

UNIVERZITET U BEOGRADU

Biološki fakultet

Andrea M. Čabarkapa, M.Sc.

**Uticaj etanolnog ekstrakta lista masline
(*Olea europaea* L.) na genomsku
nestabilnost, parametre oksidativnog
stresa i inflamacije kod pacijenata sa
reumatoidnim artritisom**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGARDE
Faculty of Biology

Andrea M. Čabarkapa, M.Sc.

**Effects of ethanolic olive leaf extract
(*Olea europaea* L.) on genomic instability,
parameters of oxidative stress and
inflammation in rheumatoid arthritis
patients**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2016

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Dr Biljana Potparević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Mentor

Dr Marija Savić Veselinović, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Mentor

Dr Lada Živković, docent

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Sunčica Borozan, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Fakultet veterinarske medicine

Dr Biljana Nikolić, docent

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: 30.09.2016.

Zahvalnica:

Ova doktorska disertacija nastala je kao rezultat saradnje laboratorije Centra za biološka istraživanja Katedre za fiziologiju, Farmaceutskog fakulteta, Katedre za opšteobrazovne predmete-hemiju Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, Instituta za reumatologiju, Kliničkog centra Srbije i Instituta za istraživanje i razvoj, Galenike a.d. Zahvalnost izražavam svojim saradnicima, kao i svima koji su doprineli i pomogli u izradi ove disertacije.

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorki, Prof. dr Biljani Potparević za stalnu podršku, podsticanje i ukazano poverenje, kao i prijateljstvo tokom svih godina zajedničkog rada. Zahvaljujem joj na predlaganju teme ove disertacije i neposrednom rukovođenju u eksperimentalnom radu kao i svemu što me je naučila kao mentor. Docentkinji dr Mariji Savić-Veselinović, kao mentoru zahvaljujem na stručnom usmeravanju, pomoći i brojnim savetima prilikom izrade i pisanja distertacije. Svoju veliku zahvalnost izražavam doc. dr sc. Ladi Živković na tome što me je uvela u naučnoistraživačko polje genotoksikologije, na suštinskoj pomoći i savetima u toku čitavog eksperimentalnog rada i tokom pisanja radova i doktorske disertacije.

Izuzetnu zahvalnosti upućujem redovnom profesoru Fakulteta veterinarske medicine, Dr Sunčici Borozan na svesrdnom angažovanju i velikoj požrtvovanosti u eksperimentalnom radu, važnim sugestijama i diskusijama bez kojih ne bi bila moguća izrada ove disertacije, ali i na nesebičnoj podršci, optimizmu i poverenju koje mi je ukazala kao saradnik i kao prijatelj, u svim momentima.

Veliko hvala izražavam Dr Dragani Dekanski iz Instituta za istraživanje i razvoj, Galenike a.d., na neposrednom angažovanju i rukovođenju pri izvođenju farmakološko-toksikoloških ispitivanja, počevši od laboratorijskog rada, preko tumačenja rezultata i izrade publikacija, čime je dala veliki doprinos izradi ove disertacije. Naročitu zahvalnost joj upućujem za iskrenu podršku, ulaganje znanja, vremena i energije tokom naše saradnje.

Zahvalnost upućujem i Dr sc. med. Mirjani Zlatković-Švenda iz Instituta za reumatologiju, Kliničkog centra Srbije, za dugogodičnje angažovanje u izvođenju kliničkih

ispitivanja koje su deo ove disertacije, kao i na njenoj ljubaznosti i pomoći mnogobrojnim korisnim sugestijama.

Naučnom savetniku Dr Vladanu Bajiću zahvaljujem na savetima u toku eksperimentalnog rada, podršci u međunarodnoj saradnji i vrednim diskusijama tokom pisanja radova.

Hvala mojoj koleginici, asistentkinji Dijani Topalović na saradnji i velikoj pomoći u eksperimentalnom radu na disertaciji, ali i na iskrenoj podršci i prijateljstvu.

Zahvaljujem se svojim kolegama, saradnicima i osoblju Farmaceutskog fakulteta kao i predavačima Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na njihovoj pažnji i pomoći koju su mi ukazali u radu.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i mojim prijateljima na razumevanju, strpljenju, bezrezervnoj podršci i ljubavi koju su mi ukazali tokom godina, bez kojih ne bi ni bilo moguće da se bavim naukom.

Njima posvećujem ovaj rad.

Uticaj etanolnog ekstrakta lista masline (*Olea europaea* L.) na genomsku nestabilnost, parametre oksidativnog stresa i inflamacije kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Rezime:

Reumatoidni artritis (RA) predstavlja autoimunska inflamatorno oboljenje, u čijem razvoju ključnu ulogu imaju inflamatorni medijatori i oksidativni stres, koji mogu dovesti do oštećenja biomolekula i nastanka genomske nestabilnosti. Suvi etanolni ekstrakt lista masline (engl. *dry olive leaf extract*, DOLE) je poznat po izuzetnim antioksidativnim, antiinflamatornim i genoprotektivnim dejstvima. Međutim, do sada nisu ispitivani njegovi efekti u terapiji RA.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je poređenje efekata tronedeljne i šestonedeljne kombinovane terapije metotreksatom i DOLE u odnosu na efekte standardne terapije samo metotreksatom, kod pacijenata sa RA. U istraživanju je učestvovalo 8 pacijenata novodijagnostikovanih za RA, 16 pacijenata sa dugotrajnim RA, koji su bili na kombinovanoj terapiji, dok je posebnu grupu činilo 8 novodijagnostikovanih pacijenata na terapiji samo metotreksatom.

Kod sve tri grupe, pre uvođenja eksperimentalne terapije, zabeležen je povišen nivo inflamacije, oksidativnih oštećenja lipida, proteina i DNK, kao i povećana učestalost mikronukleusa u odnosu na vrednosti kod zdravih kontrolnih ispitanika.

Rezultati tronedeljne i šestonedeljne terapije su pokazali da kombinovana primena DOLE i metotreksata daje bolje efekte u odnosu na terapiju samo metotreksatom, pre svega u pogledu efikasnije redukcije primarnih DNK oštećenja, kao i redukcije nivoa interleukina-6, kod pacijenata u ranoj fazi RA. Kombinovana terapija je takođe pokazala efekat u redukciji nitrita kod grupe u ranoj fazi RA i smanjenje lipidne peroksidacije kod dugotrajno obolelih pacijenata. Praćenjem učestalosti mikronukleusa u limfocitima, nisu utvrđeni značajni efekti terapije na nivo genomske nestabilnosti posle šest nedelja.

Pokazani su pozitivni efekti kombinovane terapijske primene metotreksata i DOLE na oksidativna oštećenja ćelija kod pacijenata u ranoj fazi RA, u poređenju sa terapijom samo metotreksatom. Kombinovana terapija je bila efikasnija u ranoj fazi RA, dok su njeni efekti slabije izraženi kod dugotrajnog stanja aktivne bolesti.

Ključne reči: reumatoidni artritis, ekstrakt lista masline, oksidativni stres, genomska nestabilnost, inflamacija, antioksidansi.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK:[[634.63: 635.074]:616-082]:[616-091.8:[577.344: 616.72-002.77]](043.3)

Effects of olive leaf ethanolic extract (*Olea europaea* L.) on genomic instability, parameters of oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis patients

Abstract:

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease and in its development the key features are inflammatory mediators and free radical production, that may result with damage to biomolecules and cause genomic instability. Dry olive leaf extract (DOLE) is known for its exceptional antioxidant, anti-inflammatory and genoprotective effects. However, there are still no data on its effects in the treatment of RA.

The aim of this doctoral thesis was to compare the effects of a three-week and six-week combined treatment with methotrexate and DOLE in comparison with the effects of standard therapy with methotrexate alone, in patients with RA. The study included 8 newly diagnosed RA patients and 16 patients with long-term RA that received concomitant treatment with DOLE and methotrexate, while another group of 8 newly diagnosed RA patients were treated only with methotrexate.

The initial measurements before the introduction of the experimental treatment showed elevated levels of inflammation, oxidative damage to lipids, proteins and DNA, as well as the increased frequencies of micronuclei in all three groups of RA patients compared to healthy controls.

The results of three-week and six-week therapy showed that combined use of methotrexate and DOLE achieved improved effects compared to the methotrexate therapy alone, i.e. in terms of a more rapid reduction of primary DNA damage, as well as by reducing the level of proinflammatory cytokine interleukine 6 (IL-6) in early phase RA patients. Concomitant treatment also showed an effect on reduction of nitrites in patients with early phase RA, and decreasing lipid peroxidation in long-term RA patients. The monitored frequencies of micronuclei in lymphocytes of RA patients, showed no significant effects of treatment on genomic instability after six weeks.

The present study demonstrated beneficial effects of concomitant treatment with methotrexate and DOLE on modulation of oxidative cell damage in early phase RA patients with respect to the effects of standard therapy, methotrexate alone. Combined therapy was more effective in patients with newly-diagnosed RA, while the effects of treatment were less pronounced in long- term active disease.

Key words: rheumatoid arthritis, olive leaf extract, oxidative stress, genomic instability, inflammation, antioxidants.

Scientific field: Biology

Major in: Genetics

UDC: [[634.63: 635.074]:616-082]:[616-091.8:[577.344: 616.72-002.77]](043.3)

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU:

RA – reumatoidni artritis

DOLE – engl. *dry olive leaf extract*, suvi ekstrakt lista masline

CRP – C reaktivni protein

SE – sedimentacija eritrocita

RF – reumatoidni faktor

anti-CCP – engl. *anti-cyclic citrullinated peptide antibodies*, anti-CCP antitela

ROS – engl. *reactive oxygen species*, reaktivne vrste kiseonika

VEGF – engl. *vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni faktor rasta

MAPK – mitogen aktivirane protein kinaze

Nf-kB – nuklearni faktor kappa B

TNF α – engl. *tumor necrosis factor*, faktor nekroze tumora-alfa

IL-1 – interleukin 1

IL-6 – interleukin 6

O₂•• – superoksid radikal

OH• – hidroksil radikal

H₂O₂ – vodonik-peroksid

RNS – engl. *reactive nitrogen species*, reaktivne vrste azota

INF- γ – interferon gama

IL-17 – interleukin 17

MMP – matriks metaloproteinaza

PUFA – engl. *polyunsaturated fatty acids*, polinezasićene masne kiseline

RO• – alkoksilni radikal

ROO• – peroksil radikal

MDA – malondialdehid

4-HNE – 4-hidroksinonenal

SH – sulfhidrilne grupe, protein tioli

DNP – 2,4-dinitrofenilhidrazin

SOD – superoksid dismutaza

CAT – katalaza

8oxoG – 8-hidroksi 2-deoksiguanozin

AP – apurinska mesta

SSB – engl. *single strand breaks*, jednolančani prekidi DNK

DSB – engl. *double strand breaks*, dvolančani prekidi DNK

MN – mikronukleus

NP – nukleusni pupovi

NPM – nukleoplazmatski mostovi

NSAID – engl. *non steroidal antiinflammatory drugs*, nesteroidni anti - inflamatorni lekovi

DMARD – engl. *disease modifying antirheumatic drugs*, antireumatski lekovi koji modifikuju tok bolesti

MTX – metotreksat

DAS 28 – engl. *disease activity score 28*, indeks aktivnosti bolesti

PBS – engl. *phosphate buffer saline*, fosfatni puffer

DPPH – 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

ABTS⁺ – 2,2'-Azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina

FRAP – engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, test ukupne redukcionne moći

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-trizin

VAS – vizuelna analogna skala

PGA – engl. *patient's global assessment of disease activity*, globalna procena pacijenta o aktivnosti bolesti

PGH – engl. *Patient Global Health*, globalno zdravlje pacijenta

PhGA – engl. *Physician Global Assessment of Disease Activity*, globalna procena lekara o aktivnosti bolesti

TJC – engl. *tender joints count*, broj bolnih zglobova

SJC – engl. *swollen joints count*, broj otečenih zglobova

DTNB – 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoeva kiselina

TNB – 5-merkapt-2-nitrobenzoeva kiselina

NO_2^- – nitriti

TBA – tiobarbiturna kiselina

TBARS – engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, reaktivne vrste tiobarbiturne kiseline

LDH – laktat dehidrogenaza

LMA – engl. *low melting point agarose*, agarosa sa niskom tačkom topljenja

SD – standardna devijacija

Sadržaj:

1.	UVOD	1
1.1.	REUMATOIDNI ARTRITIS	1
1.1.1.	Istorijat proučavanja, definicija i kliničke odlike bolesti	1
1.2.	OKSIDATIVNI STRES	4
1.2.1.	Uloga oksidativnog stresa u razvoju reumatoidnog artritisa	4
1.2.2.	Nastanak slobodnih radikala u ćelijama i njihova regulacija	8
1.2.3.	Biomarkeri oksidativnog stresa	9
1.2.3.1.	Biomarkeri oksidacije lipida	11
1.2.3.2.	Biomarkeri oksidacije proteina	12
1.2.3.3.	Biomarkeri oksidativnog oštećenja DNK	16
1.2.4.	Biomarkeri genomske nestabilnosti	19
1.3.	TERAPEUTSKI PRISTUPI U LEČENJU REUMATOIDNOG ARTRITISA	23
1.3.1.	Metotreksat kao standardna klinička terapija	23
1.3.2.	Primena antioksidanasa u terapiji reumatoidnog artritisa	25
1.3.3.	Ekstrakt lista masline	26
1.4.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
2.	MATERIJAL I METODE	30
2.1.	KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA LISTA MASLINE	30
2.2.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNIH AKTIVNOSTI EKSTRAKTA LISTA MASLINE U <i>IN VITRO</i> USLOVIMA	31
2.2.1.	Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala	31
2.2.2.	Određivanje sposobnosti hvatanja ABTS radikala	32
2.2.3.	Određivanje sposobnosti hvatanja ABTS radikala	33
2.3.	ISPITANICI	33
2.4.	DIZAJN EKSPERIMENTA	34
2.5.	METODE ISPITIVANJA	36
2.5.1.	Uzorkovanje biološkog materijala	36
2.5.2.	Određivanje parametara antioksidativne zaštite	37
2.5.2.1.	Određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT) u plazmi	37
2.5.2.2.	Određivanje koncentracije tiolnih grupa (SH) u plazmi	37
2.5.3.	Određivanje parametara oksidativnog oštećenja ćelije	38

2.5.3.1. Određivanje nitrita (NO ₂ ⁻) kao indikatora oksidacije proteina.....	38
2.5.3.2. Određivanje karbonilnih grupa kao indikatora oksidacije proteina.....	39
2.5.3.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) kao produkta lipidne peroksidacije	39
2.5.3.4. Određivanje stepena lipidne peroksidacije preko izoenzimske distribucije enzima laktat-dehidrogenaze.....	40
2.5.4. Određivanje stepena genomske nestabilnosti i pojave DNK oštećenja	41
2.5.4.1. Komet test.....	41
2.5.4.2. Mikronukleus test	43
2.5.5. Određivanje nivoa proinflamatornog citokina IL-6 pomoću ELISA testa.....	44
2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	44
3. REZULTATI.....	45
3. 1. REZULTATI ISPITIVANJA ANTIOKSIDATIVNIH SVOJSTAVA EKSTRAKTA LISTA MASLINE U <i>IN VITRO</i> USLOVIMA.....	45
3.1.1. Analiza sposobnosti hvatanja DPPH radikala.....	45
3.1.2. Analiza sposobnosti hvatanja ABTS radikala.....	46
3.1.3. Analiza ukupne redukcionne sposobnosti primenom FRAP metode.....	46
3. 2. REZULTATI ISPITIVANJA KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM.....	47
3.2.1. DEMOGRAFSKI PODACI, OSNOVNI KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM.....	47
3.2.2. ANALIZA PARAMETARA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM.....	49
3.2.2.1. Nivo aktivnosti enzima katalaze (CAT) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	49
3.2.2.2. Uticaj kombinovane terapije metrotreksatom i ekstraktom lista masline na aktivnost enzima katalaze (CAT) kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	50
3.2.2.3. Koncentracija slobodnih tiolnih grupa u plazmi (SH) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	52
3.2.2.4. Uticaj kombinovane terapije metrotreksatom i ekstraktom lista masline na koncentraciju tiolnih grupa (SH) u plazmi pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	53
3.2.3. ANALIZA PARAMETARA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA ĆELIJE KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM.....	55

