



ИЗВЈЕШТАЈ
о оцјени урађене докторске дисертације

І ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу члана 149. Закона о високом образовању Републике Српске (Службени гласник Републике Српске бр. 67/20), члана 54. Статута Универзитета у Бањој Луци и члана 18. Статута Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, Научно-наставно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци на редовној сједници одржаној 13.05.2022. године донијело је Одлуку бр. 18/3.424/2022 о именовану Комисије за оцјену урађене докторске дисертације мр сц. мед. Милкице Грабеж, под називом "Утицај полифенола из екстракта коре нара на кардиометаболичке параметре код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2" у саставу:

1. др Ранко Шкрбић, редовни професор, ужа научна област Фармакологија и токсикологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, предсједник;
2. др Нађа Васиљевић, редовни професор, ужа научна област Хигијена, Медицински факултет Универзитета у Београду, члан;
3. др Весна Рудић Грујић, доцент, ужа научна област Хигијена, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан;
4. др Тања Шобот, доцент, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан;
5. др Сњежана Поповић-Пејичић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан;
6. др Милорад Вујнић, ванредни професор, ужа научна област Патолошка физиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, резервни члан;

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

- 1) Милкица, Драго, Грабеж
- 2) Рођена 15.08.1978. године, Кључ, Босна и Херцеговина
- 3) Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, Постдипломски студиј "Биомедицинска истраживања", магистар медицинских наука
- 4) Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, "Процјена уноса натријума у студентској популацији Универзитета у Бањој Луци",
- 5) Научна област: Хигијена, датум одбране: 01.03.2013. године

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр сц. мед. Милкице Грабеж је: "Утицај полифенола из екстракта коре нара на кардиометаболичке параметре код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2"

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Научно-наставног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, Одлуком бр. 18/3.413/2018 донесеном 11.06.2018. године, а Сенат Универзитета у Бањој Луци је Одлуком бр. 02/04-3.1780-75/18 донесеном 28.06.2018. године дао сагласност на Извјештај Комисије за оцјену подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације на Медицинском факултету, мр сц. мед. Милкице Грабеж под називом: " Утицај полифенола из екстракта коре нара на кардиометаболичке параметре код пацијената са тип 2 дијабетес мелитусом".

За ментора је именована др Нађа Васиљевић, редовни професор, ужа научна област Хигијена, Медицински факултет Универзитета у Београду, а за коментора др Весна Рудић Грујић, доцент, ужа научна област Хигијена, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци.

Докторска дисертација кандидата мр сц. мед. Милкице Грабеж је написана латиничним писмом, фонтом *Times New Roman* величина слова 12 *pt*, са проредом 1.5, на 99 страна, формат А4. На почетку дисертације налази се 8 страна које нису нумерисане, а односе се на насловну страну докторске дисертације на српском и енглеском језику, резиме на српском и енглеском језику и садржај. На крају дисертације се налази 8 нумерисаних страна а које садрже:

- Биографију кандидата,
- Листу скраћеница,
- Потписану Изјаву о ауторству,

- Потписану Изјаву, којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да се докторска дисертација учини јавно доступном
- Потписану Изјаву о аутентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације
- *Addendum* у коме су приказана 4 научна рада из ове области у којима је кандидат аутор.

Дисертација садржи 20 слика и 19 табела. У дисертацији је цитирано 215 литерарних извора.

Урађена докторска дисертација је представљена у сљедећих 8 поглавља:

1. Увод, написан на 17 страна;
2. Радне хипотезе, написане на 1 страни;
3. Циљеви истраживања, написани на 1 страни;
4. Испитаници и методе, написани на 15 страна;
5. Резултати, приказани на 30 страна;
6. Дискусија, написана на 12 страна;
7. Закључци, написани на 2 стране;
8. Литература, написана на 21 страни.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У првом поглављу (**Увод, стр. 1-17**) су описани полифеноли као биоактивне фитохемикалије и наведена је њихова подјела, као и најзначајнији нутритивни извори. Приказан је садржај фитохемикалија које су присутне у нару и представљени су здравствени ефекти нара (хипогликемијски, хипотензивни, хиполипемички, антиоксидативни и анти-инфламаторни ефекат) кроз преглед резултата претходних истраживања из ове области.

У уводном дијелу је описан и дијабетес мелитус тип 2 (лат. *Diabetes mellitus tip 2; DMТ2*), као водећи глобални јавноздравствени проблем, за који су дати најновији епидемиолошки подаци. Приказани су важећи дијагностички критеријуми и класификација дијабетеса.

