је 90-95 % новооткривених случајева тип 2 DM [3]. Упркос доступности различитих класа оралних хипогликемика и примјени различитих терапијских стратегија, инциденца микроваскуларних (нефропатија, ретинопатија и неуропатија) и макроваскуларних компликација DM (атеросклероза коронарних, церебралних и периферних крвних судова) је и даље у сталном порасту [6]. Основни узроци смрти, код око 70 % обољелих од DM су управо макроваскуларне компликације, а процјењује се и да је животни вијек ових болесника краћи за 8-10 година [2].

Почетак оба типа DM, као и њихов ток, те развој компликација условљен је настанком оксидативног стреса, који је посљедица повећане производње слободних радикала и смањеног капацитета антиоксидативне заштите у овој болести [7].

Оксидативни стрес је биохемијски механизам, којим поремећен метаболизам глукозе и дисрегулација ћелијске сигнализације у DM индукују ендотелну дисфункцију и доводе до развоја његових микро- и макроваскуларних компликација [8], од којих је управо убрзана атеросклероза, као што је већ претходно истакнуто, основни узрок морбидитета и морталитета ове метаболичке болести [9].

За правовремено превентивно и терапијско дјеловање на развој ендотелне дисфункције, као раног стадијума атеросклерозе у DM, неопходни су поуздани биомаркери и боље разумијевање патофизиолошких механизма развоја компликација ове болести.

Превенција, рана дијагноза и систематско праћење терапије чине основне стратегије контроле DM тип 2 [10]. Унаточ добро дефинисаним терапијским третманима DM типа 2, у већине обољелих, болест је слабо контролисана [11,12]. То је разлог све већег интереса истраживача за идентификацијом фактора који би могли бити одговорни за слабу контролу DM тип 2.

Резултати бројних истраживања указују на улогу оксидативног стреса у различитим стадијумима развоја DM тип 2, почевши од преддијабетесног стадијума, смањења толеранције глукозе, постпрандијалне хипергликемије и коначно развијеног DM [12,13]. Истовремено, оксидативни стрес се сматра и доминантним покретачем атеросклерозе, као макроваскуларне компликације DM тип 2, тако да би праћење биомаркера оксидативног стреса могло бити од велике користи за постављање правилног терапијског третмана и боље контроле болести [14, 15].

Недавна истраживања указују да би мијелопероксидаза (MPO) могла послужити као поуздан биомаркер не само оксидативног стреса, већ и инфламације и ендотелне дисфункције у DM тип 2 [16-22]. MPO је прооксидативни ензим, који се ослобађа из азурофилних гранула, инфламацијом активираних леукоцита, моноцита и макрофага. Тако ослобођени ензим, као дио урођеног имуног система одбране доводи до стварања слободних радикала и реактивних кисеоничних врста [23]. MPO је једини ензим у људском организму, који катализује реакцију настанка хипохлорне киселине (HOCl) и других реактивних врста са антимикуробном активношћу [20]. Међутим, ова антимикуробна активност MPO може проузроковати оксидативна оштећења ендотела крвних судова, што потврђује да повећана активност овог ензима дјелује атерогено [24]. Постоји неколико механизма, којим MPO доприноси настанку и развоју ендотелне дисфункције и атеросклерозе у DM:

- MPO активност доводи до оксидације холестерола у липопротеинима мале густине (LDL-cholesterol), а повећање његове концентрације је атерогено [24,25].
- MPO-индукована оксидација холестерола у липопротеинима велике густине (HDL-cholesterol) редукује капацитет за реверзни транспорт холестерола.
- Активност MPO доводи до потрошње, у ендотелу створеног, азот-мооксида (NO), што узрокује поремећај вазодилатације крвних судова, агрегацију тромбоцита, активацију леукоцита и као последицу настанак атеросклеротског плака и развој ендотелне дисфункције, која се, као компликација у DM тип 2 јавља врло рано [24-26].
- MPO, уз помоћ HOCl, активира латентне облике матриксних металопротеиназа (MMP-7, 8 и 9), при чему је MMP-7 изузетно важна за контролу деградације структурних протеина матрикса и настанак дестабилизације и руптуре атеросклеротског плака [27].