3.2.3.1. Indikatori oksidativnog oštećenja proteina (nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	55
3.2.3.1.1. Rezultati koncentracija nitrita (NO ₂ ⁻) pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	55
3.2.3.1.2. Rezultati koncentracija karbonilnih grupa pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	56
3.2.3.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na indikatore oksidativnog oštećenja proteina (nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	57
3.2.3.1.1. Uticaj kombinovane terapije na koncentraciju nitrita (NO ₂ ⁻).....	57
3.2.3.1.2. Uticaj kombinovane terapije na koncentraciju karbonilnih grupa.....	59
3.2.3.3. Indikatori lipidne peroksidacije kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	60
3.2.3.3.1. Rezultati nivoa malondialdehida (MDA).....	61
3.2.3.3.2. Rezultati izoenzimske distribucije enzima laktat-dehidrogenaze..	62
3.2.3.4. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na indikatore lipidne peroksidacije kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	64
3.2.3.4.1. Uticaj kombinovane terapije na nivo malondialdehida (MDA)....	64
3.2.3.4.2. Uticaj kombinovane terapije na izoenzimsku distribuciju enzima laktat-dehidrogenaze.....	65
3.2.4. ANALIZA PARAMETARA GENOMSKE NESTABILNOSTI KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM.....	66
3.2.4.1. Analiza stepena DNK oštećenja kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	66
3.2.4.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na stepen DNK oštećenja.....	68

3.2.4.3. Analiza parametara genomske nestabilnosti pomoću mikronukleus testa kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	70
3.2.4.4. Uticaj kombinovane terapije na genomsku nestabilnost, prikazan pomoću mikronukleus testa.....	72
3.2.5. ANALIZA NIVOVA INFLAMACIJE ODREĐIVANJEM PROINFLAMATORNOG CITOKINA IL-6.....	73
3.2.5.1. Rezultati nivoa proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	73
3.2.5.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	75
4. DISKUSIJA	77
4.1. Antioksidativne sposobnosti ekstrakta lista masline <i>in vitro</i>	83
4.2.1. Analiza nivoa aktivnosti enzima katalaze kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	84
4.2.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo aktivnosti enzima katalaze kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	85
4.3.1. Analiza nivoa slobodnih tiolnih grupa proteina kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	86
4.3.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo slobodnih tiolnih grupa proteina kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	87
4.4.1. Analiza indikatora oštećenja proteina (nivo nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	88
4.4.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na indikatore oštećenja proteina (nivo nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	89

4.5.1. Analiza stepena lipidne peroksidacije preko malondialdehida i aktivnosti izoenzima laktat-dehidrogenaze kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	90
4.5.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline nivo malondialdehida i aktivnost izoenzima laktat-dehidrogenaze kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	92
4.6.1. Analiza nivoa oštećenja DNK kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	93
4.6.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo oštećenja DNK kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	95
4.7.1. Analiza parametara genomske nestabilnosti mikronukleus testom kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	96
4.7.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na parametre genomske nestabilnosti u mikronukleus testu kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	98
4.8.1. Analiza nivoa proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije.....	100
4.8.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.....	101
5. ZAKLJUČAK	102
6. LITERATURA.....	105
DODATAK	133

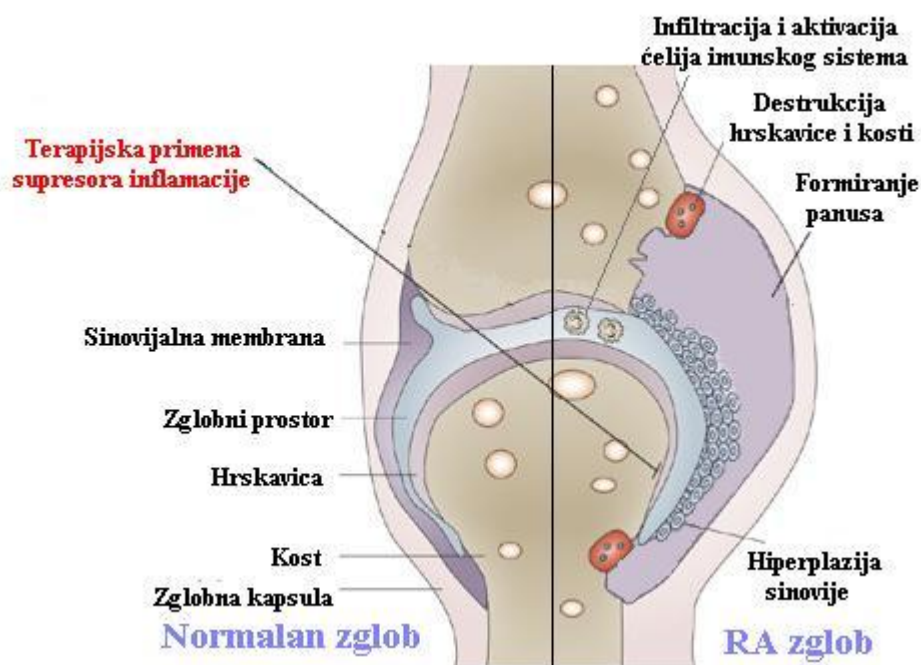
1. UVOD

1.1. REUMATOIDNI ARTRITIS

1.1.1. Istorijat proučavanja, definicija i kliničke odlike bolesti

Reumatoidni artritis (RA) predstavlja autoimunska, sistemska, hronično oboljenje, koje se primarno ispoljava na zglobovima. Svrstava se u grupu inflamatornih reumatskih oboljenja u koje pored reumatoidnog artritisa spadaju i juvenilni idiopatski artritis, reumatska groznica, sistemski eritemski lupus, sistemska skleroza, sistemski vaskulitis i polimiozitis (Švenda, 2014). Naziv reumatoidni artritis je baziran na grčkoj reči $\rho\acute{\epsilon}\upsilon\mu\alpha\tau\omicron\varsigma$ - rheumatosis (potok, tok) i prvi put ga je uveo Garrod 1859. godine kako bi opisao oblik bolesti sa posebnim tokom, drugačijim od reumatske groznice i gihta, koji su bili poznati i ranije. Godine 1957. Charles Short je postavio aktuelnu definiciju i klinički okarakterisao reumatoidni artritis i definitivno ga izdvojio od drugih spondiloartropatija, osteoartritisa i sistemskog lupusa (Firestein, 2003).

Oko 5-6% ukupne svetske populacije boluje od sistemskih autoimunih bolesti, dok je oko 0,24-1% obolelo od reumatoidnog artritisa (Cross i sar., 2014; Švenda, 2014). Bolest je 3 puta zastupljenija kod žena nego kod muškaraca i kod žena započinje ranije, između 40. i 50. godine života, dok se kod muškaraca javlja nešto kasnije (Alamanos i sar., 2006). Reumatoidni artritis karakteriše progresivno zapaljenje i hiperplazija sinovije, koje vremenom dovodi do oštećenja i disfunkcije zglobova. Sinovija, odnosno sinovijska membrana, predstavlja tkivo između zglobne kapsule i zglobnog prostora i nalazi se unutar zglobova (Švenda, 2014). Progresivna upala dovodi do zadebljanja sinovije i pojačanog lučenja sinovijalne tečnosti. Perzistentna upala sinovije vremenom dovodi do destrukcije hrskavice, erozije kosti, ireverzibilnih deformiteta zglobova i pojave invaliditeta bolesnika (Slika 1).



Slika 1. Građa normalnog zgloba i patološke promene zglobova u RA (infiltracija ćelija imunskog sistema u sinoviju i proliferacija, hiperplazija sinovije, formiranje panusa, destrukcija hrskavice i erozija kostiju);(preuzeto i modifikovano iz Ademowo i sar., 2013)

Može se javiti na jednom ili više zglobova i najčešće se javlja simetrično, istovremeno na zglobovima sa obe strane tela, a karakterističan je i raspored upaljenih zglobova. Prvobitno su zahvaćeni metakarpofalangni i proksimalni interfalangni zglobovi, a u kasnijim fazama bolesti promene se šire sa šaka na ručne zglobove, laktove i ramena, i sa stopala na gležnjeve, kolena i kukove (Redžo, 2014).

Osim karakterističnih manifestacija na zglobovima, prisutne su sistemske promene i u drugim organima (vaskulitis, plućne i kardiovaskularne promene) koje nastaju kao posledica dugotrajnog stanja bolesti (Assayag i sar., 2014; Makol i sar., 2014; Rodriguez-Carrio i sar., 2015). Rana dijagnoza je izuzetno važna i ukoliko se odmah započne sa terapijom, nastanak većih funkcionalnih oštećenja zglobova može biti sprečen (Egsmose i sar., 1995). Međutim, ranu dijagnozu je teško postaviti samo na osnovu simptoma bolesti, jer je početak bolesti postepen i nespecifičan. Klinički znaci reumatoidnog artritisa su isti kao i kod ostalih spondiloartropatija i uključuju otok i bol zglobova i ograničenu funkciju

zahvaćenih zglobova, s tim što se jutarnja ukočenost javlja najčešće u trajanju dužem od sat vremena (Švenda, 2014). U početnoj fazi su pogođeni zglobovi šaka i stopala, a u kasnijim stadijumima bolesti se javlja i na drugim zglobovima tela. Do trenutka potvrde kliničkih nalaza, na osnovu laboratorijskih i radioloških parametara, često već dolazi do nepovratnih oštećenja zglobne hrskavice i destrukcije ligamenata ili kostiju i bolest ostaje trajna. Serološka dijagnostička ispitivanja su od velikog značaja u ranom otkrivanju i diferencijaciji RA. Povišen nivo C reaktivnog proteina (CRP) i ubrzana sedimentacija eritrocita (SE), kao i sniženi hemoglobin su pokazatelji akutnog zapaljenja koji nisu karakteristični samo za RA (Švenda, 2014). Kao specifičniji pokazatelj, koristi se detekcija reumatoidnog faktora (RF), a u skorije vreme, uvode se i anti-CCP antitela (engl. *anti-cyclic citrullinated peptide antibodies*, anti-CCP), kao novi dijagnostički marker za RA sa visokom osetljivošću i specifičnošću (Schellekens i sar., 2000). U standardnoj kliničkoj dijagnostici u našoj zemlji, za klasifikaciju reumatoidnog artritisa su prihvaćeni i koriste se kriterijumi Američkog udruženja reumatologa (engl. *American Rheumatism Association*, ARA), odnosno Američkog Koledža za Reumatologiju (engl. *American College of Rheumatology*, ACR) (Arnett i sar., 1987) (Tabela 1). Kriterijumi 1-4 moraju biti prisutni najmanje 6 nedelja, a kriterijume 2-5 mora da potvrdi lekar.

Tabela 1. Kriterijumi Američkog koledža za reumatologiju za klasifikaciju reumatoidnog artritisa (ACR, 1987)

1) Jutarnja ukočenost zglobova u trajanju od najmanje 1 sat
2) Meko-tkivni otok najmanje 3 ili više zglobnih površina
3) Najmanje jedno područje na šakama sa otokom zglobova: proksimalnih interfalangealnih zglobova, metakarpofalangealnih zglobova ili ručnih zglobova
4) Simetrični artritis- Istovremeni zahvat istih zglobnih područja na obe strane tela
5) Prisustvo subkutanih nodula
6) Pozitivan test na reumatoidni faktor
7) Radiografski evidentna erozija ili periartikularna osteopenija na šakama i/ili ručnim zglobovima

1.2. OKSIDATIVNI STRES

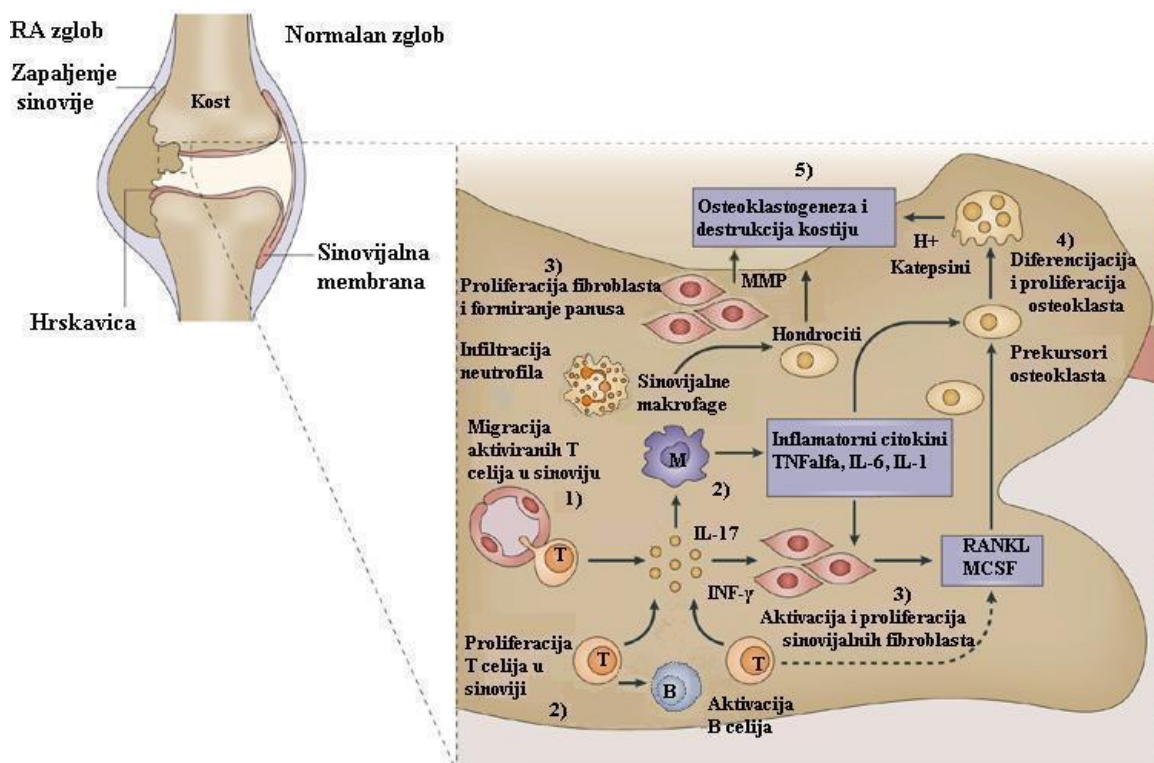
1.2.1. Uloga oksidativnog stresa u razvoju reumatoidnog artritisa

Reumatoidni artritis je bolest sa nepoznatom etiologijom u koju su uključeni faktori spoljašnje sredine i genetski faktori. Pretpostavlja se da nastaje kao odgovor na egzogeni faktor kod ljudi sa genetskom predispozicijom (Lama i Saikia, 2011). Jedna od mogućnosti je postojanje perzistentne infekcije mikroorganizmima u zglobnim strukturama ili zadržavanje mikrobnih produkata, koje može aktivirati inflamatorni proces i biti okidač bolesti. U literaturi se spominju brojni potencijalni uzročnici RA koji uključuju mikoplazmu, Epstein-Barrov virus, citomegalovirus, parvo virus, humani herpes virus i virus rubeole, ali definitivna veza sa inicijacijom bolesti, nikada nije dokazana (Alvarez-Lafuente i sar., 2005; Balanraud i sar., 2004). Što se tiče faktora rizika, pokazano je da konzumacija kafe i cigareta povećava rizik za razvijanje RA (Lee i sar., 2014; Sugiyama i sar., 2010). Činjenica, oko koje se većina stručnjaka slaže, je da proces bolesti započinje kada dođe do pojave reaktivnosti na vlastite antigene, odnosno, do abnormalnog prezentovanja sopstvenog antigena od strane antigen prezentujućih ćelija, što dalje dovodi do aktivacije auto reaktivnih T limfocita. Bez obzira šta je pokretač autoimunskog odgovora, početak procesa svakako zavisi od T ćelijskog odgovora na strani antigen. Međutim, za perzistiranje procesa ključna je produkcija proinflamatornih citokina, a u ove procese, u najnovijim konceptima patogeneze RA, uključen je i oksidativni stres, kao veoma važan faktor.

Oksidativni stres predstavlja stanje narušenog redoks balansa u ćeliji i nastaje kao posledica neravnoteže između oksidativnih i antioksidativnih procesa (Valko i sar., 2007). Disbalans se najčešće javlja usled prekomerne produkcije slobodnih radikala. Oksidativni stres je priznat kao jedan od važnih faktora koji učestvuju u složenim mehanizmima regulacije imunskog odgovor organizma (Bogdan, 2001). Ključni faktor u pokretanju mnogih autoimunskih bolesti je post-translaciona modifikacija antigena koja dovodi do prepoznavanja sopstvenih proteina kao "stranih" ili "opasnih" i samim tim pokretanja adaptivnog imunskog odgovora. Prethodno je pokazano da prekomerna produkcija

slobodnih radikala može da dovede do post-translacione modifikacije proteina i potencijalnog formiranja neo-epitopa (Griffiths, 2008). Ovi neo-epitopi mogu direktno aktivirati adaptivni imunski odgovor ili dovesti do pojave imunoloških fenomena kao što su molekularna mimikrija (antigen domaćina se prepoznaje kao "strani"), prezentovanje kriptičnih epitopa (izlaganje skrivene aminokiselinske sekvence posle promene u trodimenzionalnoj strukturi proteina), širenje epitopa (širenje antigenosti iz datog epitopa na ostale delove proteina ili druge proteine) i spajanje (engl. *coupling*) nekog autoantigena sa egzogenim antigenom (Ryan i sar., 2014). Svi navedeni mehanizmi mogu dovesti do narušavanja normalne funkcije imunskog sistema i pojave autoimunske reakcije. U reumatoidnom artritisu, primer ovakve vrste je jedna od oksidativnih modifikacija kolagena tipa II koja povećava njegovu antigenost, pri čemu se novonastali modifikovani oblik molekula ponaša kao jedan od glavnih autoantigena u RA. Pokazano je da preko 90% pacijenata sa ranim RA ima ovu modifikaciju, kao i da je zastupljenost ove modifikacije veća kod pacijenata koji su pokazivali slab odgovor na terapiju antireumaticima poput metotreksata (Ryan i sar., 2014).