Такође, представљени су патофизиолошки механизми настанка кардиометаболичких поремећаја у дијабетес мелитусу, који представљају ризик за настанак компликација овог обољења.

Посебна пажња је посвећена улози гојазности у развоју инсулинске резистенције. Јасно су приказани патофизиолошки механизми фактора кардиометаболичког ризика, као и развоја хроничне инфламације ниског степена и оксидативног стреса.

Полифеноли су перспективни кандидати у развоју савремених терапеутских приступа у лијечењу дијабетеса, управо због способности да дјелују на различите патофизиолошке механизме.

У другом поглављу (**Радне хипотезе, стр. 18**) представљене су радне хипотезе истраживања:

1. Основна претпоставка истраживања је да перорална примјена 500 *mg* екстракта коре нара утиче на кардиометаболичке параметре код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2.
2. Перорална примјена екстракта коре нара утиче на смањење параметара оксидативног стреса код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2.
3. Перорална примјена екстракта коре нара утиче на смањење параметара инфламације код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2.

У трећем поглављу (**Циљеви истраживања, стр. 19**) су јасно формулисани циљеви истраживања:

1. Испитати утицај полифенола из екстракта коре нара на метаболичке параметре код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2:
 - 1а). Утицај на тјелесну композицију пацијента са *DMT2* одређивањем антропометријских показатеља: индекс тјелесне масе (енгл. *Body mass index; BMI*), обим струка (*OS*) и проценат масног ткива;
 - 1б). Утицај на квалитет гликорегулације одређивањем вриједности гликозилираног хемоглобина у крви, хомостатског модела инсулинске резистенције (*HOMA-IR*); индекса инсулинске сензитивности (*QUICKI*) и триглицерид-глукоза индекса;
 - 1ц). Утицај на вриједности систолног и дијастолног крвног притиска;
 - 1д). Утицај на биомаркере липидног статуса: укупни холестерол, *HDL* холестерол (енг. *High-density lipoprotein; HDL*), *LDL* холестерол (енг. *Low-density lipoprotein; LDL*) триглицериди (*TG*) и профил масних киселина.
2. Испитати утицај полифенола из екстракта коре нара на биомаркере оксидативног стреса и хомоцистеина код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2.
3. Испитати утицај полифенола из екстракта коре нара на биомаркере инфламације код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2.

Кратак преглед претходних истраживања и литературе

Нар (*Punica granatum L.*) је природан извор полифенола, који своје потенцијалне терапеутске ефекте испољавају кроз антиоксидативни, антиинфламаторни, хипогликемијски, хиполипидемијски и антимикробни учинак (1,2). Истраживања су показала да 92 % антиоксидативне активности плода нара потиче из једињења која се налазе у кори нара (3). Хипогликемијски ефекат екстракт коре нара до сада се испитивао у *in vitro* и у анималним студијама. Након 10 дана примјене екстракта сока нара у дози од 200 mg/kg, утврђено је снижење гликемије на таште, повећање вриједности инсулинемије и активности α -амилазе код мишева са индукованим дијабетесом (4). Сличне резултате су добили и *Middha* и сарадници који су користили ниже дозе (75 mg/kg и 150 mg/kg) код дијабетичних пацова, али је интервентни период трајао 6 седмица (5). Показан је повољан ефекат сока нара код хипертензивних пацијената и здравих особа (6,7) иако су кориштене различите дозе (330 mL/дан и 150 mL/дан) и различита дужина интервентног периода. Досадашњи резултати истраживања у којима је кориштен сок или екстракт сока нара, нису били конзистентни у погледу хиполипидемијског ефеката, што се може објаснити примјеном различите дозе сока нара и/или различитим интервентним периодом (8,9,10,11). Као могући механизми хиполипидемијског учинка, предложени су инхибиција синтезе липида и инхибиција липолизе (12-14). Такође, позитиван учинак нара на садржај масног ткива и тјелесну композицију која је показана код предгојазних пацијената, има значајну улогу у побољшању липидног статуса (15). Дијетарне интервентне студије су показале да дуготрајна конзумација сока нара доводи до повећања антиоксидативног капацитета код здравих испитаника (16). *Aviram* и сарадници су још 2000. године показали да сок нара у дневној дози од 50 mL након двије седмице има антиоксидативни учинак код здравих особа (17). Екстракт коре нара је показао значајну антиоксидативну активност код мишева (18). Резултати каснијих истраживања, проведених међу пацијентима са *DM* су потврдили антиоксидативни потенцијал нара (19-20). Истраживања у којима су се пратили ефекти конзумације сока нара на медијаторе запаљења су показали снижење *IL-6* и *hsCRP* код пацијената са *DMT2*, док резултати у погледу утицаја на *TNF- α* нису били конзистентни (4,5,21-23). *Kamali* и сарадници су 2015. године објавили резултате плацебо контролисане студије код пацијената са инфламаторном болести цријева у којој је кориштен екстракт коре нара и показали антиинфламаторно дејство (24).