Као што је претходно, већ поменуто у DM тип 2 долази не само до повећања производње слободних радикала (који нападају и оштећују протеине, липиде, угљене хидрате и нуклеинске киселине, нарушавајући бројне ћелијске функције), већ и до смањења капацитета антиоксидативне заштите. Бројне студије указују на

значајно смањење капацитета антиоксидативне заштите у обољелих од DM тип 2 [28-32]. Постоје три основна механизма антиоксидативне заштите [33]. Први ниво обухвата системе антиоксидативне заштите, који спречавају стварање слободних радикала. Други ниво одбране подразумијева активирање система у условима физиолошког и појачаног стварања слободних радикала, а чине га ензимски и неензимски антиоксиданси. Ензимски антиоксиданси (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, глутатион-трансфераза) чине примарну антиоксидативну заштиту, док неензимски антиоксиданси (глутатион, витамин Е, витамин С, каротеноиди, флавоноиди, церулоплазмин, трансферин, лактоферин, албумин, билирубин, мокраћна киселина, мелатонин, полиамини) представљају секундарну линију одбране. Трећи ниво антиоксидативне заштите чине ензимски антиоксиданси, који учествују у репарацији насталих оксидативних оштећења липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина [33]. Један од наших циљева биће испитивање секундарне (неензимске) линије другог нивоа антиоксидативне заштите у крви обољелих од DM тип 2. Она није једноставан збир различитих антиоксидативних супстанци, већ динамичан систем међусобно зависних појединачних серумских антиоксидативних параметара [34].

Значајну улогу у настанку, развоју и еволуцији атеросклеротских лезија има инфламаторни одговор, што указује на потребу одређивања hsCRP, као високо сензитивног биомаркера инфламације и субклиничке атеросклерозе у DM [35-37].

Иако у патогенези атеросклерозе у DM тип 2 учествује велики број патогенетских фактора, још увијек се дијабетесна дислипидемија, као специфичан поремећај метаболизма липида, сматра главним катализатором атеросклеротског процеса [38]. Дијабетесна дислипидемија подразумијева квантитативне и квалитативне промјене липидних фракција у DM тип 2: хипертриглицеридемију, хиперхолестеролемију са смањеном концентracијом HDL-cholesterola [39].

Према Првом европском водичу за третман дислипидемија, објављеном 2011. године, обољели од DM типа 2 или типа 1 са микроалбуминуријом, аутоматски се сврставају у болеснике са врло високим или високим укупним кардиоваскуларним ризиком [40], што указује на потребу раног и праводбног лијечење дислипидемија у DM и то не само нефармаколошким терапијским мјерама (престанак пушења, смањење тјелесне тежине, смањење уноса соли, повећање тјелесних активности), већ и примјеном хиполипемика, као што су статини [41, 42]. Резултати више клиничких студија су показали, да примјена статина у болесника са DM тип 2 смањује кардиоваскуларни ризик:

- побољшавајући ендотелну функцију повећањем биорасположивости азот-мооксида (прије било каквог значајнијег смањења вриједности концентрације холестерола)
- смањујући вриједности концентрација укупног и LDL-холестерола
- стабилизујући атероматозни плак, својим антиинфламаторним (смањење нивоа инфламаторног маркера hs-CRP) и анти тромботичким дјеловањем
- смањујући оксидативни стрес (помоћу холестерол-независних антиоксидативних ефеката) [43, 44].

- **Радна хипотеза са циљевима истраживања**

Радна хипотеза

Одређивање и праћење вриједности каталитичких активности MPO и параметара укупног антиоксидативног капацитета у обољелих од DM тип 2 може омогућити

правовремено укључивање медикаментне хиполипемичне терапије и значајно успорити развој макроваскуларних компликација DM тип 2.

Циљеви истраживања су:

- Одредити вриједности каталитичких активности мијелопероксидазе (MPO) у плазми обољелих од DM тип 2 са и без терапије статинима.
- Одредити вриједности укупног антиоксидативног капацитета у плазми обољелих од DM тип 2 са и без терапије статинима.
- Одредити вриједности високо сензитивног C-реактивног протеина (hsCRP) у серумима обољелих од DM тип 2 са и без терапије статинима.
- Утврдити постојање корелације вриједности MPO и дужине трајања DM тип 2
- Утврдити постојање негативне корелације вриједности MPO и укупног антиоксидативног капацитета у обољелих од DM тип 2 са и без терапије статинима.
- Утврдити постојање корелације вриједности MPO и hsCRP у обољелих од DM тип 2 са и без терапије статинима.
- Утврдити атерогене индексе у обољелих од DM тип 2 са и без терапије статинима: укупни holesterol/ HDL-holesterol, LDL-holesterol/ HDL-holesterol, trigliceridi/ HDL-holesterol.