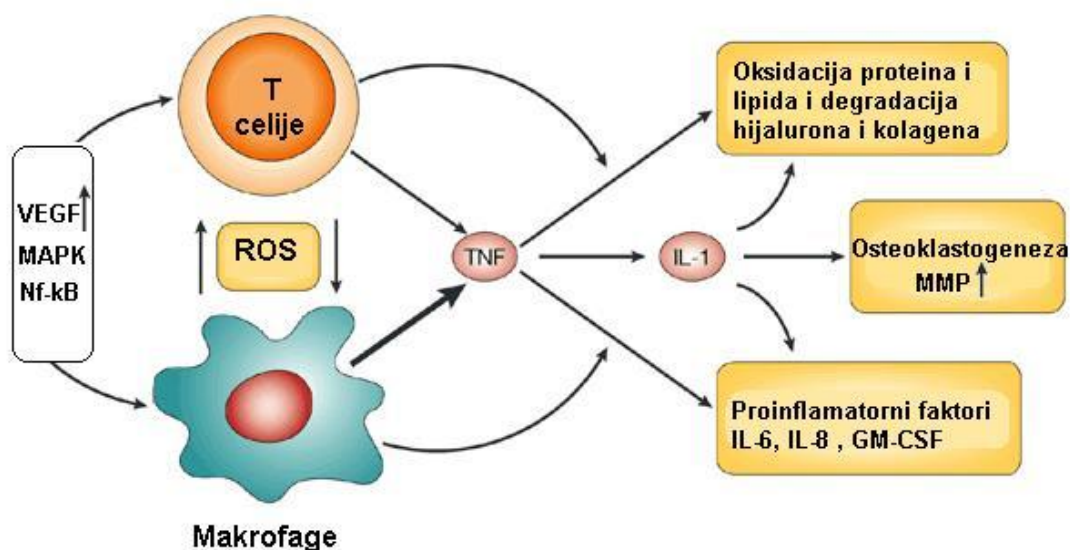
Razvoj inflamatorne reakcije u RA je kontrolisan nizom ćelijskih i molekulskih komponenti (Slika 2). Adhezija leukocita i migracija preko endotela u tkivo sinovije je proces koji započinje kompleksnu fazu akutne upale u reumatoidnom artritisu. Trans-endotelna migracija i lučenje citokina u sinoviji izaziva aktivaciju i proliferaciju sinovijskih fibroblasta i osteoklasta, koji su neposredno zaduženi za destrukciju hrskavice i povratno reaguju sa ćelijama imunskog sistema u održavanju inflamacije (Firestein, 2003) (Slika 2). U tom procesu aktivacije imunskog odgovora i regrutovanja ćelija imunskog sistema, važnu ulogu igra formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Gordon, 2003). U procesu inflamacije i infiltracije aktiviranih T ćelija u sinoviju, dolazi do povišene produkcije ROS, koja je direktno zavisna od nivoa proinflamatornih citokina (Chenevier-Gobeaux i sar., 2006). Glavni izvori ROS su aktivirani makrofagi.



Slika 2. Patogenetski procesi u zglobovima RA: 1) Transendotelna migracija T ćelija u sinoviju; 2) Proliferacija T ćelija u sinoviji, lučenje proinflamatornih faktora interleukina 17 (IL-17) i interferona gama ($INF-\gamma$), aktivacija makrofaga; 3) Lučenje proinflamatornih citokina TNF α , IL-6 i IL-1, aktivacija i proliferacija sinovijalnih fibroblasta, hiperplazija sinovije, formiranje panusa, 4) proliferacija osteoklasta 5) lučenje matriks metaloproteinaza (MMP), destrukcija hrskavice i erozija kostiju (preuzeto i modifikovano iz Takayanagi, 2007).

Lokalno povećanje ROS u sinoviji dovodi do produkcije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i razgradnje kolagena koja pospešuje migraciju aktiviranih T ćelija iz centralnog krvotoka u lokalno tkivo sinovije (Fay i sar., 2006) (Slika 3). Povišena produkcija ROS od strane aktiviranih T limfocita utiče na dalju amplifikaciju antigenih signala i stimuliše dodatnu proliferaciju T ćelija proporcionalno količini proizvedenih ROS (Chauveau i sar., 2005; Reth, 2002). Među najznačajnijim signalnim molekulskim putevima, koji se aktiviraju u sinoviji usled

povećanja ROS, a koji su uključeni u regulaciju inflamacije i osteogeneze, su putevi preko mitogen aktiviranih protein kinaza (MAPK), Wnt/b-catenina i nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B) (Slika 3).



Slika 3. Uloga oksidativnog stresa u molekulskim mehanizmima patogeneze reumatoidnog artritisa (preuzeto i modifikovano iz Feldmann, 2002).

Nf- κ B i faktor nekroze tumora-alfa (engl. *tumor necrosis factor*, TNF α) su glavni medijatori između inflamacije i prekomerne produkcije ROS u ćelijskom inflamatornom odgovoru. Transkripcioni faktor Nf- κ B se aktivira u uslovima povišne količine ROS, pri čemu dolazi do njegove translokacije iz citoplazme u jedro i aktivacije transkripcije gena za proinflamatorne citokine kao što su TNF α , interleukin 1 (IL-1) i interleukin 6 (IL-6), koji imaju ključnu ulogu u patogenezi RA (Hitchon i El-Gabalawy, 2004). Visok nivo pomenutih proinflamatornih citokina u sinoviji izaziva aktivaciju i regrutaciju neutrofila i makrofaga, koje dalje produkuju nove količine ROS i dovode do ponovne stimulacije istog molekuskog puta, pozitivnom spregom, preko Nf- κ B. Lokalno povišenje ROS u sinoviji dovodi i do fragmentacije hijalurona, degradacije kolagena i ubrzane destrukcije hrskavice i koštanog tkiva (Hawkins i Davies, 1997) (Slika 3). Pomenuti molekuskog puta preko TNF α i Nf- κ B, koji povezuje produkciju ROS i inflamaciju, predstavlja jedan od glavnih ciljeva u

razvoju terapija za RA, a koji kao krajnji cilj imaju smanjenje lokalnog zapaljenskog procesa u zglobovima.

Sumirano, pokazano je da povišenje ROS u sinoviji može da dovede do: a) oksidacije imunoglobulina i produkcije izmenjenih antitela, b) amplifikacije proliferacije T ćelija preko pojačane produkcije proinflamatornih medijatora, c) oksidacije lipida i proteina i generisanja toksičnih produkata, koji vrše hemotaksiju monocita i utiču na interakcije između T ćelija i monocita, d) oksidacije hijalurona i kolagena i e) aktivacije matriks degradujućih enzima, matriks metaloproteinaza, koji otpočinju razgradnju hrskavice (Bauerova i Bezek, 1999; Chenevier-Gobeaux i sar., 2006; Fay i sar., 2006).

Glavne vrste ROS koje učestvuju u ovim procesima su supeoksidni joni ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali (HO^{\bullet}) i neradikalske vrste kao što je vodonik-peroksid (H_2O_2).

1.2.2. Nastanak slobodnih radikala u ćelijama i njihova regulacija

Slobodni radikali su nestabilni produkti ćelijskog metabolizma koji se nalaze između oksidovanog i redukovanog stanja i sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (Valko i sar., 2007). Težeći da postignu elektronsku stabilnost slobodni radikali reaguju sa prvim susednim stabilnim molekulom oduzimajući njegov elektron (reakcija inicijacije) i započinju lančanu reakciju oksidacije supstrata (propagacija) koja dovodi do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih promena biomolekula. Ova reakcija se nastavlja sve do trenutka dok ne dođe do njihove neutralizacije i sprečavanja dalje propagacije od strane endogenih ili egzogenih antioksidanasa (Valko i sar., 2007). Postoje dve grupe slobodnih radikala: 1) reaktivne kiseonične vrste (ROS) 2) reaktivne azotove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS). Treba istaći da se ROS i RNS stvaraju tokom normalnih metaboličkih procesa biosinteze, biodegradacije i biotransformacije i da su deo normalne metaboličke aktivnosti u ćeliji. Slobodni radikali imaju mnogobrojne fiziološke uloge, kao što su: učešće u ćelijskoj signalizaciji, odbrana od infektivnih agensa, regulacija genske ekspresije (Valko i sar., 2007). Ukoliko je njihova produkcija nekontrolisana i pređe antioksidativni

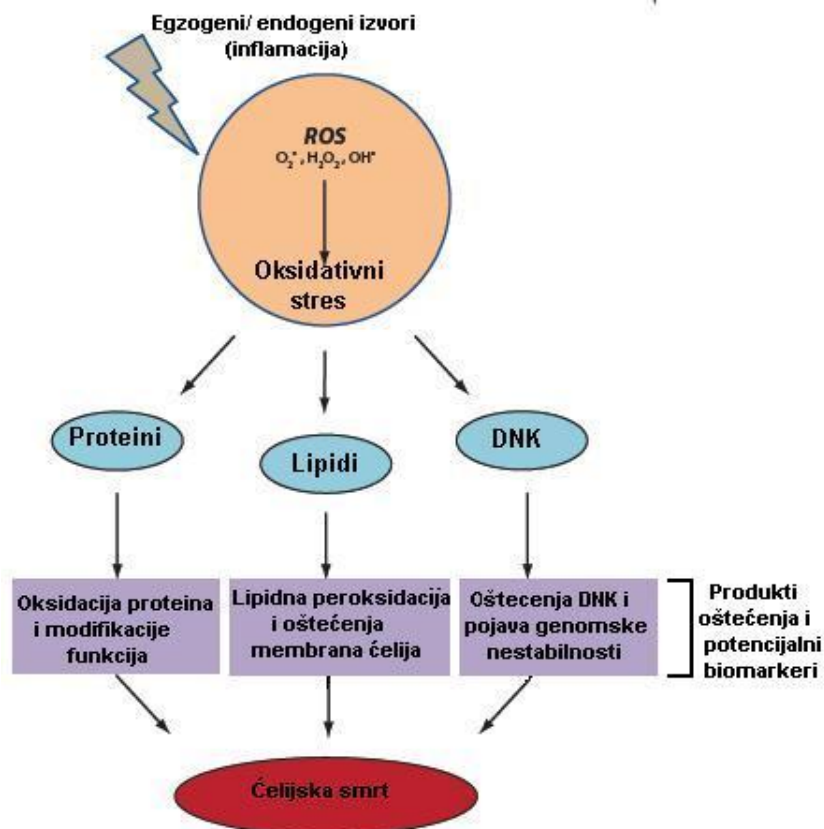
kapacitet ćelije, koji održava njihovu količinu na normalnom nivou, nastaje patološko stanje u ćeliji i može doći do oksidacije membranskih lipida, ćelijskih proteina i DNK. Osim toga, interakcija samih slobodnih radikala sa strukturnim komponentama ćelije može dovesti do formiranja novih citotoksičnih reaktivnih vrsta pa čak i do ćelijske smrti (Halliwell i Gutteridge, 1985).

Antioksidans je svaka supstanca koja ima sposobnost da smanjuje ili sprečava oksidaciju nekog supstrata podložnog oksidaciji (Halliwell i Gutteridge, 1999). U ćelijama supstrate za oksidaciju najčešće predstavljaju proteini, lipidi, ugljeni hidrati i DNK molekuli. Ćelijski antioksidansi ostvaruju svoju aktivnost u sistemu antioksidativne zaštite delovanjem u okviru dve faze. Primarna antioksidativna zaštita podrazumeva antioksidanse koji deluju u fazi nastanka slobodnih radikala, odnosno koji sprečavaju njihovu inicijaciju i propagaciju. Antioksidansi sekundarne antioksidativne zaštite imaju ulogu tokom naknadnih interakcija sa već oksidovanim produktima u ćeliji i obuhvataju enzime koji učestvuju u reparaciji i dezintegraciji nastalih produkata oksidacije (Halliwell i sar., 1999; 2001). U primarnoj antioksidativnoj zaštiti, najčešći molekularni mehanizmi dejstva su hvatanje slobodnih radikala (engl. *scavenging*), odnosno doniranje protona i neutralizacija radikala ili vezivanje prelaznih metala u neaktivnu formu (heliranje). U primarnu antioksidativnu zaštitu spadaju: antioksidansi poreklom iz hrane (npr. vitamin C, vitamin E, polifenoli), endogeni antioksidansi (tioli, N-acetil-cistein, NADPH i NADH, ubihinon) i enzimi (superoksid dismutaza, katalaza, enzimi glutationskog redoks ciklusa), kao i metalvezujući proteini koji heliraju slobodne jone gvožđa i bakra, katalizatore oksidativnih reakcija. U kasnijim fazama, nakon formiranja produkata oksidacionih reakcija, enzimi sekundarne antioksidativne zaštite deluju tako što razgrađuju ili repariraju već nastale oksidovane produkte u ćelijama.

1.2.3. Biomarkeri oksidativnog stresa

U patološkim stanjima može doći do snižavanja antioksidativnog kapaciteta ćelije i povećane produkcije slobodnih radikala što dovodi do poremećaja redoks homeostaze (Halliwell i Gutteridge, 1999). U tom slučaju višak ROS može reagovati sa lipidima,

proteinima, DNK i polisaharidima i izazivati značajna oštećenja. Oksidativna oštećenja ćelije igraju važnu ulogu u patogenezi mnogih hroničnih oboljenja i procesu starenja (Dalle-Donne i sar., 2006). Da bi se ispitala uloga oksidativnog stresa i ROS u patogenezi i/ili progresiji neke bolesti, neophodna je upotreba odgovarajućih metoda detekcije. Međutim, direktno i precizno određivanje nivoa ROS direktno u ćelijama ili telesnim tečnostima je otežano zbog njihove visoke reaktivnosti sa drugim molekulima i suviše kratkog polu-života (koje se može meriti u sekundama), pa se najčešće vrši procena na osnovu produkata koji nastaju u njihovom prisustvu (Dalle Donne i sar., 2005). Dejstvo ROS na biomolekule uvek daje konkretne proizvode oksidacije, koji predstavljaju neku vrstu specifičnog hemijskog otiska njihovog prisustva, i koriste se kao biomarkeri oksidativnog stresa (Dalle Donne i sar., 2005) (Slika 5).

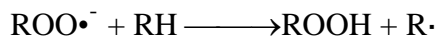
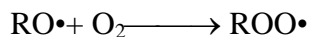
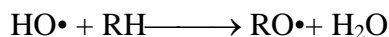


Slika 5. Biomarkeri oksidativnih oštećenja ćelija koji potiču od povišene produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) poreklom iz egzogenih ili endogenih izvora

Specifičnost produkata koji nastaju u reakcijama sa određenim vrstama ROS omogućavaju da se odredi stepen oksidativnog oštećenja, ali i da se identifikuje sama priroda oksidansa koji je izazvao reakciju. Upotreba i značaj pojedinog parametra oksidativnog oštećenja, kao potencijanog biomarkera za neko oboljenje, zavisi od njegove hemijske stabilnosti kao proizvoda oksidacije, da li se on akumulira u koncentracijama dovoljnim za detekciju i da li oslikava specifični oksidacioni put koji je u vezi sa pogoršanjem i razvojem te bolesti (Dalle Donne i sar., 2006). Slobodni radikali mogu reagovati sa svim vrstama biomolekula u ćelijama i u reakcijama oduzimanja vodonika i adicije elektrona formirati različite vrste organskih radikala.