Дијабетес мелитус јесте један од водећих јавно-здравствених проблема данашњице, чија преваленција је у сталном порасту. Према подацима Међународног удружења за дијабетес (енг. *International Diabetes Federation; IDF*) за 2021. годину, 10.5 % свјетске популације живи са овим обољењем, а процјењује се да су компликације *DMT2* одговорне за 12.2 % свих смртних исхода (25). Компликације *DMT2* представљају значајно оптерећење за здравствени

систем и трошкови лијечења су порасли четири пута у односу на период прије петнаест година (25,26). Већина пацијената са дијабетесом је гојазна и/или је присутна висцерална гојазност (27). Инсулинска резистенција (*IR*) је основно обиљежје *DMT2*, која је удружена са скупом метаболичких поремећаја (гојазност, висцерална гојазност, дислипидемија, хипертензија и ендотелијална дисфункција). Кардиометаболички чиниоци имају кумулативни ефекат и могу бити предиктор коронарне болести срца (28). Кардиометаболички чиниоци присутни у патофизиологији настанка *DMT2* су предиктори за настанак кардиоваскуларних болести, као најчешће компликације овог обољења (29,30). Масно ткиво се понаша као метаболички активан орган и има значајну улогу у пропагацији *IR* и развоју инфламације ниског степена (27). Присутна је хипертофија адипоцита, коју прати хипоксија, услед које долази до некрозе адипоцита и посљедичне инфилтрације моноцита и ослобађања проинфламаторних цитокина и концентрације слободних масних киселина (31,32). Око 70% посто обољелих од дијабетеса има хипертензију (33) и дислипидемију (34). Хронична инфламација ниског степена уз истовремено присуство оксидативног стреса насталог због хипергликемије (35,36) повећава стварање ангиотензина II, водећи до поремећаја активације ренин-ангиотензин система и посљедичне хипертензије (37). Повећање нивоа циркулишућих слободних масних киселина смањује активност липопротеинске липазе и повећава вриједност *TG*, повећавајући катаболизам *HDL-C* уз истовремено повећање нивоа *LDL-C* (38). У основи у патофизиологији развоја *DMT2* постоји интеракција између инсулинске резистенције, хроничне инфламације ниског степена и оксидативног стреса (28).

Узевши у обзир претходно приказане резултате студија о здравственим ефектима полифенола из нара усмјерених на смањење инсулинске резистенције, инфламације ниског степена и прооксидативне параметре, проистекло је питање да ли суплементација екстракта коре нара може остварити повољне ефекте на кардиометаболичке чиниоце, присутне код пацијената са *DMT2*.

Литература:

1. Melgarejo-Sánchez P, Núñez-Gómez D, Martínez-Nicolás JJ, Hernández F, Legua P, Melgarejo P. Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: a review. *Bioresour. Bioprocess* 2021;8(2):29.
2. Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez J. Pomegranate and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010;9(6):635–54.
3. Magangana TP, Makunga NP, Fawole OA, Opara UL. Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*punica granatum L.*) peel waste: A review. *Molecules* 2020;25(20):1–34.