Радна хипотеза и циљеви истраживања су јасно дефинисани и издвојени.

• Материјал и методе рада:

1. Материјал

1.1. Испитаници

Истраживање ће бити проспективна студија, којом би било обухваћено 80 дислипидемичних испитаника обољелих од DM тип 2. У истраживање ће бити укључени испитаници са потврђеном дијагнозом DM тип 2 у трајању најмање годину дана. Дијагнозу DM тип 2 ће поставити специјалисти интерне медицине, субспецијалисти ендокринолози. Сви испитаници би били на одговарајућем хигијенско-дијететском режиму, који обухвата промјену начина живота и исхране уз редовну терапију оралним хипогликемицима и услов да нису користили препарате витамина и медикаментну хиполипемичну терапију у посљедња 3 мјесеца.

Испитаници ће бити подијељени у 2 групе у односу на тип хиполипемичне терапије:

Група 1 ће обухватати 40 испитаника, оба пола, обољелих од DM тип 2 са медикаментном хиполипемичном терапијом - статинима, старости од 18 до 65 година.

Група 2 ће обухватати 40 испитаника, оба пола, обољелих од DM тип 2 без медикаментне хиполипемичне терапије, старости од 18 до 65 година.

Период праћења испитаника трајаће 4 мјесеца, након чега ће бити процјењена успјешност терапијске промјене начина живота и медикаментне хиполипемичне терапије статинима.

Терапијска промјена начина живота обухватаће дијететски режим за регулацију гликемије, концентрације липида и тјелесне тежине, а физичка активност ће бити препоручена сходно годинама живота, полу и стању осталих физичких способности

испитаника.

Критеријуми за искључивање из студије ће бити: обољели од DM тип 2 са знацима кетозе, кетоацидозом, хиперосмоларним некетонским стањем, лактатном ацидозом и хипогликемијом, обољели од DM тип 2 са акутним и хроничним инфламаторним болестима, малигнитетима, реналном инсуфицијенцијом, тежим обољењима јетре, системским болестима везивног ткива, обољели са прележаним инфарктом миокарда током посљедњих годину дана и реваскуларизацијом миокарда, обољели који су прележали цереброваскуларни инсулт, као и обољели са комбинованом терапијом инсулином и оралним хипогликемичима.

Истраживање ће се провести на Клиници за ендокринологију Клиничког центра Бањалука и Медицинском факултету Универзитета у Бањалуци.

1.2. Узорци

Узорци крвне плазме и серума свих испитаника биће узети наташте (период гладовања 12 сати), у дубликату и смрзнути на -80°C до извођења биохемијских анализа. Први узорци крвне плазме и серума испитаника узимаће се на почетку истраживања, а контролни након 4 мјесеца провођења терапијских процедура.

2. Методе рада

2.1. Објективни налаз

Антропометријска мјерења и израчунавање стања ухрањености:

- Мјерење тјелесне масе у килограмима и тјелесне висине испитаника у центиметрима.
- Одређивање индекса тјелесне масе (Body mass index–BMI) испитаника и класификација стања ухрањености према препорукама Свјетске здравствене организације (44).

Клиничка мјерења: мјерење вриједности систолног и дијастолног крвног притиска живиним манометром, на лијевој надлактици, у три узастопна мјерења, при чему ће бити узета средња вриједност.

2.2. Биохемијске анализе

- Свим испитаницима биће одређен квалитет гликорегулације на основу јутарње гликемије и гликемије 2 сата након јела (концентрације глукозе у крви) и концентрације гликозилираног хемоглобина ($\text{HbA}_{1\text{c}}$) у крви.
- Свим испитаницима биће одређена брзина седиментације еритроцита (SE), комплетна крвна слика (KKS): број еритроцита, тромбоцита, леукоцита; еритроцитне константе – MCV (mean cell volume – просјечна запремина еритроцита), MCH (mean cell hemoglobin – просјечна количина хемоглобина у еритроциту), MCHC (mean cell hemoglobin concentration – просјечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита), RDW (red cell distribution width – мјера варијабилности величине еритроцита); тромбоцитне константе - MPV (mean platelet volume – просјечна запремина тромбоцита), PDW (platelet distribution width – ширина расподјеле тромбоцита); диференцијална леукоцитарна формула (неутрофили, моноцити, еозинофили, базофили, лимфоцити); хемоглобин и хематокрит.