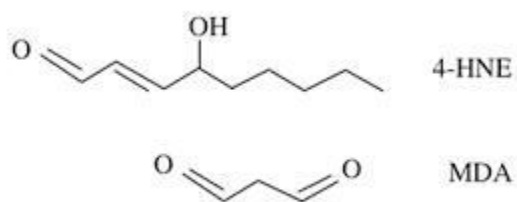
1.2.3.1. Biomarkeri oksidacije lipida

Lipidna peroksidacija podrazumeva oksidativno oštećenje strukture polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) najčešće u prisustvu hidroksilnog (HO•) ili alkoksilnog radikala (RO•) pri čemu u prisustvu kiseonika nastaje peroksil-radikal (ROO•) (Halliwell i Guttridge, 1985; Valko i sar., 2007). Daljom cikličnom reakcijom nastaju endoperoksidi, a od njih se kao konačni produkti formiraju citotoksični aldehidni proizvodi malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE), koji predstavljaju novonastale lipidne radikale (ROOH) (Halliwell i Guttridge, 1985) (Slika 6).



Krajnji produkti lipidne peroksidacije su izuzetno reaktivni i dovode do lančane, uzastopne propagacije i oksidacije okolnih PUFA. U prisustvu Fe²⁺ jona u Fentonovoj reakciji, ROOH mogu ponovo formirati hidroksilne i alkoksilne radikale i ponovo započeti ciklus. Ukoliko se ovaj proces dešava u plazma membrani ćelije, doći će do gubitka

fluidnosti, pada membranskog potencijala, povećane propustljivosti za jone, i eventualnog oslobađanja sadržaja iz ćelije ili organela. Krajnji proizvodi, lipidni peroksidi i citotoksični aldehidi mogu da blokiraju funkciju makrofaga, inhibiraju sintezu proteina i inaktiviraju enzime, formiranjem kovalentnih veza sa proteinima ili stvaranjem unakrsnih veza unutar proteina (Hurd i Murphy, 2009). Osim toga, pokazano je da produkti lipidne peroksidacije mogu da se transportuju sa mesta nastanka i iz ćelije gde su nastali, na druga mesta u organizmu, pri čemu se ponašaju kao sekundarni citotoksični signalni molekuli, tj. signali koji prenose informaciju o nastanku primarne oksidativne reakcije (Uchida, 2003). Uzimajući u obzir visok rizik po opstanak ćelije koji nosi lipidna peroksidacija, regulacija unutarćelijskih koncentracija lipidnih peroksida je važan proces.

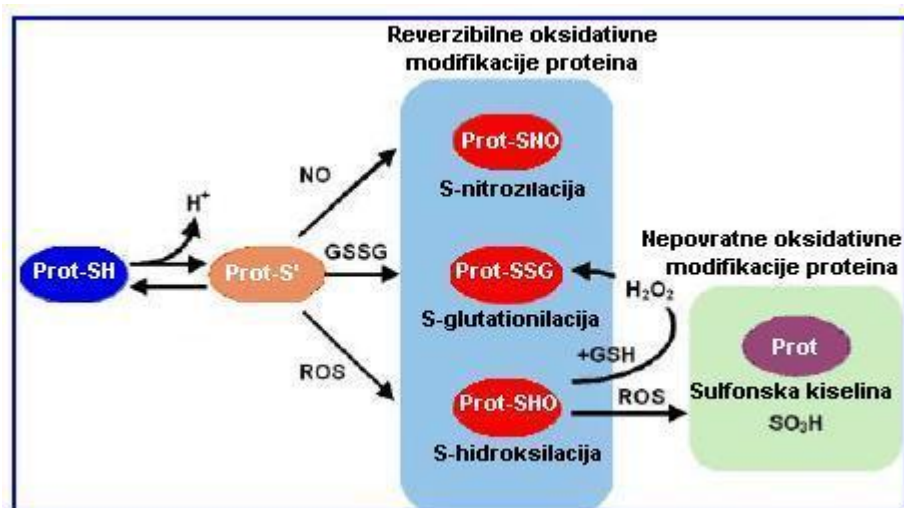


Slika 6. Strukturna formula konačnih produkata i biomarkera lipidne peroksidacije: citotoksični aldehidni proizvod malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE).

1.2.3.2. Biomarkeri oksidacije proteina

S obzirom na prirodu lipidne peroksidacije, gde se propagacione reakcije nastavljaju na početnu oksidaciju lipida, nastali proizvodi ne mogu pružiti mnogo informacija o prirodni početnog uzročnika reakcije, tj. oksidansa koji je izazvao reakciju. Za razliku od toga, biomarkeri oštećenja proteina mogu zadržati “otisak” početnog oksidativnog agensa koji je uzrokovao promenu. Aminokiselinski oksidacioni produkti su stabilniji proizvodi oksidacije i tokom skladištenja uzoraka mnogo teže dolazi do veštačke oksidacije, za razliku od lipida, gde su mogući lažno pozitivni rezultati usled njihovog dugog stajanja (Dalle Donne i sar., 2005). Osim toga, proteinski biomarkeri su korisni za praćenje oksidativnog stresa *in vivo* jer se većina produkata oslobađa proteolizom i izlučuje u telesne tečnosti kao što su krv i urin, u gotovo nepromenjenom obliku i kvantitativnom iznosu jer

ne podležu daljoj metaboličkoj konverziji pre izlučivanja (Bhattacharjee i sar., 2001). Proteini predstavljaju glavne mete za dejstvo ROS/RNS zbog njihove visoke zastupljenosti u strukturama bioloških sistema i zbog toga što su zaduženi za većinu funkcionalnih procesa unutar ćelija (Dalle Donne i sar., 2006). Prethodno je pokazano da proteini neutrališu većinu reaktivnih vrsta (50–75%) unutar ćelija pre nego što stignu do drugih struktura (Davies i sar., 1999).



Slika 7. Putevi oksidacije proteinskih tiola (Prot-SH). Tiol anjon (Prot-S⁻) se može modifikovati pojedinačnim elektron oksidacijama (sa reaktivnim vrstama kiseonika, ROS ili azotnim oksidom NO) ili preko oksidacije glutathion radikala do glutathion disulfida (GSSH) i formirati reverzibilno oksidovane cisteinske grupe proteina (Prot-SNO, protein-nitrozotiol; Prot-SHO, protein-sulfenska kiselina; prot-SSG, glutathionilovani protein) ili daljom oksidacijom hidroksilovanih proteina dovesti do nepovratnih modifikacija i nastanka sulfonske kiseline. (preuzeto i modifikovano iz Phillips i sar., 2010)

Oksidativne modifikacije proteina uključuju dve vrste promena: povratne i nepovratne modifikacije (Stadtman i Berlett, 1998) (Slika 7). Povratne modifikacije nastaju na cisteinskim ostacima i mogu imati dvostruku ulogu, u zaštiti od nepopravljivih oštećenja i modulaciji funkcije proteina (tzv. redoks regulaciji). Takvi modifikovani proteini mogu pokazivati gubitak stare funkcije ili dobitak nove i mogu se enzimskim modifikacijama

vratiti na njihovo prvobitno stanje (reverzibilne modifikacije). Za razliku od toga, nepovratne modifikacije izazvane ROS/RNS, podrazumevaju nastanak promena kao što su ditirozinski adukti, protein-protein unakrsne veze, karbonilacije lizina i arginina, i generalno dovode do trajnog gubitka funkcije ili razgradnje oštećenih proteina (Dalle Donne i sar., 2005).

Koncentracija tiolnih grupa proteina predstavlja jedan od najvažnijih markera endogenog antioksidativnog kapaciteta ćelije. Tiolna jedinjenja su sva jedinjenja koja poseduju SH grupu vezanu za ugljenik, i imaju sposobnost povratne oksidativne modifikacije, zavisno od redoks stanja u ćeliji (Slika 7). Spadaju u najvažnije endogene neenzimske antioksidanse jer oni prvi podležu oksidaciji u ćelijama i sprečavaju oksidaciju drugih funkcionalnih grupa enzima i proteina, ali takođe i regenerišu druge antioksidanse do njihovog aktivnog stanja. Smanjen sadržaj slobodnih tiolnih grupa u ćeliji tumači se kao povećanje oksidativnog stresa i koristi kao jedan od indikatora stepena oksidativne modifikacije proteina (Dalle Donne i sar., 2006).

Još jedna od veoma često korišćenih metoda za detekciju oksidacije proteina je određivanje koncentracije karbonilnih grupa, koje nastaju kao rezultat nespecifične oksidacije proteina u prisustvu slobodnih radikala. Karbonilne grupe (aldehidi i ketoni) nastaju oksidacijom bočnih lanaca proteina, na krajevima bogatim aminokiselinama prolin, lizin, arginin i treonin. Ove grupe su hemijski stabilne, što je korisno za njihovu detekciju i skladištenje. Međutim, karbonilni derivati proteina mogu nastati i putem oksidativnog cepanja proteina u prisustvu aldehida proizvedenih tokom peroksidacije lipida (kao što su 4-HNE i MDA) ili u prisustvu reaktivnih derivata ketoamina, proizvedenih redukcijom šećera ili lizinskih ostataka proteina (Dalle Donne i sar., 2003).

Uvećana koncentracija karbonilnih derivata je zabeležena kod mnogobrojnih oboljenja, a u patološkim inflamatornim stanjima, gde se povećava tokom akutne faze upale, dovedena je u vezu sa pojačanom aktivacijom neutrofila (Dalle Donne i sar., 2006). Povećane koncentracije proteinskih karbonila u plazmi pokazale su korelaciju sa stepenom pogoršanja bolesti, čime je pokazano da ove modifikacije proteina mogu biti markeri stanja bolesti (Winterbourn i sar., 2003). Koncentracija karbonilnih grupa se određuje u telesnim tečnostima ili homogenatima tkiva u reakciji sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH),

supstancom sa kojom formiraju hromogen sa visokom apsorpcijom (Chevion i sar., 2000). Povećanje apsorbance se tumači kao indikator povećane oksidacije proteina. Osim spektrofotometrije, postoji još nekoliko metoda za njihovu detekciju, kao što su ELISA i Western blot, međutim pomenuti spektrofotometrijski metod sa DNPH predstavlja visoko senzitivnu i pristupačnu metodu, što je čini najčešćim izborom za detekciju proteinskih karbonila.

Imajući u vidu da prisustvo karbonila nije obavezno pokazatelj direktne oksidacije aminokiselinskih ostataka u proteinima, već može biti sekundarno uvećan usled povišene lipidne peroksidacije, obično se u ispitivanjima koriste dodatni markeri oksidacije proteina. U uslovima povećane proizvodnje azotnih reaktivnih vrsta dolazi do nitrovanja slobodnog tirozina i tirozinskih ostataka proteina i nastanka 3-nitrotirozina koji narušava funkciju i može da dovede do inhibicije aktivnosti proteina i enzima. Povećana koncentracija nitrita u plazmi do sada je zabeležena kod inflamatornih oboljenja, kardiovaskularnih bolesti, kancera pluća i Alchajmerove bolesti (Dalle Donne i sar., 2006). Određuje se najčešće spektrofotometrijski, pri čemu treba voditi računa da tokom pripreme uzoraka može doći do *ex vivo* acidifikacije ili sekundarne proteolize što bi dovelo do nastanka dodatne količine nitrita. Povećano nitrovanje proteina u patološkim stanjima najčešće se javlja kao posledica: 1) povećane koncentracije peroksinitrita u ćelijama, 2) povišene aktivnosti enzima iz grupe hem peroksidaza (mijeloperoksidaze, eozinofil i horseradish peroksidaze) u prisustvu povećanih količina H_2O_2 , 3) usled pseudoperoksidazne aktivnosti hem proteina, kao što su Cu-Zn superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), hemoglobin i mioglobin (Turko i Murad, 2002). Kod kancera pluća, pokazano je da većina slobodnih nitrita potiče od oštećenja nastalih na 4 grupe proteinskih jedinjenja: enzima mangan superoksid dismutaze i karbon anhidraze, uključenih u antioksidativnu odbranu ćelija, enzima za proizvodnju energije iz glikolitičkog ciklusa, strukturnih proteina kao što su α - aktin, α - i β -tubulin i vimentin, kao i proteina koji su uključeni u apoptozu (aneksin) (Masri i sar., 2005). Međutim, imajući u vidu kompleksnost bioloških sistema i mnogobrojne mogućnosti nastanka nitrovanja proteina, za svaki model bolesti neophodno je ispitati izvore specifične za patogenezu tog oboljenja kao i potencijalne mete u ćelijama. U inflamatornim oboljenjima, smatra se da je glavni izvor nitrovanja proteina aktivnost hem

peroksidaza čija je aktivnost naročito pojačana u aktivnim makrofagama tokom infiltracije ćelija na mesto zapaljenja (Turko i Murad, 2002).

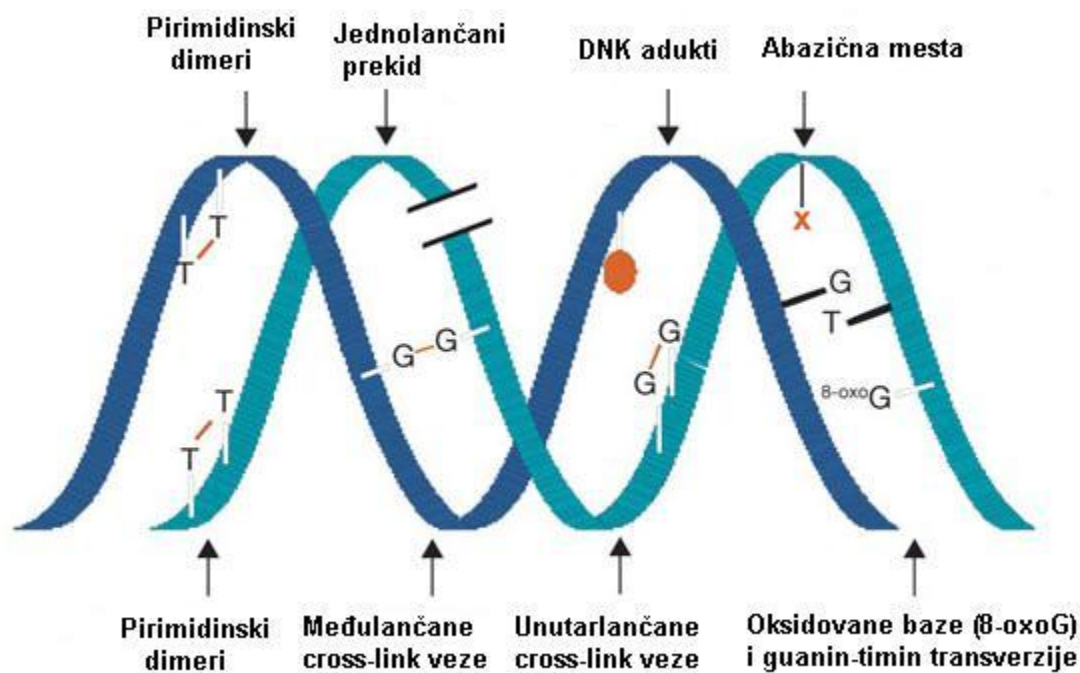
Oksidovani proteini se uglavnom uključuju u kataboličke puteve proteazomske i lizozomske degradacije. Međutim, pojedini funkcionalno neaktivni proteini slabo podležu degradaciji, ili deluju kao inhibitori proteazoma, nagomilavaju se u određenim delovima ćelije ili izvan nje i formiraju agregate (Grune i sar., 2004). Pokazano je da se proces akumulacije takvih oštećenih materija povećava tokom normalnog procesa starenja, ali i da može doprineti razvoju različitih patoloških procesa kod ljudi. Smanjenje kapaciteta za uklanjanje oksidovanih proteina i otežana proteoliza u pojedinim oboljenjima dovode do ubrzane akumulacije oštećenih proteina i proteina sa narušenom konformacijom (engl. *misfolding*), a ovaj proces se nastavlja sve dok proteinski agregati ne dovedu do metaboličke disfunkcije ćelije ili pokretanja apoptoze ili nekroze ćelije (Grune i sar., 2004). Oksidativno oštećenje proteina *in vivo* može biti važno ne samo *per se* (na primer narušavanje funkcije receptora, enzima i transportnih proteina), već i zbog toga što može da doprinese u nastanku oštećenja drugih biomolekula. Tako je pokazano da oštećenje proteina može dovesti do inaktivacije mehanizama reparacije DNK i gubitka preciznosti popravke oštećenih baza u DNK molekulu, kao i narušavanja aktivnosti polimeraze u replikaciji DNK, što može da dovede do pojave genomske nestabilnosti (Halliwell i Gutteridge, 1999).