4. Parmar HS, Kar A. Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *BioFactors* 2007;31(1):17–24.
5. Middha SK, Usha T, Pande V. Pomegranate peel attenuates hyperglycemic effects of alloxan-induced diabetic rats. *EXCLI J.* 2014;13(2008):223–4.
6. Asgary S, Sahebkar A, Afshani MR, Keshvari M, Haghjooyjavanmard S, Rafieian-Kopaei M. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endothelial function improving, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. *Phyther Res* 2014;28(2):193–9.
7. Lynn A, Hamadeh H, Leung WC, Russell JM, Barker ME. Effects of Pomegranate Juice Supplementation on Pulse Wave Velocity and Blood Pressure in Healthy Young and Middle-aged Men and Women. *Plant Foods Hum Nutr* 2012;67(3):309–14.
8. Fenercioglu AK, Saler T, Genc E, Sabuncu H, Altuntas Y. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *J Endocrinol Invest* 2010;33(2):118–24.
9. Manthou E, Georgakouli K, Deli CK, Sotiropoulos A, Fatouros IG, Kouretas D, et al. Effect of pomegranate juice consumption on biochemical parameters and complete blood count. *Exp Ther Med* 2017;14(2):1756–62.
10. Sadeghipour A, Eidi M, Ilchizadeh Kavvani A, Ghahramani R, Shahabzadeh S, Anissian A. Lipid lowering effect of *punica granatum* L. Peel in high lipid diet fed male rats. *Evid Based Complement Altern Med* 2014;2014:432650.
11. Hamoud S, Hayek T, Volkova N, Attias J, Moscoviz D, Rosenblat M, et al. Pomegranate extract (POMx) decreases the atherogenicity of serum and of human monocyte-derived macrophages (HMDM) in simvastatin-treated hypercholesterolemic patients: A double-blinded, placebo-controlled, randomized, prospective pilot study. *Atherosclerosis* 2014;232(1):204–10.
12. Lv O, Wang L, Li J, Ma Q, Zhao W. Effects of pomegranate peel polyphenols on lipid accumulation and cholesterol metabolic transformation in L-02 human hepatic cells: Via the PPAR γ -ABCA1/CYP7A1 pathway. *Food Funct* 2016;7(12):4976–83.
13. Hou C, Zhang W, Li J, Du L, Lv O, Zhao S, et al. Beneficial Effects of Pomegranate on Lipid Metabolism in Metabolic Disorders. *Mol Nutr Food Res* 2019;63(16):e1800773.
14. Zhao W, Li J, He X, Lv O, Cheng Y, Liu R. In vitro steatosis hepatic cell model to compare the lipid-lowering effects of pomegranate peel polyphenols with several other plant polyphenols as well as its related cholesterol efflux mechanisms. *Toxicol Rep* 2014;1:945–54.
15. AlMatar M, Islam MR, Albari O, Var I, Koksai F. Pomegranate as a Possible Treatment in

- Reducing Risk of Developing Wound Healing, Obesity, Neurodegenerative Disorders, and Diabetes Mellitus. *Mini Rev Med Chem* 2017;18(6):507–26.
16. Drózdź P, Šėžienė V, Pyrzyńska K. Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Extracts from Wild Blueberries and Lingonberries. *Plant Foods Hum Nutr* 2017;72(4):360–4.
 17. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5):1062–76.
 18. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem* 2002;50(17):4791–5.
 19. Betanzos-Cabrera G, Guerrero-Solano JA, Martínez-Pérez MM, Calderón-Ramos ZG, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Pomegranate juice increases levels of paraoxonase 1 (PON1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet. *Food Res Int* 2011;44(5):1381–5.
 20. Sohrab G, Angoorani P, Tohidi M, Tabibi H, Kimiagar M, Nasrollahzadeh J. Pomegranate (*Punica granatum*) juice decreases lipid peroxidation, but has no effect on plasma advanced glycated end-products in adults with type 2 diabetes: A randomized double-blind clinical trial. *Food Nutr Res* 2015;59(8):28551.
 21. Gharib E, Kouhsari SM. Study of the antidiabetic activity of *Punica granatum* L. Fruits aqueous extract on the alloxan-diabetic wistar rats. *Iran J Pharm Res* 2019;18(1):358–68.
 22. Barathikannan K, Venkatadri B, Khusro A, Al-Dhabi NA, Agastian P, Arasu MV, et al. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. *BMC Complement Altern Med* 2016;16(1):264.
 23. Shishelbor F, Shahi MM, Zarei M, Saki A, Zakerkish M, Shirani F, et al. Effects of concentrated pomegranate juice on subclinical inflammation and cardiometabolic risk factors for type 2 diabetes: A quasi-experimental study. *Int J Endocrinol Metab* 2016;14(1):e33835.
 24. Kamali M, Tavakoli H, Khodadoost M, Daghighzadeh H, Kamalinejad M, Gachkar L, et al. Efficacy of the *Punica granatum* peels aqueous extract for symptom management in ulcerative colitis patients. A randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Complement Ther Clin Pract* 2015;21(3):141–6.
 25. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 10th* [Internet]. 10th ed. Brussels Belgium: International Diabetes Federation, 2021. [cited 2021 Nov 19]; Available from: www.diabetesatlas.org
 26. Gjelsvik B, Tran AT, Berg TJ, Bakke Å, Mdala I, Nøkleby K, et al. Exploring the