- Свим испитаницима биће одређени слиједећи биохемијски параметри: фибриноген, феритин, укупни капацитет везивања гвожђа (ТIBC), албумин, билирубин, уреа, креатинин, мокраћна киселина, јонограм, протеинограм.
- Свим испитаницима биће одређене вриједности концентрација параметара липидног статуса: укупни, HDL- holesterol, LDL- holesterol и триглицериди у крвном серуму, те ће се на основу њихових вриједности израчунати атерогени индекси: укупни holesterol/ HDL- holesterol, LDL- holesterol/ HDL- holesterol, trigliceridi/ HDL- holesterol.
- За искључивање болести јетре биће одређене биохемијске анализе слиједећих ензима: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), gama glutamiltransferaze (γ -GT), alkalne fosfataze (ALP). Испитаницима ће бити урађен ултразвучни преглед горњег абдомена.
- За искључивање кардиоваскуларних болести биће одређене биохемијске анализе срчано-мишћних ензима: kreatin kinaze (CK), laktat dehidrogenaze (LDH). Испитаницима ће бити урађен електрокардиограм (ЕКГ), рентгенографски снимак плућа (Rtg-plućа) и по потреби урађена компјутеризована томографска ангиографија (СТ-angiografija) крвних судова доњих екстремитета.
- За искључивање болести бубрега биће одређене биохемијске анализе урина: рутински преглед урина (тест трака и микроскопски преглед), укупни протеини у 24-часовном урину, албумин у 24-часовном урину, клиренс креатинина.
- За искључивање дијабетесне ретинопатије биће урађен комплетан офталмолошки преглед укључујући и преглед очног дна.
- За искључивање дијабетесне неуропатије биће урађен неуролошки преглед и elektromioneurografija (EMNG).
- Свим испитаницима биће одређене вриједности каталитичких активности mijeloperoksidaze (MPO) у крвној плазми, хемилуминесцентним микропартикуларним имуноесејем (CMIA– chemiluminescent microparticle immunoassay) уз употребу Architect i2000SR instrument, Abbott Diagnostics.
- Свим испитаницима биће одређене вриједности укупног антиоксидативног капацитета у крвној плазми комерцијалним китом Randox Laboratories LTD, United Kingdom, на анализатору Olympus AU2700.
- Свим испитаницима биће одређене вриједности концентрација високо сензитивног C-reaktivnog proteina (hsCRP) у крвном серуму, комерцијалним китом за Mercodia ELISA assay (Mercodia AB, Uppsala, Sweden).

3. План рада

3.1. Прва фаза

Избор пацијента за истраживање, клиничка, антропометријска мјерења и прикупљање узорака крвне плазме и серума, уз поштивање постављених критеријума за искључивање из истраживања. Први узорци крвне плазме и серума испитаника узимаће се на почетку истраживања, а контролни узорци, након 4 мјесеца провођења терапијских процедура. У узорцима серума, плазме и урина, на почетку истраживања биће урађене слиједеће лабораторијске анализе и клиничка мјерења:

- Квалитет гликорегулације на основу јутарње гликемије и гликемије 2 сата након јела (концентрације глукозе у крви) и концентрације гликозилираног хемоглобина (HbA_{1c}) у крви.