1.2.3.3. Biomarkeri oksidativnog oštećenja DNK

Proteklih godina pažnja naučne javnosti je naročito usmerena na ispitivanja ROS kao potencijalnih uzročnika kancerogeneze. Naime, postoje dokazi koji ukazuju na povezanost povišene produkcije ROS, nastanka oksidativnog stresa i pojave genomske nestabilnosti i maligne transformacije ćelije (Valko i sar., 2004). Kao posledica dejstva slobodnih radikala na molekul DNK mogu nastati različiti produkti, i modifikacije oksidovanih šećera i baza kao što su: jednolančani i dvolančani prekidi DNK, oksidovane baze u vidu 8-hidroksi 2-deoksiguanozina (8-oxo-dG), apurinska mesta (AP) itd. (Benhusein i sar., 2010) (Slika 8). Stepen nastanka DNK oštećenja u uslovima povišenog oksidativnog stresa zavisi od reaktivne kiseonične vrste koja je induktor, od mesta nastanka

reaktivnih vrsta kao i prisustva jona metala u njihovoj blizini. Hidroksil radikal je glavni oksidans koji dovodi do oštećenje molekula DNK. Najčešće se javljaju modifikacije baznog para guanin/citozin i to u vidu supstitucija, dok su delecije i insercije baza ređe. Najčešće nastaje 8-oxo-dG koji dovodi do pojave trasverzije guanin→timin (Slika 8). Ova promena može delovati i na metilaciju citozina pa samim tim i na regulaciju genske ekspresije (Willner, 2004). Oštećenjem šećerno-fosfatnog lanca DNK od strane OH jona može doći i do uklanjanja baze i nastanka AP mesta. Još jedan od indikatora oksidativnih oštećenja na lancu DNK je i fragmentacija dezoksiriboze i nastanak jednolančanih (engl. *single strand breaks*, SSB) i dvolančanih prekida DNK (engl. *double strand breaks*, DSB). Jednolančani prekidi nastaju kada dođe do oksidacije šećernog prstena na četvrtom ugljenikovom atomu jednog lanca a ukoliko dođe i do oksidacije šećerne komponente komplementarnog lanca nastaju dvolančani prekidi. Pokazano je da se u prisustvu povećane količine ROS češće dešava prevođenje jednolančanih u dvolančane prekide (Prise i sar., 1993). Pomenuta oštećenja predstavljaju primarno DNK oštećenje (Slika 8).

U normalnim fiziološkim uslovima, učestalost primarnih oksidativnih oštećenja DNK je oko 1×10^6 baza i ona se uklanjaju ili popravljaju aktivnošću mehanizama reparacije DNK (Lu i sar., 2001). Ukoliko se ne uklone ili ne repariraju, primarna oksidativna oštećenja mogu dovesti do pojave mutacija i potencijala za razvoj kancerogeneze. Treba naglasiti da je veliki deo mutacija u genomu bez značajnih fizioloških posledica. Međutim, u nekim slučajevima ukoliko se mutacije dese u delovima gena odgovornih za regulaciju ćelijskog rasta (protoonkogeni, tumor supresori, geni regulatori reparacije DNK) mogu dovesti do inicijacije kancera (Valko i sar., 2004).



Slika 8. Tipovi primarnih DNK oštećenja: pirimidinski timin-timin dimeri; jednolančani prekidi DNK; DNK adukti; abazična mesta; međulančane cross-link veze; unutarlančane cross-link veze; oksidovane baze u vidu 8-hidroksi 2-deoksiguanozina (8-oxo-dG); trasverzije guanin→timin; (preuzeto i modifikovano iz Garinis i sar., 2008)

Kada se u ćeliji pojavi veća količina oštećene DNK, dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i sprečavanja replikacije kako bi se omogućilo dovoljno vremena za reparaciju DNK. Reparacija DNK je proces sa visokim nivoom preciznosti u normalnim fiziološkim uslovima, a poznato je da sa starenjem i u određenim patološkim stanjima dolazi do gubitka efikasnosti mehanizama reparacije. Takođe je zabeleženo da reaktivne kiseonične vrste mogu da doprinesu pojavi grešaka u reparaciji DNK i uzrokuju nastanak pogrešno sparenih lanaca (Bryant, 2007). Ukoliko ne dođe do adekvatne reparacije DNK, obično se aktivira programirana ćelijska smrt - apoptoza, ili dolazi do nastavka ćelijskog ciklusa uz rizik od pojave aberantnih promena, koje mogu voditi i ka malignoj transformaciji ćelije.

Komet test predstavlja metod visoke osetljivosti za detekciju primarnih DNK oštećenja na nivou pojedinačnih ćelija (Garaj-Vrhovac i Zeljezic, 2000). Komet testom se

moгу detektirati sledeće vrste oksidativnih oštećenja DNK: jednolančani i dvolančani prekid, apurinska mesta i oksidovane baze. Može se koristiti na različitim tipovima ćelija i široko se upotrebljava u genotoksikološkim istraživanjima, u monitoring studijama, molekularnim epidemiološkim studijama kao i za evaluaciju antigenotoksičnih svojstava prirodnih dijetetskih suplemenata (Collins, 2004). Prednost ove tehnike u odnosu na većinu citogenetskih metoda za detekciju DNK oštećenja je jednostavnost i brzina izvođenja metode, koja ne zahteva višednevnu kultivaciju ćelija i sterilne uslove rada (Collins, 2004). Osim toga, moguće je dobiti pouzdan rezultat na ograničenom broju ćelija jer je za dobijanje preciznih i ponovljivih rezultata dovoljno analizirati 100 ćelija za razliku od klasičnih metoda citogenetike gde je potrebno analizirati do nekoliko stotina (kod analize hromozomskih aberacija) pa i do hiljadu ćelija (kod mikronukleus testa).

1.2.4. Biomarkeri genomske nestabilnosti

Genomska nestabilnost je povećana učestalost promena, ili mutacija u genomu. Kao posledica genotoksičnih dejstava nastaju različita oštećenja naslednog materijala, koja se mogu manifestovati na nekoliko različitih nivoa organizacije DNK materijala, od nivoa pojedinačnih baza u molekulu DNK, pa do strukturnih i numeričkih aberacija na nivou hromozoma. Ukoliko se oštećenja ne isprave mehanizmima reparacije, ona mogu dovesti do promena na nivou pojedinačnih gena ili čitavih hromozoma. Oštećenja uzrokovana klastogenima zahvataju čitave hromozome. Aneugeni su agensi koji ne deluju direktno na DNK i ne mogu da dovedu do nastanka mutacija gena, niti promena u strukturi hromozoma, ali mogu svojim dejstvom da utiču na stabilnost i funkciju mikrotubula deobnog vretena i da na taj način uzrokuju promene broja hromozoma u ćeliji. Promene u strukturi hromozoma, koje se javljaju na jednoj od sestrinskih hromatida repliciranih hromozoma, ubrajaju se u hromatidni tip aberacija. Postoji i mogućnost da određeni genotoksični agens prvo dovede do pojave adukta na molekulu DNK ili da interkalira sa DNK, pa da naknadno, prolaskom kroz S fazu takvo oštećenje prevede u hromatidni prekid (Natarajan, 2002). Dešava se i da enzimi nukleaze prevedu jednolančane DNK prekide u dvolančane, koji dalje mogu da dovedu do pojave hromozomskih prekida (Natarajan,

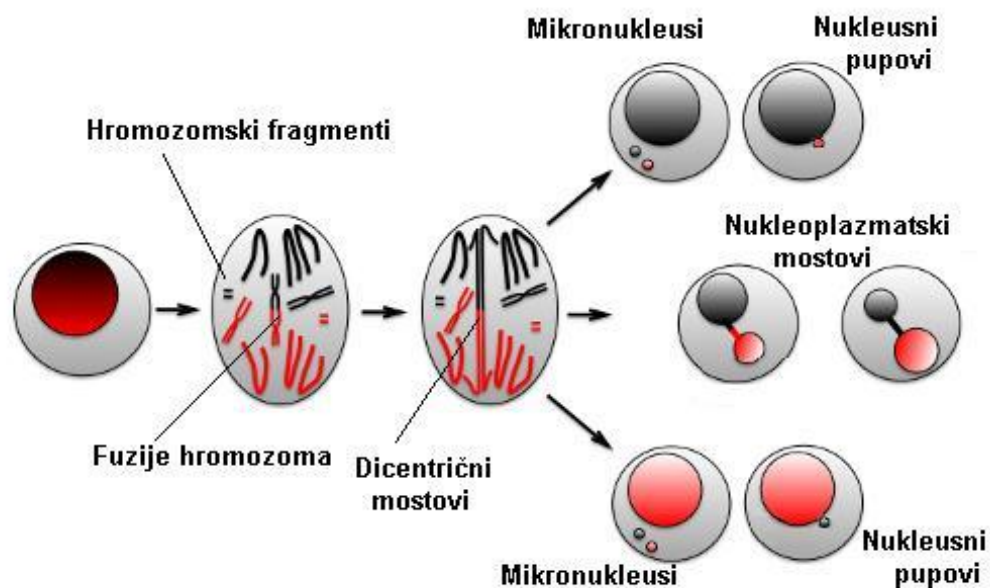
2002). Promene koje obuhvataju hromozomske prekide, acentrične fragmente, dicentrične hromozome, translokacije, inverzije, amplifikacije i delecije, a koje zahvataju obe hromatide metafaznih hromozoma, pripadaju grupi strukturnih hromozomskih aberacija. Promene u ukupnom broju hromozoma u ćeliji, koje su rezultat dejstva aneugena i oštećenja niti deobenog vretena, a koje dovode do nepravilne raspodele hromozoma tokom deobe ćelije, nazivaju se numeričke aberacije hromozoma. Za procenu genomske nestabilnosti u citogenetičkom biomonitoringu danas se koriste tri osnovne metode:

- analiza hromozomskih aberacija
- analiza učestalosti razmena sestrinskih hromatida
- mikronukleus test (MN)

Za procenu genomske nestabilnosti jedna od najčešće upotrebljivanih metoda predstavlja mikronukleus test. On se koristi za procenu *in vivo* i *in vitro* aneugenih i klastogenih efekata i pogodan je zbog toga što se mogu prikazati efekti različitih genotoksičnih događaja koji izazivaju genomsku nestabilnost (Fenech, 1993; 2000). Mikronukleusi (MN) se formiraju u toku tranzicije metafaze u anafazu mitoze tokom deobe ćelije. Uočavaju se kao tamna hromatinska tela, okruglog oblika, koja su odvojena od jedra i veličine su do 1/3 glavnog jedra. Nastaju od DNK materijala koji nije inkorporiran u glavno jedro ćerke ćelije nakon deobe, a poreklom su od čitavih hromozoma (kada se desi aneugeni događaj koji dovodi do gubitka celog hromozoma) ili acentričnih fragmenta hromozoma, nastalih posle formiranja prekida na hromozomima ili hromatidama (klastogeni efekat). Njihov nastanak se prati u binukleusnim ćelijama, nakon dodavanja inhibitora citokineze agensa citohalazina B, pri čemu nastaje ćerka ćelija sa dva glavna jedra. Evaluacija mikronukleusa može se izvršiti relativno lako i na različitim tipovima ćelija, relevantnim za biomonitoring: limfocitima, fibroblastima, epitelnim ćelijama. U studijama na ćelijama čoveka najčešće se rade analize na limfocitima koji se 72 časa kultiviraju *in vitro*, a kulturama se dodaje citohalazin B posle 44-46 časova od početka kultivacije. Mikronukleusi nastaju dekonenzacijom hromatinskog materijala koji zaostaje izvan glavnog jedra i uglavnom vodi poreklo od čitavih hromozoma zaostalih u anafazi, acentričnih fragmenata, ili modifikacija unutar hromozoma, kao što je amplifikacija

genomske DNK (Imle i sar. 2009; Fenech, 1993). U slučajevima kada ne dođe do potpunog odvajanja viška hromatinskog materijala od glavnog jedra, već ostanu spojeni sa jedrom na periferiji, ove pojave se nazivaju nukleusni pupovi (NP). Amplifikovana DNK je uglavnom locirana na rubnim delovima jedra, kao što su prethodno pokazali Shimzu i sar. (1998) (Slika 9). Tokom S faze ćelijskog ciklusa dolazi do izdvajanja amplifikovane DNK iz jedra u vidu male kružne strukture DNK, bez centromere i telomera, procesom pupljenja. Prvobitno se oforme pupovi koji se uočavaju kao mikronukleusi, ukoliko se potpuno odvoje od glavnog jedra (Shimzu i sar., 1998) (Slika 9). Nukleoplazmatski mostovi (NPM) predstavljaju nešto ređu pojavu u mikronukleus testu i uočavaju se kao hromatinske niti određene debljine, koje se protežu između dva glavna jedra (Thomas i sar., 2003). Naime, pošto dicentrični hromozom poseduje dve centromere, niti deobnog vretena s jednog pola ćelije će se vezati za jednu, a sa suprotnog pola za drugu centromeru, pa će isti hromozom biti povučen ka oba pola. Nakon razdvajanja hromozoma tokom deobe i formiranja jedrovih membrana u telofazi, nastaje dva nova jedra povezana nukleoplazmatskim mostom (Fenech, 1993) (Slika 9).

Nastanak mikronukleusa može biti spontan ili indukovano određenim endogenim i egzogenim genotoksičnim agensima. Zabeleženo je da se u hroničnim inflamatornim oboljenjima značajno povećava stepen produkcije mikronukleusa, i da je reumatoidni artritis jedno od takvih oboljenja (Torres-Bugarin i sar., 2015). Pokazano je da su mikronukleusi pouzdani biomarkeri za procenu progresije bolesti i efekata terapije u specifičnim i sistemskim inflamatornim oboljenjima kao što su reumatoidni artritis, vitiligo, psorijaza, sistemski lupus, sistemska skleroza itd (Torres-Bugarin i sar., 2015). Naime, poznato je da se patološke posledice genomske nestabilnosti mogu akumulirati tokom razvoja nekog oboljenja i manifestovati u vidu hromozomske nestabilnosti (Yurov i sar., 2009). Mikronukleusni test može biti pokazatelj stepena hromozomske nestabilnosti. U ovoj studiji mikronukleus test je primenjen za evaluaciju efekata bolesti na nivou genomske stabilnosti kod pacijenata sa RA u ranoj fazi bolesti kao i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem. Osim toga, korišćen je i za procenu efekata terapijske primene metotreksata na nivo genomske stabilnosti kod pacijenata sa RA, imajući u vidu njegovu genotoksičnost (Ramos Remus i sar., 2002).



Slika 9. Mehanizmi nastanka mikronukleusa u ćelijama: mikronukleusi poreklom od čitavih hromozoma ili njihovih fragmenata koji nisu inkorporirani u glavno jedro; nukleusni pupovi poreklom od amplifikovane DNK isključene iz glavnog jedra na površini; nukleoplazmatski mostovi u vidu hromatinske niti između jedara poreklom od dicentričnih hromozoma;

(preuzeto i modifikovano sa <http://www.birmingham.ac.uk/research/activity/cancer-genomics/research/dna-damage-repair/index.aspx>)

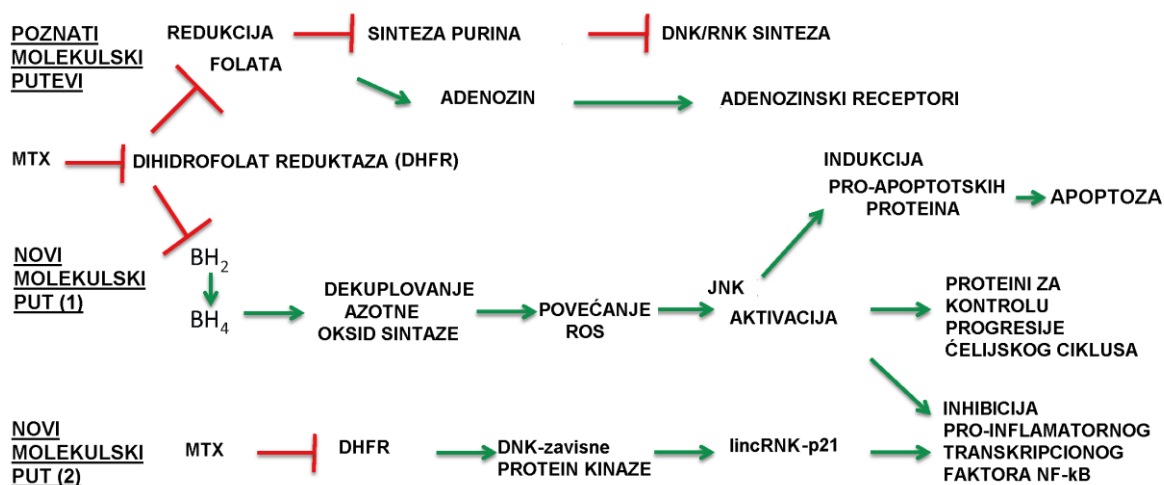
1.3. TERAPEUTSKI PRISTUPI U LEČENJU REUMATOIDNOG ARTRITISA

1.3.1. Metotreksat kao standardna klinička terapija

Standardna klinička terapija za reumatoidni artritis uključuje upotrebu nesteroidnih antiinflamatornih lekova (engl. *non steroidal antiinflammatory drugs*, NSAID) i antireumatskih lekova koji modifikuju tok bolesti (engl. *disease modifying antirheumatic drugs*, DMARD) (Demoruelle i Deane, 2012). Tačna dijagnoza u ranoj fazi RA počinje jasnim definisanjem RA, nakon čega sledi brzo uvođenje agresivne DMARD terapije, koja je ključna za uspešan tretman (Demoruelle i Deane, 2012). Tretmani uključuju lekove koji suzbijaju upalu i lekove koji olakšavaju bol, dok terapija za lečenje same bolesti do sada nije razvijena. Najvažniji dugoročni cilj terapije je smanjenje funkcionalnih oštećenja i progresivnih deformiteta zglobova, kao i prevencija sekundarnih oboljenja koja su povezana sa patogenezom RA poput kardiovaskularnih oboljenja ili osteoporoze.