- relationship between coronary heart disease and type 2 diabetes: a cross-sectional study of secondary prevention among diabetes patients. *BJGP Open* 2019;3(1):bjgpopen18X101636.
27. Banday MZ, Sameer AS, Nissar S. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna J Med* 2020;10(4):174–88.
28. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: The missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010;53(7):1270–87.
29. Łoboz-Rudnicka M, Jaroch J, Kruszyńska E, Bociąga Z, Rzyckowska B, Dudek K, et al. Gender-related differences in the progression of carotid stiffness with age and in the influence of risk factors on carotid stiffness. *Clin Interv Aging* 2018;13:1183–91.
30. Golabi S, Ajloo S, Maghsoudi F, Adelipour M, Naghashpour M. Associations between traditional and non-traditional anthropometric indices and cardiometabolic risk factors among inpatients with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *J Int Med Res* 2021;49(10):3000605211049960.
31. Barbu E, Popescu MR, Popescu AC, Balanescu SM. Inflammation as A Precursor of Atherothrombosis, Diabetes and Early Vascular Aging. *Int J Mol Sci* 2022;23(2):963.
32. Ellulu MS, Samouda H. Clinical and biological risk factors associated with inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord* 2022;22(16):2022.
33. Gyberg V, Bacquer D, Backer G, Jennings C, Kotseva K, Mellbin L, et al. Patients with coronary artery disease and diabetes need improved management: A report from the EUROASPIRE IV survey: A registry from the EuroObservational Research Programme of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Diabetol* 2015;14(1):133.
34. Abdissa D, Hirpa D. Dyslipidemia and its associated factors among adult diabetes outpatients in West Shewa zone public hospitals, Ethiopia. *BMC Cardiovasc Disord* 2022;22(1):39.
35. Pasupuleti VR, Arigela CS, Gan SH, Salam SKN, Krishnan KT, Rahman NA, et al. A review on oxidative stress, diabetic complications, and the roles of honey polyphenols. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:8878172.
36. Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol* 2019;70(6):809–24.
37. Pavlou DI, Paschou S, Anagnostis P, Spartalis M, Spartalis E, Vryonidou A, et al. Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. *Maturitas*. 2018;112:71–7.
38. Parhofer KG. Interaction between glucose and lipid metabolism: More than diabetic dyslipidemia. *Diabetes Metab J* 2015;39(5):353–62.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

У четвртом поглављу (Материјал и методе, стр. 20-34) материјал и метода рада који су кориштени у овој докторској дисертацији усклађени су са постављеним циљевима и описани на 15 страна. Методе кориштене у овом истраживању су савремене и одговарајуће.

Истраживање је проведено у два циклуса. У првом циклусу, који је трајао 8 седмица учествовало је 10 здравих испитаника, код којих су се посматрали могући нежељени ефекти екстракта коре нара. Други циклус је проведен као моноцентрична, двоструко слијепа, рандомизована, плацебо-контролисана студија на Универзитетском клиничком центру Бања Лука. Сви испитаници су добровољно учествовали у истраживању и прије укључивања у истраживање потписан је информисани пристанак. Такође сви испитаници су имали могућност да у било ком тренутку могу напустити студију. Ово истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и од стране Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Републике Српске.

Истраживање је проведено у 5 фаза као што је предвиђено у пријави докторске дисертације:

Фаза I- Одабир контролне групе;

Фаза II- Одабир експерименталне групе;

Фаза III- Рандомизација;

Фаза IV- Интервентни период;

Фаза V- Прикупљање и обрада података.

Експерименталну групу је чинило 60 предгојазних / гојазних испитаника обољелих од *DMT2*, животне доби од 40-65 година, којима је дијагноза *DMT2* постављена најкраће годину дана од почетка истраживања и који су испуњавали критеријуме за укључивање у истраживање. Испитаници су блок-рандомизацијом, од стране треће особе подијељени у интервентну и плацебо групу, које су усклађене према полу и доби. Ни истраживач, ни испитаници нису били упознати са подјелом према групи. Интервентна "PoPEx" група ($n=30$), је током интервентног периода од 8 седмица добијала, два пута дневно, капсуле са 250 mg екстракта коре нара, док је "Плацебо" група ($n=30$) у истом периоду добијала визуелно идентичне капсуле плацеба.