- Брзина седиментације еритроцита (SE), комплетна крвна слика (KKS): број еритроцита, тромбоцита, леукоцита; еритроцитне константе—MCV (mean cell volume – просјечна запремина еритроцита), MCH (mean cell hemoglobin – просјечна количина хемоглобина у еритроциту), MCHC (mean cell hemoglobin concentration—просјечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита), RDW (red cell distribution width – мјера варијабилности величине еритроцита); тромбоцитне константе - MPV (mean platelet volume – просјечна запремина тромбоцита), PDW (platelet distribution width – ширина расподеле тромбоцита); диференцијална леукоцитарна формула (неутрофили, моноцити, еозинофили, базофили, лимфоцити); хемоглобин и хематокрит.
 - Биохемијски параметри: фибриноген, феритин, укупни капацитет везивања гвожђа (ТIBC), албумин, билирубин, уреа, креатинин, мокраћна киселина, јонограм, протеинограм.
 - За искључивање болести јетре биће одређене биохемијске анализе слиједећих ензима: aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), gama glutamiltransferaze (γ -GT), alkalne fosfataze (ALP). Испитаницима ће бити урађен ултразвучни преглед горњег абдомена.
 - За искључивање кардиоваскуларних болести биће одређене биохемијске анализе срчано-мишћних ензима: kreatin kinaze (CK), laktat dehidrogenaze (LDH). Испитаницима ће бити урађен електрокардиограм (ЕКГ), рентгенографски снимак плућа (Rtg-pluća) и по потреби урађена компјутеризована томографска ангиографија (СТ-angiografija) крвних судова доњих екстремитета.
 - За искључивање болести бубрега биће одређене биохемијске анализе урина: рутински преглед урина (тест трака и микроскопски преглед), укупни протеини у 24-часовном урину, албумин у 24-часовном урину, клиренс креатинина.
 - За искључивање дијабетесне ретинопатије биће урађен комплетан офталмолошки преглед укључујући и преглед очног дна.
 - За искључивање дијабетесне неуропатије биће урађен неуролошки преглед и elektromioneurografija (EMNG).
 - Одређивање вриједности концентрација параметара липидног статуса: ukupni, HDL- holesterol, LDL- holesterol и триглицериди у крвном серуму и израчунавање атерогених индекса: ukupni holesterol/ HDL- holesterol, LDL- holesterol/ HDL- holesterol, trigliceridi/ HDL- holesterol.
- Узорци крвне плазме и серума биће чувани на -80°C.

3.2 Друга фаза (након 4 мјесеца праћења испитаника)

У другој фази истраживања биће одређени доле набројани биохемијски параметри у узорцима крвног серума и плазме узетим на почетку истраживања и у узорцима крвног серума и плазме истих испитаника након 4 мјесеца праћења терапијских ефеката.

- Биохемијске анализе вриједности каталитичких активности МРО у крвној плазми, вриједности концентрација укупног антиоксидативног капацитета у крвној плазми и вриједности концентрација hsCRP у крвном серуму испитаника
- Квалитет гликорегулације на основу јутарње гликемије и гликемије 2 сата након јела (концентрације глукозе у крви) и концентрације гликозилираног хемоглобина (HbA_{1c}) у крви.
- Биохемијски параметри: фибриноген, феритин, укупни капацитет везивања гвожђа

- (ТІВС), албумин, билирубин, уреа, креатинин, мокраћна киселина.
- Одређивање вриједности концентрација параметара липидног статуса: ukupni, HDL- holesterol, LDL- holesterol и триглицериди у крвном серуму и израчунавање атерогених индекса: ukupni holesterol/ HDL- holesterol, LDL- holesterol/ HDL- holesterol, trigliceridi/ HDL- holesterol.

3. Статистичка обрада добијених података

Формирање одговарајуће базе података са подацима о испитаницима и вриједностима појединачних испитивања биће извршено одмах након започињања студије. Нумерички подаци дескриптивне статистике биће приказани као средње вриједности \pm стандардна девијација. За тестирање статистичке значајности разлика у дистрибуцији вриједности посматраних биомаркера, у посматраним групама испитаника, примјењиваће се χ^2 - квадрат тест. У случају да у појединим пољима табеле контингенција фреквенце буде мања или једнака 5, примјењиваће се Фишеров тест. При тестирању средњих вриједности посматраних група испитаника примјењиваће се Студентов t тест.

Статистичка обрада података биће извршена програмом Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 16.0. [SPSS Inc., Chicago, IL, USA]. Вриједност $p < 0,05$ ће се сматрати статистички значајном.

- **Научни допринос истраживања** „Биомаркери оксидативног стреса, инфламације и ендотелне дисфункције у *diabetes mellitus*-и тип 2“

Новија научна сазнања указују да су основни узроци смрти, у око 70 % оболелих од DM, макроваскуларне компликације (атеросклероза коронарних, церебралних и периферних крвних судова) и да је животни вијек ових болесника краћи за 8-10 година. Овакви забрињавајући подаци захтјевају адекватна истраживања, која ће унаприједити превентивно и терапијско дјеловање на развој ендотелне дисфункције, као раног стадијума атеросклерозе у DM. Циљеви ове докторске тезе, усмјерени ка изналажењу поузданих биохемијских маркера оксидативног стреса, инфламације и ендотелне дисфункције у DM тип 2, не дају само допринос развоју терапијске стратегије у DM, већ имају и научни значај, јер доприносе бољем разумијевању патофизиолошких механизма развоја компликација ове болести.