Postoje različiti podaci iz literature o vremenskom okviru definicije ranog RA, međutim, većina lekara smatra da se pojava početnih simptoma bolova, otoka i ukočenosti u zglobovima u trajanju od 3 do 6 meseci, može smatrati ranom fazom RA (van der Helm-van Mil i sar., 2007). Za uspešan odgovor na terapiju, neophodno je rano uvođenje terapije sa DMARD i pokazalo se da je kraće trajanje bolesti i vreme otpočinjanja terapije, jedan od najsnažnijih pokazatelja pozitivnog odgovora na terapiju (van der Linden i sar., 2011). Jedan od najčešće korišćenih antireumatskih lekova, koji se koriste u terapiji RA, je metotreksat. Metotreksat (MTX) je antagonist folne kiseline sa jakim antiinflamatornim dejstvom (Braun i Rau, 2009). U lečenju RA, njegova terapijska efikasnost postiže se suzbijanjem funkcije makrofaga, inhibicijom hemotaksije neutrofila, i blokiranjem vezivanja proinflamatornog citokina IL-1 za receptor, kao i smanjenjem produkcije superoksidnih jona (Cronstein, 2005). Smatra se da je njegov glavni mehanizam dejstva, pre svega, inhibicija proliferacije ćelija koje su odgovorne za inflamaciju u sinoviji. Smanjenjem sinteze pirimidina u T ćelijama, metotreksat sprečava njihovu antigen-zavisnu proliferaciju. Osim toga, dovodi do inhibicije enzima 5-aminoimidazol-4-karboksamid

ribonukleotid transformilaze i izaziva ekstracelularno oslobađanje adenozina iz ćelija, koji predstavlja snažan endogeni medijator antiinflamatornih odgovora (Cronstein, 2005) (Slika 10).



Slika 10. Poznati i novootkriveni mehanizmi dejstva metotreksata u terapiji reumatoidnog artritisa. (Preuzeto i modifikovano iz Spurlock i sar., 2015)

U terapiji RA, često se koristi terapija MTX, ali i njegovo kombinovanje sa sulfasalazinom i prednisonom, ili u kasnijoj fazi bolesti, sa infliksimabom i etanerceptom, koji predstavljaju biološku terapiju zasnovanu na antitelima za TNF α . Najčešće postoji dobra tolerancija organizma na niske doze metotreksata i generalno se primenjuje u jednokratnim nedeljnim dozama intramuskularno ili oralno, obično od 10 do 17,5 mg/mL (Cronstein, 2005). U ćelijama dolazi do procesa poliglutamacije MTX i on u tom obliku ostaje kao aktivna komponenta i po nekoliko meseci (Dervieux i sar., 2003). Prema literaturnim podacima, nakon uvođenja terapije MTX, u prvih godinu dana se postiže nizak indeks aktivnosti bolesti (engl. *disease activity score 28*, DAS 28) kod 53% pacijenata, dok kombinovana terapija daje nešto bolji efekat (64%) (Goekoop-Ruiterman i sar., 2005). Međutim, samo određeni broj pacijenata (28 -34%) sa ranom fazom RA, koji dobro odreaguje na terapiju, u smislu sniženja kliničkih parametara aktivnosti bolesti, postigne istovremeno i ograničavanje strukturnog napredovanja bolesti koje se može radiografski

detektovati (Demoruelle i Deane, 2012). Osim ograničenog terapijskog efekta, upotreba standardnih DMARD je povezana i sa mnogobrojnim nuspojavama poput pojave nespecifičnog kolitisa, zapaljenja tankog creva, komplikacija u vezi sa smanjenem broja krvnih ćelija i gubitkom enzimske aktivnosti (Lu i sar., 2015). Za upotrebu MTX vezana je pojava gastrointestinalne toksičnosti, hepatotoksičnosti, narušene funkcije koštane srži i plućne fibroze (Cronstein, 2005).

Poznato je da posle dugogodišnje primene standardne terapije za lečenje RA pacijenti postaju vremenom slabo reaktivni. Osim toga, dugotrajna primena DMARD može da dovede do pojave oštećenja zdravih ćelija. Novi terapijski pristupi u lečenju RA idu u pravcu kombinovanja standardnih antireumatika sa bioaktivnim komponentama iz prirodnih izvora. Ciljevi upotrebe ovakvih kombinovanih terapija su potencijano suzbijanje ili ublažavanje negativnih efekata primene DMARD uz zadržavanje korisnih efekata standardne terapije.

1.3.2. Primena antioksidanasa u terapiji reumatoidnog artritisa

Terapije koje su aktuelne za lečenje RA sastoje se iz više heterogenih grupa lekova. Oni za cilj imaju postizanje potpune i dugotrajne remisije, međutim, u praksi se postiže uglavnom parcijalna remisija ili zbog neprekidne primene, dolazi do nastanka slabe reaktivnosti na terapiju. Nove biološke terapije zasnovane na antitelima za TNF α omogućavaju smanjenje produkcije proinflamatornih citokina, redukciju sinovijalne ćelijske infiltracije, ometanje aktivacije osteoklasta i smanjenu angiogenezu (Firestein, 2003). Međutim, za kontinuiranu i dugoročnu kontrolu bolesti, nije dovoljna samo direktna supresija produkcije medijatora inflamacije, već je neophodan i širi efekat na intracelularne signalne mehanizme koji omogućavaju perzistiranje inflamatornih procesa (Firestein, 2003). Ključni faktor u održavanju inflamacije u RA i patogenezi bolesti je oksidativni stres, a prirodni antioksidansi su identifikovani kao izvori novih terapijskih agenasa u tretmanu RA (Jaswal i sar., 2003). Oni ostvaruju terapijski potencijal tako što stimulišu aktivnost antioksidativnih enzima ili štite od oksidativnih oštećenja biomolekula neutralisanjem slobodnih radikala ili pak enzimski modifikujući već oštećene biomolekule. U tretmanu

RA, bioaktivne komponente od interesa, su supstance sa antiinflamatornim, antioksidativnim i imunomodulatornim karakteristikama.

Antioksidansi iz različitih prirodnih izvora su pokazali potencijal kao komplementarna terapija sa antireumatskim lekovima. Biljni produkti sa farmakološkim aktivnostima, koji su identifikovani iz izvora poznatih u tradicionalnoj medicini, široko se koriste u razvoju novih lekova zasnovanih na tradicionalnim formulacijama (Lahlou, 2013). U svom radu Lu i sar. (2015) su naveli podatke različitih studija o 12 komponenti izolovanih iz biljaka, poreklom iz kineske tradicionalne medicine, koje su ispoljile farmakološki značajne efekte u tretmanu RA. Takođe, Ganesan i sar. (2016) navode efekte polifenolne smese, poreklom od 14 biljaka iz indijske tradicionalne medicine, koja je pokazala značajnu supresiju inflamatornih reakcija i sprečila degeneraciju kostiju na modelu RA kod životinja. Od naročitog je interesa ispitivanje sinergističkih efekata standardnih antireumatika u kombinaciji sa prirodnim bioaktivnim komponentama. Kod životinja sa indukovanim RA je utvrđena poboljšana efikasnost standardne terapije metotreksatom u kombinaciji sa brojnim prirodnim antioksidansima, kao što su epigalokatehin, flavonoidi, karnozin, hidroksitirozol (Drafi i sar., 2012; Roy i sar., 2012; Rovensky i sar., 2009; Silva i sar., 2015). U studijama na ljudima je ispitivan efekat dijetetske suplementacije različitim komponentama sa antioksidativnim i antiinflamatornim svojstvima, na poboljšanje stanja kod pacijenata sa RA, kao što su riblje ulje sa omega-3 masnim kiselinama, maslinovo ulje bogato polifenolima itd. (Berbert i sar., 2005; Skoldstam i sar., 2003). Naročito dobre rezultate u terapiji RA je pokazala suplementacija uljem masline (Skoldstam i sar., 2003). Osim ulja masline, list masline se pokazao kao bogati prirodni izvor bioaktivnih komponenti, sa velikim terapeutskim potencijalom u tretmanu RA.

1.3.3. Ekstrakt lista masline

Ekstrakt lista masline (*Olea europaea* L.) sadrži bioaktivne komponente sa antioksidativnim, antiinflamatornim i imunomodulatornim karakteristikama što ga čini

agensom za potencijalnu upotrebu u tretmanu oboljenja kao što je reumatoidni artritis. Komercijalni proizvod koji je odabran za korišćenje u ovoj studiji, predstavlja suvi etanolni ekstrakt lista masline (engl. *dry olive leaf extract*, DOLE) pod nazivom Floralend® list masline (Slika 11). To je dijetetski biljni proizvod sa visokim sadržajem flavonoida i polifenola, a oleuropein kao glavna bioaktivna komponenta, prisutan je u visokoj koncentraciji (19,8%). Fitohemijska analiza komercijalnog ekstrakta lista masline je pokazala da se pored oleuropeina u značajnoj količini mogu naći i triterpeni i flavonoidi, kao što su luteolin, apigenin, rutin i kvercetin (Dekanski i sar., 2009). Prema uputstvu proizvođača, antioksidativna aktivnost oleuropeina može da doprinese povoljnom učinku kod blage hipertenzije, povišenog nivoa holesterola i upalnih procesa. Tradicionalno se primenjuje za lečenje hipertenzije, arterioskleroze, reumatizma, gihta, dijabetesa (Gruenwald i sar., 1998). Bezbednost i neškodljivost upotrebe određene doze ovog suplementa tokom vremenskog perioda koji je planiran za ovu studiju, potvrđena je prethodno u kliničkoj studiji na pacijentima sa hipertenzijom, koji su uzimali ovaj suplement pod istim uslovima i potvrđeno je da je potpuno neškodljiv i bezbedan (Susalit i sar., 2010). Naime, studija Susalit i sar. (2010) je pokazala da doza od 500 mg DOLE, uzimana oralno dva puta dnevno, čineći ukupnu dnevnu dozu od 1000 mg, ima uticaja na značajno smanjenje sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska kod ispitanika i da ne izaziva nuspojave. Testovi akutne toksičnosti DOLE na ljudima, do sada nisu rađeni, a studije na pacovima su pokazale da je maksimalna primenjena koncentracija od 1000 i 2000 mg/kg, potpuno neškodljiva (Petkov i Manolov, 1972). *In vitro* studije su pokazale da nije citotoksičan i genotoksičan do koncentracije od 1mg/mL (Čabarkapa i sar., 2014). Komercijalni DOLE proizvod Galenike je prisutan na tržištu kao suplement dugi niz godina i nema literaturnih podataka koji govore o njegovim neželjenim dejstvima, ukoliko se primenjuju u preporučenim dozama.

DOLE je uključen u evropsku farmakopeju, kao standardizovani 80% suvi etanolni ekstrakt lista masline. Od tada, u proteklih 15 godina, dejstva DOLE su ispitivana u brojnim studijama u kojima je pokazao izražena antioksidativna, antigenotoksična, antiinflamatorna i antiproliferativna svojstva *in vitro* i *in vivo* (Čabarkapa i sar., 2014,

Žukovec-Topalović i sar., 2015, Miljković i sar., 2009, Mijatović i sar., 2011, Čoban i sar., 2014, Dekanski i sar., 2011).



*Slika 11. Komercijalni proizvod Floralend® list masline (Galenika a.d.) od osušenih listova *Olea europaea* L. dobijen primenom etanolnog postupka ekstrakcije (80 % m / m) i distribuiran u vidu kapsula.*

Rezultati studija na životinjama su pokazali da ekstrakt lista masline može pospešiti terapiju nekoliko vrsta artritisa, uključujući giht, reumatoidni artritis i osteoartritis (Flemmig i sar., 2011; Gong i sar., 2012; Impellizzeri i sar., 2011). Kada je DOLE primenjivan u početnim fazama RA kod obolelih životinja, uspešno su suprimirani simptomi bolesti i došlo je do značajnog poboljšanja u strukturi pogođenog tkiva. Kod potpuno razvijenog RA, nakon primene DOLE, pokazano je značajno poboljšanje u inflamatornim promenama u zglobovima, u poređenju sa netretiranim životinjama (Impellizzeri i sar., 2011). Uprkos pokazanim brojnim farmakološkim i biološkim svojstvima i dugotrajnoj upotrebi u tradicionalnoj medicini kao leka za artritis, ekstrakt lista masline do sada nije ispitivan u studijama na pacijentima sa reumatoidnim artritismom.

1.4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu podatke o povišenom oksidativnom stresu i njegovoj ulozi i posledicama tokom razvoja reumatoidnog artritisa, pacijenti sa RA mogu biti ciljna grupa za primenu bioaktivnih jedinjenja iz ekstrakta lista masline u kombinovanoj terapiji sa standardnim lekom metotreksatom. S obzirom na značaj prisustva citoprotektivnih i antioksidativnih svojstava ekstrakta lista masline i na njegov potencijal primene u terapiji reumatoidnog artritisa, ciljevi ove doktorske disertacije definisani su na sledeći način:

- Ispitati *in vitro* antioksidativni kapacitet ekstrakta lista masline u različitim koncentracijama, kako bi se utvrdila njegoova sposobnost neutralizacije slobodnih radikala.
- Proceniti uticaj oksidativnog stresa u razvoju reumatoidnog artritisa na ćelijskom nivou, merenjem početnih vrednosti biomarkera oksidativnog stresa i parametara antioksidativne zaštite, kao i markera inflamacije i genomske nestabilnosti kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom i kontrolne grupe ispitanika. Porediti vrednosti između pacijenata u ranoj fazi bolesti (novodijagnostikovanih pacijenata) sa pacijenatima sa dugotrajnim oboljenjem.
- Ispitati protektivni uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline u periodu od 3 i 6 nedelja, praćenjem parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, kao nivoa inflamacije i prisustva genomske nestabilnosti kod pacijenata u ranoj fazi bolesti (novodijagnostikovanih pacijenata) i kod pacijenata sa dugotrajnim reumatoidnim artritisom.
- Uporediti efekte postignute kombinovanom terapijom metotreksatom i ekstraktom lista masline u odnosu na efekat terapije samo metotreksatom kod pacijenata u ranoj fazi bolesti RA.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA LISTA MASLINE

Komercijalni proizvod pod nazivom Floralend® list masline, proizveden od strane Galenika a.d., predstavlja suvi etanolni ekstrakt lista masline (*Olea europaea* L.) koji se nalazi u vidu kapsula. U pitanju je standardizovan ekstrakt potvrđene stabilnosti i mikrobiološke čistoće, i može se nabaviti u slobodnoj prodaji u apotekama. Ekstrakt unutar kapsula predstavlja Olive Leaf extract EFLA® 943, od firme Frutarom Ltd. (Vadensvil, Švajcarska). Ekstrakt je proizveden od osušenih listova *Olea europaea* L., primenom etanolnog postupka ekstrakcije (80% m/m). Nakon procesa ekstrakcije i filtriranja, sirovi ekstrakt je osušen i standardizovan na 18-26% oleuropeina. Njegov ukupan sadržaj fenola, određen Folin-Ciocalteu metodom, je 197,8 µg GAE/g suvog ekstrakta; sadržaj ukupnih flavonoida i tanina je 0,29%, odnosno 0,52%. HPLC analiza ekstrakta je pokazala kompleksnu mešavinu fenolnih jedinjenja: oleuropein (19,8%), luteolin-7-O-glukozid (0,04%), apigenin-7-O-glukozid (0,07%), kvercetin (0,04%) i 0,02% kafeinska kiselina (Dekanski i sar., 2009). U ovoj studiji, korišćena je ista serija EFLA® 943 sa pomenutim karakteristikama. Svaka kapsula sadrži 190 mg suvog praškastog EFLA® 943 ekstrakta sa približno 35 mg oleuropeina, glavne aktivne supstance.

Za eksperimentalno ispitivanje antioksidativnog kapaciteta *in vitro*, korišćen je prah iz kapsula koji je rastvoren u fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) i mešan u toku 30 min na sobnoj temperaturi. Suspenzija je pripremljena u četiri koncentracije, u svrhe ispitivanja antioksidativnih sposobnosti *in vitro*: 17,5 µg/mL, 175 µg/mL, i 1750 µg/mL i $1,75 \times 10^3$ µg/mL.