Детаљно су описани критеријуми за укључивање и неукључивање у студију, као и критеријуми за искључивање из студије. Подаци о испитаницима су прикупљени уз помоћ анамнезе, клиничког и лабораторијског прегледа. У овом поглављу су описане методе које су кориштене у антропометријској, клиничкој и дијететској процјени, које су вршене на почетку и на крају интервентног периода. Такође, детаљно су описане методе које су кориштене за одређивање биохемијскиг параметара гликорегулације и израчунавање индекса инсулинске

осјетљивости, липидног статуса, биомаркера оксидативног стреса и инфламације. Стандардном биохемијском методом су одређивани биомаркери гликорегулације (% *HbA1C*, гликемија и инсулинемија на таште) и биомаркери липидног статуса (Укупни холестерол, *LDL*- и *HDL*-холестерол и триглицериди). За одређивање профила масних киселина у укупним липидима плазме је кориштена модификована метода по *Glasser*-у. Одређивани су прооксидативни биомаркери оксидативног стреса, као и укупни антиоксидативни капацитет. Одређивање нивоа прооксидативних параметара у плазми је вршен спектрофотометријски: ниво липидне пероксидације (енг. *Tiobarbituric acid reactive substances*; *TBARS*), нитрити (NO_2^-), супероксид анјон (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2). Укупни антиоксидативни капацитет је одређен спектрофотометријски, помоћу комерцијално доступног кита (енг. *Antioxidant Assay Kit, Sigma-Aldrich*). Концентрација хомоцистеина у серуму је одређивана *HPLC* методом (енг. *high performance liquid chromatography*). Код свих испитаника су на почетку и на крају интервентног периода одређени и биомаркери инфламације. Одређивање концентрације цитокина *IL-6* и *TNF- α* је вршено помоћу хуманог цитокин-специфичног *ELISA* есеја (*Human IL-6 DUOSET ELISA Development kit, R & amp; D Systems, USA; Human TNF- α /TNFSF1A DUOSET ELISA Development kit, R & amp; D Systems, USA*), а према упутству произвођача. Ниво *hsCRP* у серуму је вршено ензиматском методом користећи комерцијални кит.

Промена у односу на биохемијске анализе које су предвиђене у пријави ове докторске дисертације, представља увођење израчунавања додатног индекса инсулинске резистенције (Триглицерид-глукоза индекс), који се показао као прецизнија метода одређивања инсулинске резистенције. Такође, додатно су одређени и профил масних киселина у плазми и прооксидативни параметри (NO_2^- , O_2^- и H_2O_2) ради боље поузданости добијених резултата.

Статистичка обрада података је била адекватна. За анализу добијених података кориштене су статистичке методе из домена дескриптивне статистике, статистичког закључивања и динамичке статистике. За испитивање расподеле варијабли кориштен је *Shapiro-Wilk's* тест, а затим су примјењени одговарајући параметријски или непараметријски тестови. За упоређивање разлика између група у учесталости квалитативних варијабли кориштен је *Pearsonov χ^2* тест контингенције. У циљу утврђивања постојања статистички значајне разлике за квантитативне варијабле, између група на почетку интервентног периода, кориштени су *Student's T* тест и *Mann-Whitney U* тест за независне узорке, у зависности од расподеле варијабли. За анализу разлике унутар групе, након интервентног периода кориштени су *paired sample t* тест и *Wilcoxon Signed Rang* тест у зависности од расподеле варијабли. У циљу утврђивања постојања статистички значајне разлике квантитативних варијабли различитих група кориштена је *mixed ANOVA*, а као непараметријска алтернатива *Bruner* и *Langer* тест. *Cohen's* тест је кориштен за испитивање снаге статистичке значајности. За утврђивање корелације (степен повезаности) између нумеричких варијабли кориштени су *Pearson-ov*

коэффициент корелације и *Spearman*-ов коэффициент ранк корелације у зависности од расподјеле података. За статистичку обраду података кориштен је софтверски пакет *IBM SPSS* (Верзија 20; *IBM Chicago, IL, USA*).

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

У петом поглављу (Резултати, стр. 35-64) су приказани резултати дисертације на 30 страна. Добијени резултати су анализирани у шестом поглављу (Дискусија, стр. 65-76), које је јасно и прегледно написано на 12 страна при чему су добијени резултати истраживања приказани упоредно са резултатима претходних истраживања из ове области.

Кратак преглед добијених истраживања:

Резултати првог циклуса истраживања, које се односило на осмоседмичну примјену екстракта коре нара (*RoPEx*) код здравих испитаника су показали да није било забиљежених споредних ефеката примјене *RoPEx-a*.

У другом, експерименталном циклусу истраживања, након обраде демографских података утврђено је да се "*RoPEx*" група и "Плацебо" група нису статистички значајно разликовале у односу на пол, доб, дужину трајања *DMT2*, дужину трајања терапије метформином, као ни у погледу доби у којој је постављена дијагноза.