- **Цитирана литература у поглављу преглед истраживања, материјал и методе рада:**

1. Whiting DR, Guariguata L, weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 94: 311-21.
2. Rao HRG, Thethi I, Fareed J. Vascular disease: obesity and excess weight as modulators of risk. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011; 9 (4): 525-34
3. Ristić MS. Stefanovićev udžbenik Interna medicina II. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd 1996: 1282.
4. ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2011; 34 (1): S62-9.
5. Ekspertski tim za dijabetes. Nacionalni vodič za diabetes mellitus. Ministarstvo zdravlja i

- socijalne zaštite Republike Srpske. 2004: 27.
6. Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87 (1): 15-9.
 7. Pavlović D, Đorđević V, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija–modulacija slobodnim radikalima. *J Med Biochem* 2002; 21 (2): 69-84.
 8. Bakić M. Patogenetski aspekti ateroskleroze. *Acta Medica Medianae.* 2007; 46 (1): 25-9.
 9. Basta G, Schmidt AM, De Catarina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research.* 2004; 63: 582-92.
 10. Sanal TS, Nair NS, Adhikari P. Factors associated with poor control of type 2 diabetes mellitus: A sistematic review and Meta-analysis. *Journal of Diabetology.* 2011; 3 (1): 1-10
 11. Home P. The challenge of poorly controlled diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 2003; 29: 101-9.
 12. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodski GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes.* 2003;52 (1): 1-8.
 13. Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction . *Pflugers Arch.* 2010; 460 (4): 703-18.
 14. Đukić M. Oksidativni stres: Kliničko-dijagnostički značaj. *Mono i Manjana.* 2008: 76-9.
 15. Đukić M. Oksidativni stres: Slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. *Mono i Manjana.* 2008: 18-23.
 16. Meuwese CM, Stroes SGE, Hazen LS, van Miert NJ, Kuivenhofen AJ et al. Serum myeloperoxidase leveles are associated with the future risk of coronary artery disease in apperently healthy individuals. *L Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 159-65.
 17. Brevetti G, schiano V, Laurenzano E, Giugliano G, Petretta M et al. Myeloperoxidase, but not C-reactive protein, predicts cardiovascular risk in peripheral arterial disease. *Eur Heart J.* 2008; 29:224-30.
 18. Michowitz Y, Kisil S, Guzner-Gur H, Rubinstein A, Wexler D et al. Usefulness of serum myeloperoxidase in prediction of mortality in patients with severe heart failure. *IMAJ* 2008; 10: 884-8.3
 19. Tang WHW, Katz R, Breman ML, Aviles JR, Tracy PR et al. Usefulness of myeloperoxidase leveles in healthy elderly subjectst to predict risk of developing heart failure. *Am J Cardiol.* 2009; 103 (9): 1269-74.
 20. Stanković S, Majkić-Singh N. Myeloperoxidase: new roles for an old molecule. *J Med Biochem.* 2011; 30:230-6.
 21. Karakas M, Koenig W, Zierer , Herder C, Rottbauer W et al. Myeloperoxidase is associated with incident coronary heart disease independently of traditional risk factors: results from the MONICA/KORA Augsburg study. *J Intern Med.* 2012; 271: 43-50.
 22. Stanković S, Asanin M, Trifunović D, Majkić-Singh N, Ignjatović S et al. Time – dependent changes of myeloperoxidase in relation to in hospital mortality in patients with the first anterior ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention. *Clinical Biochemistry.* 2012;45: 547-51.
 23. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77 (5): 598-625.
 24. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994; 94 (1): 437-44.
 25. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science.* 2002; 28; 296 (5577): 2391-4.
 26. Vita JA, Breannan ML, Gokce N et al. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2004; 31; 110 (9): 1134-9.

27. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). *J Biol Chem* 2001; 276: 41279-87.
28. Đorđević G, Đurić S, Apostolski S, Đorđević V, Živković M. Total antioxidant blood capacity in patients with type 2 diabetes mellitus and distal symmetrical polyneuropathy. *Vojnosanit Pregl.* 2008; 65 (9): 663-9.
29. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabet metab.* 2000; 26 (3): 163-76.
30. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1997; 27 (6): 484-90.
31. Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE et al. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism.* 1999; 48 (11): 1414-7.
32. Valabbiji J, McColl AJ, Richmond W, Schachter M, Rubens MB, Elkeles RS. Total antioxidant status and coronary artery calcification in diabetes. *Diabetes Care.* 2001; 24 (9): 1608-13.
33. Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. Biohemija slobodnih radikala. *Medicinski fakultet Niš.* 2000: 88-135.
34. Verna S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* 2002; 105 (16): 1890-6.
35. Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, Ballam L, Morris J, Sweetnam PM et al. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J.* 2000; 21 (19): 1584-90.
36. Ridker PM: Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003; 107 (3): 362-9.
37. Savić T, Tasić I, Veljković N, Janković D, Rašić-Popović M. Kardiovaskularni rizik i kontrola lipidnog statusa u sekundarnoj prevenciji. *Srce i krvni sudovi* 2011; 30 (40): 210-9.
38. Jovović B, Lečić N, Ilić G, Jelić M, Damnjanović G i dr. Dislipidemija i oksidativni stres u dijabetesu - kumulativni uticaj na pojavu koronarne bolesti srca. *Acta Medica Medianae.* 2005; 44 (4): 35-42.
39. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J.* 2011; 32: 1769-1818.
40. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002; 360: 7-22.
41. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004; 364: 685-96.
42. Đinđić B, Ranković G, Živić M, Savić T, Spasić M, Bubanj M. Gender difference in lipopemic and anti-inflammatory effects of statins in diabetics with coronary artery disease. *Vojnosanit Pregl.* 2009; 66 (12): 966-72.
43. Fabjanović D. Statins in general. *Medicus* 2010; 19 (2): 147-61
44. Mlinar B, Marc J, Pfeifer M. Molekularni mehanizmi inzulinske rezistencije, pretilosti i metaboličkog sindroma. *Biochemia medica* 2006; 16 (1): 8-24.

3. ОЦЈЕНА И ПРИЈЕДЛОГ

На основу увида у рад кандидата, приложену документацију, биографију и библиографију, закључујемо да кандидат мр сци др мед. Милада Налесник испуњава све услове за одобрење теме за израду докторске дисертације у складу са прописима, а посебно чланом 58, Закона о универзитету и Статутом Универзитета у Бањалуци.

Кандидат мр сци др мед. Милада Налесник је вриједан и цијењен члан Катедре за Медицинску биохемију на Медицинском факултету у Бањалуци. Поред педагошког искуства у раду са студентима, као магистар медицинских наука има истраживачко искуство у научно-истраживачким пројектима и клиничко искуство, које је остварила као специјалиста физикалне медицине и рехабилитације. Све наведено, као и садржај пријаве докторске дисертације, указују да је кандидат у потпуности квалификован за стручни и научни рад.

Предложена тема је актуелна и недовољно истражена. Радна хипотеза и постављени циљеви су јасно дефинисани и дају реалну могућност добијања значајних и оригиналних резултата, који су апликативни у свакодневној пракси превенције и лијечења *diabetes mellitus*-а тип 2. Изабране технике су доступне и омогућавају добијање поузданих и валидних резултата.

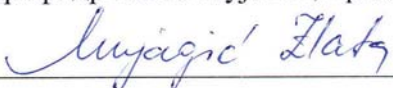
На основу свега изложеног, Комисија за оцјену подобности кандидата и теме докторске дисертације упућују позитивну оцјену Наставно-научном вијећу Медицинског факултета у Бањалуци и Сенату Универзитета у Бањалуци и са задовољством предлажу да се позитивна оцјена прихвати и одобри тема под насловом

**„Биомаркери оксидативног стреса, инфламације
и ендотелне дисфункције у *diabetes mellitus*-у тип 2“,**

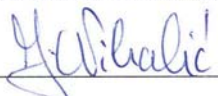
те покрене даљи поступак израде докторске дисертације мр сци др мед. Миладе Налесник.

Потписи чланова Комисије:

Проф. др Злата Мујагић, председник



Проф. др Јасминка Николић, члан



Проф. др Љиљана Лакић, члан



Тузла, Бањалука, 14.12. 2012. године