Za deo eksperimentalnih istraživanja, gde je ekstrakt primenjivan suplementacijom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom, korišćen je u vidu kapsula, a režim primene je detaljno opisan u delu Ispitanici i dizajn eksperimenta.

2.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNIH AKTIVNOSTI EKSTRAKTA LISTA MASLINE U *IN VITRO* USLOVIMA

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta ekstrakta lista masline korištene su tri metode: DPPH, ABTS i FRAP.

2.2.1. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH radikala

DPPH test je najčešće korišćena *in vitro* metoda za efikasno određivanje antioksidativne aktivnosti. Sposobnost "hvatanja" slobodnih radikala 80%-og etanolnog ekstrakta lista masline u četiri ispitivane koncentracije, određena je primenom spektrofotometrijske metode koju je opisao Sanchez-Moreno (2002). Ovaj metod se zasniva na sposobnosti 2,2-difenil-1-pikril-hidrazila (DPPH) da reaguje sa fenolnim jedinjenjima prisutnim u ekstraktu lista masline. DPPH radikal se odlikuje ljubičastom bojom sa maksimumom apsorpcije na 515 nm. Kada se rastvor sa DPPH radikalom doda uzorku ekstrakta, reakcija redukcije se vrši srazmerno prisustvu antioksidativnih vrsta u ekstraktu i boja se menja od ljubičaste ka žutoj. Promena boje je srazmerna antioksidativnoj aktivnosti uzorka, a procenat inhibicije DPPH apsorpcije se očitava na 515 nm, i računa se pomoću jednačine:

$$\% \text{ inhibicije}_{515\text{nm}} = [(\text{kontrola Abs}_{515\text{nm}} - \text{uzorak Abs}_{515\text{nm}}) / \text{kontrola Abs}_{515\text{nm}}] \times 100$$

Za reakciju se uvek priprema svež rastvor DPPH. Za pripremu 5 ml 3mM rastvora DPPH u metanolu, potrebno je odmeriti 5,91 mg DPPH. Dobijeni rastvor se meša na vorteks uređaju i drži se u mraku do trenutka upotrebe. Prema protokolu neophodno je napraviti razblaženje koncentrovanog rastvora DPPH u metanolu, na način koji daje vrednost apsorbanace od 0,6 do 0,7. Radni rastvor se priprema u ependorf tubi, stavljanjem 1,450 mL razblaženog rastvora DPPH i 50 μ L uzorka, koji može biti voda (za kontrolu), ekstrakt lista masline ili troloks (za standarde). Kao slepa proba, za podešavanje spektrofotometra koristi se milliQ voda. Svi pripremljeni rastvori se mešaju na vorteksu i stavljaaju u mrak 1 sat, nakon čega se

očitava apsorbancu uzoraka na 515 nm. Evaluacija antioksidativne aktivnosti je izvršena konstruisanjem kalibracione krive i očitavanjem rezultata izraženih kao % inhibicije. Za ispitivani ekstrakt određena je EC50 vrednost (koncentracija ekstrakta potrebna za neutralisanje 50% početne koncentracije DPPH radikala). Podaci su prikazivani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD).

2.2.2. Određivanje sposobnosti hvatanja ABTS radikala

ABTS test je realizovan prema modifikovanom protokolu Re i saradnika (1999). Ovaj metod se zasniva na sposobnosti antioksidativnih bioaktivnih jedinjenja da hvataju katjon radikala 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS+) i redukuju ovu radikalsku formu, koja poseduje maksimum apsorpcije u vidljivom spektru na 734 nm, u bezbojnu neutralnu formu. Naime, kada biološki ili hemijski uzorci, koji poseduju antioksidativne sposobnosti, reaguju sa ABTS+, oni neutrališu radikal i dolazi do inhibicije apsorpcije. Rastvor ABTS+ je proizveden reakcijom 7 mM ABTS glavnog rastvora sa 2,45 mM kalijum-persulfatom i skladišten je u mraku 12 sati pre upotrebe. U ovom obliku, ABTS+ može ostati stabilan tokom najmanje dva dana, ukoliko se čuva na odgovarajući način na 25 °C, u mraku. Neposredno pre analize, u 1 mL ABTS+ rastvora (razblaženog 1:50 sa fosfatnim puferom na pH 7,4) se dodaje 10 µL reagensa, odnosno: (a) etanol za kontrolu standardne krive, (b) etanol: voda (80:20) za kontrolu ekstrakata ili (c) ekstrakt maslinovog lista za analizu. Kao slepa proba za podešavanje spektrofotometra je korišćena milliQ voda. Nakon ovog koraka, rastvori za analizu moraju biti vorteksovani 20 sekundi, a nakon 1-3 minuta se očitava vrednost apsorpcije na 734 nm. Procenat (%) inhibicije boje se izračunava prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije}_{734\text{nm}} = [(\text{kontrola } A_{S734\text{nm}} - \text{uzorak } A_{S734\text{nm}}) / \text{kontrola } A_{S734\text{nm}}] \times 100$$

Podaci u studiji su izražavani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD).

2.2.3. Određivanje ukupne redukcionne sposobnosti primenom FRAP metode

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) test ukupne redukcionne moći je sproveden prema manjim modifikacijama originalnog metoda koji je opisan u radu Benzie i Stain (1996). Antioksidativni kapacitet uzorka se određuje na osnovu sposobnosti da redukuje feri- (Fe^{3+}) do fero-jona (Fe^{2+}). Kada se izgradi kompleks gvožđa sa 2,4,6-tripiridil-s-trizinom (TPTZ) u rastvoru natrijum-acetata pri kiseloj pH, njegova redukcija dovodi do promene boje rastvora, od blede narandžaste u plavo. Absorbanca rastvora na 593 nm je direktno proporcionalna stepenu redukcije. Redukcionna sposobnost se može uporediti sa fero-sulfatom ili troloksom, kao standardom. Rastvor FRAP reagensa je pripremljen neposredno pre postupka merenja, kombinovanjem deset zapremina natrijum-acetata (300 mM, pH 3,6) sa jednom zapreminom TPTZ (10 mM u HCl, 40 mM) i jednom zapreminom feri-hlorida (20 mM) u vodenom rastvoru. Natrijum-acetat i rastvor TPTZ se mogu pripremiti unapred i čuvati na sobnoj temperaturi u tamnim staklenim bocama, dok rastvor feri-hlorida mora biti sveže pripremljen na dan analize; pripremljen FRAP reagens ostaje stabilan tokom najmanje 2 sata na sobnoj temperaturi. Slepa proba milliQ vode je korišćena za podešavanje spektrofotometra. Ukratko, 100 μL slepe probe, standarda gvožđe-sulfata ili 10-strukog razblaženja ekstrakta sa milliQ vodom su dodati u 900 μL FRAP reagensa u 1,5 mL eppendorf tubama. Smeša je zatim ubrzo promešana na vorteksu 15 sek i posle 4 min nakon dodavanja uzorka sa FRAP reagensom, absorpcija rastvora je očitana na 593 nm (Beckman spektrofotometar, DU644 model) u poređenju sa slepom probom. Razblaženja vodenog rastvora gvožđe-sulfata su korišćena za kalibraciju. Svi uzorci su analizirani u osam ponavljanja i rezultati FRAP su izraženi kao mikromoli feri redukovanih ekvivalentata (Ferric Reducing Equivalents) po gramu mase ekstrakta $\mu\text{molFeEk/g FV}$. Podaci su prikazivani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD).

2.3. ISPITANICI

U istraživanje je bilo uključeno 32 ispitanika (5 muškaraca i 27 žena) sa dijagnozom reumatoidnog artritisa, prosečne starosti $65,05 \pm 11,17$ godina. Ispitanici su regrutovani na dobrovoljnoj bazi u Institutu za Reumatologiju, Kliničkog centra Srbije, Beograd, gde su

intervjuisani od strane lekara. Izvršen je klinički pregled pacijenata i zabeleženi su klinički i laboratorijski parametri bolesti, dijetetske i druge životne navike, kao što su upotreba alkohola i konzumiranje duvana. Svaki pacijent sa istorijom druge hronične bolesti, osim reumatoidnog artritisa, koja može uticati na rezultate studije, je isključen iz potencijalne grupe učesnika. Studija je planirana u skladu sa etičkim propisima Helsinške deklaracije i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Instituta za reumatologiju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ispitanici su detaljno informisani o samoj proceduri studije, potencijalnim rizicima i o obavezama pri učešću u studiji, kao i o mogućnosti povlačenja iz studije u svakom trenutku. Nakon davanja dobrovoljne saglasnosti za učešće, pacijenti koji ispunjavaju kriterijume uključeni su u studiju i tokom njenog trajanja praćene su i beležene promene svih kliničkih parametara, koje bi ukazale na stanje bolesnika. Bezbednosne mere su preduzete praćenjem klinički značajnih promena laboratorijskih hematoloških parametara i svaki potencijalo negativan efekat se prijavljivao i beležio od strane učesnika i lekara.

U istraživanje je bila uključena i kontrolna grupa ispitanika koja se sastojala od 10 zdravih dobrovoljaca bez istorije hroničnih oboljenja, približne starosti ($54,22 \pm 9,09$) i navika u ishrani kao i ispitanici sa dijagnozom RA.

2.4. DIZAJN EKSPERIMENTA

Pacijenti sa reumatoidnim artritismom koji su bili uključeni u studiju, podeljeni su u tri grupe:

I grupa: R-MTX – pacijenti u ranoj fazi bolesti koji su novodijagnostikovani za RA i koji otpočinju terapiju samo metotreksatom nakon uključanja u studiju ($n = 8$);

II grupa: R-MTX + DOLE - pacijenti u ranoj fazi bolesti koji su novodijagnostikovani za RA i koji otpočinju kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE nakon uključanja u studiju ($n = 8$);

III grupa: D-t-MTX + DOLE - pacijenti sa dugotrajnim RA, kod kojih je prethodno utvrđena dijagnoza RA i uveden kontinuirani terapijski režim metotreksatom u trajanju od

minimum 6 meseci pre uključenja u studiju, koji započinju kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE nakon uključenja u studiju (n = 16);

Metotreksat je uziman oralno u vidu tableta jednom nedeljno, u koncentracijama koje su se kretale 7,5-17,5 mg ($10,75 \pm 2,38$). Propisana doza leka je određivana individualno za svakog pacijenta i zavisila je od stepena aktivnosti bolesti kod pacijenta. Primenjene individualne doze metotreksata kod pacijenata sa RA nisu menjane tokom učešća u studiji. Individualne terapijske doze metotreksata su određene od strane lekara, na osnovu trenutnih vrednosti C-reaktivnog proteina (CRP), fibrinogena, sedimentacije eritrocita (SE), i rezultata indeksa aktivnosti bolesti DAS 28 (engl. *disease activity score 28*, DAS 28) pojedinačno kod svakog od pacijenata.

Za kvantitativnu procenu bola, koja je izvršena na početku studije pre uvođenja eksperimentalnog tretmana, kao i 3 nedelje i 6 nedelja nakon otpočinjanja tretmana, upotrebljene su tri vizuelne analogne skale (VAS). Njihove vrednosti prema stepenu bola kod pacijenata se kreću od 0-100 mm (gde 0 predstavlja vrednost bez simptoma bolesti, a 100 veoma tešku bolest) (Sokka, 2003). Korišćena je Skala za globalnu procenu pacijenta o aktivnosti bolesti (engl. *patient's global assessment of disease activity*, PGA), Globalno zdravlje pacijenta (engl. *Patient Global Health*, PGH), i Globalna procena lekara o aktivnosti bolesti (engl. *Physician Global Assessment of Disease Activity*, PhGA). Lekarskim pregledom pacijenata izvršeno je ispitivanje otečenosti i osetljivosti zglobova (broji se 28 zglobova i izražava se broj zglobova sa pomenutim promenama 0-28) i izračunati su indeksi aktivnosti bolesti (DAS 28) u skladu sa kriterijumima Američkog koledža za reumatologiju (Hochberg, 1992) kao uobičajenog kliničkog sistema za evaluaciju stanja pacijenata sa RA. Za izračunavanje DAS 28 korišćene su četiri komponente: ukupan broj bolnih zglobova (engl. *tender joints count*, TJC), otečenih zglobova (engl. *swollen joints count*, SJC), VAS skor pacijentove globalne procene bolesti (PGA) i laboratorijske vrednosti sedimentacije eritrocita (DAS28-SE) ili nivoa C-reaktivnog proteina (DAS 28-CRP).

Tokom trajanja studije pacijenti su zadržali uobičajeni režim ishrane. Svi pacijenti koji su uključeni u grupe na kombinovanom tretmanu metotreksatom i DOLE su dobili

instrukcije da tokom studije prate dijetetski dnevni unos kapsula ekstrakta lista masline (190 mg), u režimu primene dve kapsule dva puta dnevno, ujutru i uveče između obroka (ukupno 760 mg/dan) u periodu od šest nedelja. Na početku studije određene su osnovne vrednosti za sve merene kliničke, laboratorijske i eksperimentalne parametre i sva merenja su ponovljena posle 3 i 6 nedelja. Klinički i laboratorijski parametri su određeni na Institutu za reumatologiju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu dok su eksperimentalni parametri određeni na Katedri za fiziologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Katedri za opšteobrazovne predmete-hemiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Laboratorijski parametri utvrđeni na klinici obuhvatali su merenje C-reaktivnog proteina u serumu, sedimentacije eritrocita, fibrinogena i reumatoidnog faktora (RF). Svi ostali studijski eksperimentalni parametri su određeni kao što je opisano u Metodama ispitivanja.

2.5. METODE ISPITIVANJA

2.5.1. Uzorkovanje biološkog materijala

Uzorci venske krvi prikupljeni su od svih 32 učesnika ujutru, na prazan stomak (na početku studije i nakon 21. i 42. dana) na Institutu za reumatologiju, u Beogradu. Sakupljeni su u vakutajner tube sa litijum-heparinom (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austrija) i transportovani do mesta obrade. Ukupno je sakupljeno 14 mL krvi po pacijentu za ispitivanja, a nakon toga je pristupljeno odvajanju plazme, eritrocita i limfocita. Za analize na Katedri za opšteobrazovne predmete-hemiju, Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu u svrhe odvajanja plazme i eritrocita uzeto je 10 mL krvi, dok su 4 mL uzeta za separaciju limfocita koja je izvršena na Katedri za fiziologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Plazma je dobijena iz 10 mL krvi sa antikoagulansom, centrifugiranjem na 3000 rpm u trajanju od 10 min. Eritrociti su posle centrifugiranja isprani tri puta u fiziološkom rastvoru. Svako ispiranje je praćeno centrifugiranjem tokom 10 min na 3000 rpm. Tako dobijeni uzorci krvne plazme i eritrocita su zamrznuti na -20°C i čuvani do momenta korišćenja za analize.

Drugi 4 mL krvi sa antikoagulansom je korišćeno za separaciju limfocita na Ficoll-Pacque medijumu (GE Healthcare Bio-Sciences, Upsala, Švedska) i centrifugirano na 1900 rpm tokom 15 min. Limfociti u formiranom sloju u obliku prstena direktno iznad Ficoll-Pacque medijuma su sakupljeni pipetom i isprani dva puta u RPMI 1640 medijumu (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Nemačka). Svako ispiranje je praćeno centrifugiranjem tokom 10 min na 1800 rpm. Nakon poslednjeg ispiranja i centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklonjen kako se ne bi narušio talog od limfocita na dnu epruvete. U talog limfocita je dodat 1 mL RPMI 1640 medijuma i limfociti su resuspendovani laganim mešanjem pipetom, i upotrebljeni su odmah za analize u komet testu.

2.5.2. Određivanje parametara antioksidativne zaštite

2.5.2.1. Određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT) u eritrocitima

Aktivnost katalaze (CAT) je određivana na spektrofotometru (CECIL CE 2021 UV/VIS), primenom UV-kinetičke metode, po metodi Aebi (1984). Aktivnost enzima katalaze određuje se u odnosu na količinu potrošenog H_2O_2 , na talasnoj dužini od 240 nm, karakterističnoj za apsorpcioni spektar vodonik-peroksida. U kvarcnu kivetu, ukupnog volumena 1 mL, dodat je 10 mM H_2O_2 i pripremljeni su uzorci eritrocita pacijenata. Na spektrofotometru je praćena promena apsorbanace tokom 3 min. Stepem smanjenja apsorbanace odgovara količini razgrađenog H_2O_2 od strane katalaze. Rezultat je izražen u U/g hemoglobina, što odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po gramu hemoglobina.