Резултати анализе података који су се односили на животни стил и навике, као и процијењени енергетски унос испитаника на почетку и крају истраживања, а који могу имати утицај на посматране кардиометаболичке параметре су показали да није било статистички значајне разлике унутар група. Анализа антропометријских карактеристика пацијената показала је да је осмоседмична суплементација *RoPEx-ом* довела до статистички значајног смањења ОС ($p < .001$) у поређењу са "Плацебо групом. Такође, примјеђено је и смањење нивоа висцералне масти и процента масног ткива у "*RoPEx*" групи, које није достигло ниво статистичке значајности. Након интервентног периода, у "*RoPEx*" групи је утврђено статистички значајно снижење % *HbA1C* ($p < .001$), док се вриједност % *HbA1C* није значајно мијењала у "Плацебо" групи. Остали параметри гликорегулације (гликемија и инсулинемија наташте) и инсулинске сензитивности се нису мијењали ни у једној групи. Анализа индекса инсулинске резистенције показала је да је примјена *RoPEx-a* резултовала статистички значајним снижењем триглицерид-глукоза индекса ($p < .001$) и тенденцијом пада *HOMA- IR* у "*RoPEx*" групи. Код пацијената у "*RoPEx*" групи, након периода суплементације измјерене су статистички значајно ниже вриједности систолног и дијастолног крвног притиска ($p = .003$ и $p = .006$), док је у исто вријеме у "Плацебо" групи дошло до статистички значајног повећања систолног крвног притиска ($p = .030$). Такође, уочене су и значајне промјене липидног статуса након примјене *RoPEx-a*. Регистровано је статистички значајно снижење појединачних параметара липидног статуса (Укупни холестерол, $p = .049$; *LDL-C*, $p = .045$ и триглицериди, $p < .001$), као и односа *LDL-C* и *HDL-C*. Истовремено, уочено је и статистички значајно

повећање вриједности *HDL-C* ($p < .001$), док код пацијената који су користили плацебо није било статистички значајних промјена. Резултати истраживања показују да су у групи која је током 8 седмица добијала *PoPEx*, уочене и статистички значајне промјене профила масних киселина у укупним липидима плазме. Уочено је смањење заступљености засићених масних киселина (палмитинске, $p < .05$; стеаринске, $p < .05$; и укупних засићених масних киселина, $p < .01$). У "Плацебо" групи нису примјећене промјене у профилу масних киселина. Промјене профила масних киселина у "*PoPEx*" групи су довеле и до смањења односа *n-6/n-3* незасићених масних киселина који је значајан маркер стања инфламације.

Интеракција између степена оксидативног стреса и хроничне инфламације ниског степена заузима значајну улогу у прогресији *DMT2* и настанку његових компликација. Послије осмоседмичне суплементације *PoPEx-ом*, утврђено је статистички значајно снижавање вриједности хомоцистеина ($p < .001$) и прооксидативних параметара (*TBARS*, $p < .001$; NO_2 , $p < .001$; и O_2 , $p < .001$), док је истовремено дошло до повећања укупног антиоксидативног капацитета (*TAC*) $p < .001$. Међутим, на крају интервентног периода, примјећена је и тенденција раста *TAC* код пацијената који су добијали плацебо, који се може довести у везу са начином исхране у вези са годишњим добом у ком је провођено истраживање. Ова претпоставка је тестирана и *mixed ANOVA* тестом за поновљена мјерења. Примјена *PoPEx-а* резултовала је статистичким значајним смањењем параметара инфламације код *DMT2* пацијената у порођењу са базалним вриједностима (*hsCRP*, $p = .010$; *IL-6*, $p = .018$; и *TNF- α* , $p = .002$). Код пацијената који су током интервентног периода добијали плацебо, примјећена је тенденција раста свих инфламаторних параметара, ако та промјена није достигла ниво статистичке значајности. Како постоји интеракција између степена оксидативног стреса и параметара инфламације, испитивана је и повезаност између промјена маркера оксидативног стреса и промјена параметара инфламације. Код испитаника у "*PoPEx*" групи, утврђена је статистички значајна негативна корелација између промјене Δ *TAC-а* и промјена вриједности параметара инфламације (Δ *hsCRP*, $p = .002$; Δ *IL-6*, $p = .029$; и Δ *TNF- α* , $p = .034$).

Резултати истраживања су приказани на прегледан начин и у сагласности су са постављеним циљевима истраживања. У поглављу Дискусија, кандидаткиња је показала објективан и критички став у процјени и тумачењу добијених резултата, као и у компарацији са резултатима других аутора из ове области, користећи најсвјеренију литературу.

Резултати ове докторске дисертације проширују претходна знања о кардиометаболичким факторима и значају оксидативног стреса и хроничне инфламације у патофизиологији развоја дијабетес мелитуса. Такође, резултати указују да осмоседмична примјена полифенола из екстракта коре показује антиоксидативно и антиинфламаторно дјеловање и на тај начин могу имати протективни ефекат на патолошка стања у чијој основи се налазе оксидативни стрес и

хронична инфламација.

Ова докторска дисертација својим предметом и проблематиком указује на могућу примјену фитохемикалија, као додатне терапије у лијечењу дијабетеса. Узевши у обзир да је упркос доступности и примјени различитих терапијских стратегија, преваленција *DMT2* у сталном порасту као и раст инциденције компликација дијабетеса, а самим тим и трошкови лијечења. Финансијска издвајања за лијечење дијабетеса представљају значајно оптерећење и за појединца, али и за здравствени систем, при томе због смањења радне способности настају у индиректни трошкови.

Представљени резултати указују на потребу будућих мултицентричних истраживања, са већим бројем испитаника. Поред тога, будуће рандомизоване студије да би се испитали ефекти полифенола из коре нара и њихов потенцијални учинак на улогу адипокина и адипоцита код гојазних особа, а такође ради даљег разјашњавања молекуларних механизма антиоксидативног и протективног дјеловања *RoPEx-a* и његових компоненти у циљу потенцијалног дјеловања у дијабетесу.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ


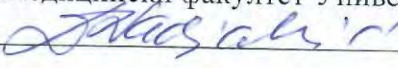
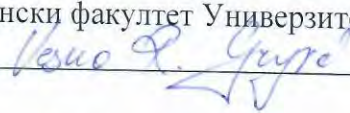
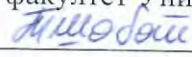
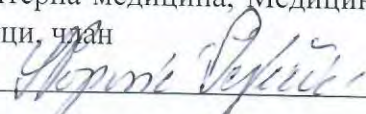

Докторска дисертација мр сц. мед. Милкице Грабеж, под насловом „Утицај полифенола из екстракта коре нара на кардиометаболичке параметре код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2“ урађена је према одобреној пријави теме и принципима израде научноистраживачког рада, те представља оригинално и самостално дијело кандидата.

Докторска дисертација по својој свеобухватности, добијеним резултатима и изнијетим закључцима представља оригинални допринос медицинској научној мисли и сагледавању значаја функционалне хране као додатне терапије дијабетес мелитуса. Резултати ове докторске дисертације и описани ефекти екстракта коре нара на кардиометаболичке параметре отварају могућност за изналажење нових терапеутских агенаса и говоре у прилог примјени екстракта у исхрани. Расвјетљавање механизма којим екстракт коре нара и/или појединачне компоненте екстракта и њихови метаболити доприносе смањењу оксидативног стреса и инфламације код пацијената са дијабетесом представља нови изазов за истраживаче у области дијабетологије и дијететике. Управо због раста преваленције *DMT2* и честих компликација ове болести постоји потреба за развојем ефикасне стратегије превенције и смањења настанка компликација болести. Гледано кроз однос цијена/учинак, велики потенцијал постоји у правилно осмишљеним дијетарним интервенцијама посебно истичући значај исхране богате полифенолима.

Имајући у виду остварене резултате, Комисија предлаже Научно-наставном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци да усвоји Извјештај и позитивну оцјену докторске дисертације мр сц. мед Милкице Грабеж под насловом: „Утицај полифенола из екстракта коре нара на кардиометаболичке параметре код пацијената са дијабетес мелитусом тип 2“ и омогући кандидаткињи јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

Датум: 30. 05. 2022. године

Београд, Бања Лука

1. Др Ранко Шкрбић, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, предсједник

2. Др Нађа Васиљевић, редовни професор, ужа научна област Хигијена, Медицински факултет Универзитета у Београду, члан

3. Др Весна Рудић Грујић, доцент, ужа научна област Хигијена, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан

4. Др Тања Шобот, доцент, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан

5. Др Сњежана Поповић-Пејичић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан

6. Др Милорад Вујнић, ванредни професор, ужа научна област Патолошка физиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, резервни члан


ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложење, односно разлог због којих не жели да потпише извјештај.