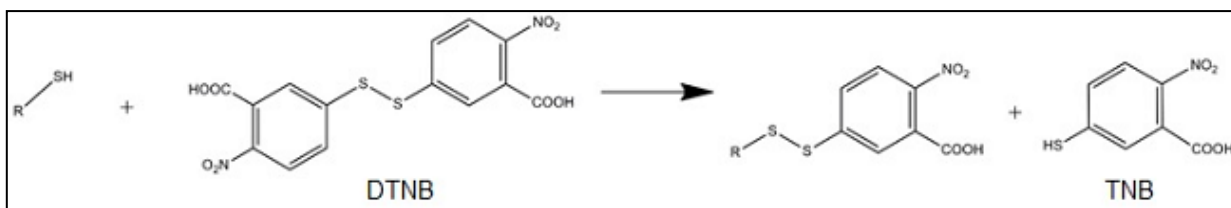
2.5.2.2. Određivanje koncentracije tiolnih grupa (SH) u plazmi

Za određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa (SH) u plazmi korišćena je Ellman-ovom metoda (1959). Metoda je zasnovana na reakciji Elmanovog reagensa 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoeve kiseline (DTNB) sa tiolnim jedinjenjima u baznoj (pH 9,0) sredini. Nakon inkubacije Elmanovog reagensu trajanju od 15 min na 25 °C u mraku,

nastaje jedan mol 5-merkapto-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB) po jednom molu tiola (Slika 12). Anjon je u baznoj sredini žuto obojen i njegova adsorbanca se meri na spektrofotometru na 412 nm (CECIL CE 2021 UV/VIS) i poredi sa slepom probom. Koncentracija ukupnog sadržaja SH grupa se izračunava preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta p-nitrofenola, (14.15 mM⁻¹ cm) pomoću formule:

$$\text{SH grupe, } \mu\text{mol/L} = \frac{A_A}{\varepsilon} \times \frac{V_t}{V_u}$$

gde je A_A -očitana adsorbanca, $\varepsilon = 14.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, V_t - totalna zapremina rastvora, V_u - zapremina uzorka plazme u rastvoru.



Slika 12. Redukcija Elmanovog reagensa slobodnim sulfhidrilnim grupama

2.5.3. Određivanje parametara oksidativnog oštećenja ćelije

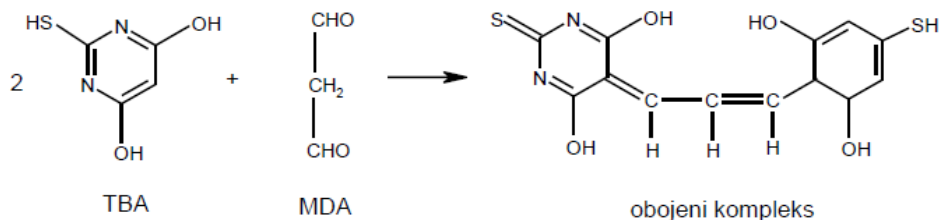
2.5.3.1. Određivanje nitrita (NO₂⁻) kao indikatora oksidacije proteina

Koncentracija nitrita je određivana u reakciji sa Griess-ovim reagensom, po metodi Guevara i saradnika (1998). Griessov reagens je široko korišćen reagens za određivanje nitrita u plazmi, serumu i urinu. Metoda određivanja ukupne koncentracije NO₂⁻ u uzorcima plazme pacijenata sa RA se sastojala u reakciji nitrita dodatkom Griessovog reagensa, koji sa nitritima daje ljubičasto jedinjenje sa azo grupom. Koncentracija nitrita je zatim određivana merenjem apsorbance azo-jedinjenja na 540 nm, korišćenjem ELISA čitača (Plate reader, Mod. A1, Nubenco Enterprises, ICN). Pomoću poznatih koncentracija standarda, konstruisana je kalibraciona kriva ($y = 0,02471 + 0,00672 \times x$, $r = 0,99911$) sa koje su određivane koncentracije uzoraka. Koncentracije nitrita su izražene u $\mu\text{mol/L}$.

2.5.3.2. Određivanje karbonilnih grupa kao indikatora oksidacije proteina

Derivati proteina, karbonilne grupe određivane su u reakciji sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom, (DNPH) spektrofotometrijski, na 365 nm (CECIL CE 2021 UV/VIS). Spektrofotometrijska DNPH metoda pogodna je za određivanje koncentracije sadržaja karbonilnih grupa u smeši proteina iz plazme, homogenata tkiva ili izolovanih proteina. Detaljna procedura za kolorimetrijsko određivanje i kvantifikaciju sadržaja karbonilnih grupa proteina pomenutom metodom data je u radu Levine i sar. (1990). Vrednosti su izražene u $\mu\text{mol/L}$.

2.5.3.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) kao produkta lipidne peroksidacije

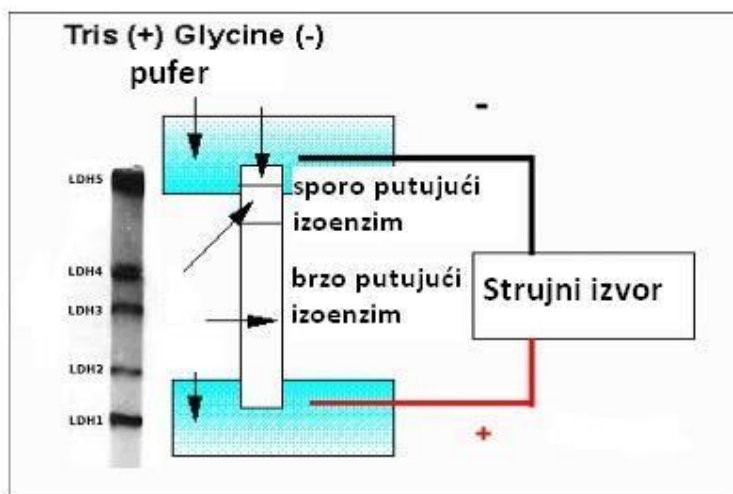


Slika 13. Izgradnja obojenog kompleksa u reakciji malondialdehida (MDA) sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA)

Koncentracija malondialdehida (MDA) je određivana, u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid*, TBA) prema metodu Stock i Dormandy (1971). Metoda se zasniva na merenju intenziteta obojenog kompleksa, koji se formira u reakciji TBA sa malondialdehidom (MDA), krajnjim produktom oksidacije nezasićenih masnih kiselina (Slika 13). Apsorpcija je merena na spektrofotometru (CECIL CE 2021 UV/VIS) na 535 nm, a vrednosti reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) su prikazane u nanomolima TBARS po gramu hemoglobina (nmol gHb^{-1}).

2.5.3.4. Određivanje stepena lipidne peroksidacije preko izoenzimske distribucije enzima laktat-dehidrogenaze

Izoenzimski oblici laktat-dehidrogenaze su određivani po metodi Yoshida i Takakuwa (1997). Enzim laktat-dehidrogenaza je citoplazmatski enzim lokalizovan u sledećim tkivima: bubreg, srce, skeletni mišići, pankreas, slezina, jetra, pluća. Postoji pet molekularnih izoenzima LDH (LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄ i LDH₅) čija je distribucija tkivno specifična, pa je dijagnostički mnogo značajnije i specifičnije analiziranje izoenzima, nego merenje ukupne aktivnosti LDH. Kako se izoenzimi razlikuju po svojim katalitičkim i fizičkim osobinama, elektroforeza je najčešće korišćena tehnika za razdvajanje izoenzima. Izoenzim LDH₁ putuje najbrže i najbliži je anodi, dok je izoenzim LDH₅ najsporiji (Slika 14). Korišćena je vertikalna elektroforeza na 7,5% PAGE-gelu (HOEFFER MINI VE, Amersham, LKB, 2117, Bromma, Upsala, Švedska), uz primenu TRIS-glicinskog pufera. Nakon razdvajanja, gel se inkubira sa reakcionom smešom (Nalaktat i nitrotetrazolijunskog plavog) i detektuje Image Master TotalLab v1,11. Rezultati su izraženi u procentima, tj. u udelu određenog izoenzima u ukupnoj aktivnosti LDH.



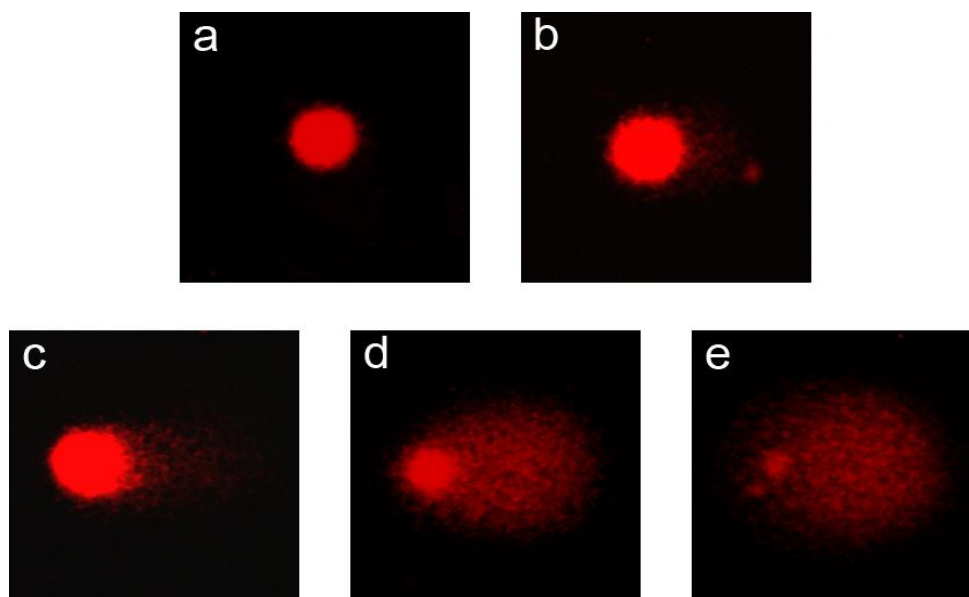
Slika 14. Šematski prikaz elektroforetskog razdvajanja izoenzima LDH

2.5.4. Određivanje stepena genomske nestabilnosti i pojave DNK oštećenja

2.5.4.1. Komet test

Alkalna verzija komet testa je urađena prema protokolu opisanom od strane Singh i sar. (1988). Uzorci suspenzije limfocita u RPMI medijumu su, nakon postupka separacije, korišćeni za analize DNK oštećenja. Po 50 μL iz svake suspenzije limfocita resuspendovano je u 50 μL 1% agaroze sa niskom tačkom topljenja (engl. *low melting point agarose*, LMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Izmešana suspenzija limfocita, u plastičnim ependorf tubama zapremine 1,5 mL, pipetiranjem je prenetna na staklene mikroskopske pločice, prethodno obložene slojem 1% agaroze sa normalnom tačkom topljenja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Za svaki pojedinačni uzorak limfocita pripremljene su pločice u duplikatu. Suspenzija ćelija u agarozu je ravnomerno raširena na pločici stavljanjem pokrovnog stakla, i ostavljena na 4 °C tokom 5 min, da agarozni gel očvrstne. Nakon nežnog uklanjanja pokrovnog stakla, kako se ne bi narušila površina gela, ćelijske suspenzije na pločicama su prekrivene drugim slojem 0,5% LMA i ostavljene ponovo da očvrstnu na 4 °C, tokom 7 min. Posle pažljivog uklanjanja pokrovnih stakala, pločice su uronjene u lizirajući pufer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X100 i 10% dimetil-sulfoksid, pH 10, podešen sa NaOH) u plastičnim kivetama za mikroskopske preparate i ostavljeni tokom noći na 4 °C, da bi se omogućila liza i uklanjanje proteina i lipida, tj. membrana u ćelijama. Sledećeg dana, pločice su izvađene iz lizirajućeg rastvora, postavljene u horizontalnu kadicu za gel elektroforezu (CHU2 proizvođač, povezan sa naponskom jedinicom EPS 601) i pažljivo preliveni hladnim, svežim rastvorom za elektroforezu (10M NaOH, 200 mM EDTA) dozvoljavajući DNK da denaturiše pre uključivanja elektroforeze. Nakon 30 min denaturacije, elektroforeza je započeta i sprovedena u tamnoj prostoriji na 25V, 300 mA 30 min, rezultirajući migracijom malih fragmenata nukleusne DNK prema pozitivnom naelektrisanju u električnom polju. Nakon elektroforeze, pločice su uklonjene iz kadice i ispirane tri puta (5 min između ponavljanja) neutrališućim puferom (0,4M Tris, pH 7,5 prilagođen sa HCl). Poslednje ispiranje je izvršeno destilovanom vodom i na svaku pločicu je naneto po 50 μL rastvora

etidijum bromida (20 mg/mL). 15 min nakon nanošenja fluorescentne boje, pristupilo se vizuelnoj analizi nukleoida u obliku "kometa". Nukleoid podrazumeva regiju koja sadrži genetski material poreklom iz nukleusa, a koji nije okružen nukleusnom membranom (Slika 16). Ukupno 200 slučajno izabranih kometa (100 kometa sa svake od 2 duplikat pločice) je analizirano po pacijentu. Preparati su analizirani na uveličanju 100× na fluorescentom mikroskopu Olympus BX 50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka), koji je opremljen živinom lampom HBO (50V, 516-560 nm Zeiss). Komete su vizuelno okarakterisane i svrstavane u 5 klasa, u zavisnosti od stepena oštećenja DNK, koje se uočava kao "rep" komete, opisano u radu Anderson i sar. (1994). Naime, u zavisnosti od određene dužine repa i gustine fragmentisane DNK u repu komete, mogu se razlikovati sledeće klase: klasa A, predstavlja neoštećene nukleoide koje nemaju rep (< 5% oštećenja DNK); klasa B, oštećenja niskog nivoa (5-20%); klasa C, srednji nivo oštećenja (20-40%); klasa D, visok nivo oštećenja (40-95%) i klasa E, potpuno oštećenje DNK (> 95%) (Slika 15).



Slika 15. Klasifikovanje kometa vizuelnom procenom u 5 grupa na osnovu količine fragmentovane DNK u repu komete: (A) bez oštećenja, < 5%; (B) nizak stepen oštećenja, 5-20%; (C) srednji nivo oštećenja, 20-40%; (D) visok nivo oštećenja, 40-95%; (E) potpuno oštećenje, > 95%.

Ukupni stepen oštećenja DNK po pacijentu je okarakterisan kao migracija preko 5 % DNK (zbir kometa klase B + C + D + E), i izračunata je srednja vrednost za dve pločice (rezultat je izražen kao ukupan broj ćelija sa DNK oštećenjem od 1 do 100). Za rezultate celih grupa pacijenata sa RA, date su prosečne vrednosti svih pacijenata u grupi \pm standardna devijacija (SD).

2.5.4.2. Mikronukleus test

Za analizu mikronukleusa, za svakog pacijenta pripremljene su kulture ćelija iz pune krvi u triplicatu. Ćelijski medijum se sastojao od 5 ml RPMI 1640 sa dodatkom HEPES-a i L-glutamina (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Nemačka), 10% inaktivisanog fetalnog telećeg seruma (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Nemačka), 10 mg/mL antibiotika (penicilin + streptomycin; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) i 2% fitohemaglutinina (PHA- M, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Nemačka). Po 0,5 mL pune venske krvi je zasejano u 5 mL medijuma, po 3 kulture su postavljene za svakog pacijenta i kultivisane 72 časa na 37 °C. Nakon 44 časa od početka kultivacije dodato je po 50 μ L citohalazina B iz koncentrovanog rastvora (6 mg/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) u svaku kulturu, kako bi se sprečila citokineza i dobile binukleusne ćelije. Posle 72 časa kultivacije, ćelije su odvojene od medijuma centrifugiranjem, tretirane su hipotoničnim rastvorom 0,075 M KCl tokom 3 min na sobnoj temperaturi i fiksirane tri puta u smeši metanola i sirćetne kiseline (3:1). Tokom prve fiksacije dodat je i 1% formaldehid kako bi membrane ćelija ostale bolje očuvane. Nakon fiksacije, ćelije su nanese na mikroskopska stakla i osušene na vazduhu na sobnoj temperaturi, a zatim obojene 2% Giemsa bojom, u trajanju od 10 min. Neophodno je evaluirati 1000 binukleusnih ćelija po pacijentu i zabeležiti prisustvo mikronukleusa (MN), ali i drugih aberantnih promena, kao što su nukleusni pupovi (NP) i nukleoplazmatski mostovi (NPM) prema kriterijumima koje je opisao Fenech (1993). U ovom eksperimentu, rezultati su izraženi kroz ukupne učestalosti ćelija sa MN, NP i NPM kod ispitanika sa RA i kontrola.

2.5.5. Određivanje nivoa proinflamatornog citokina IL-6 pomoću ELISA testa

Koncentracija IL-6 u plazmi pacijenata određivana je komercijalnim ELISA testom (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Upotrebljen je Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go!® kit (eBioscience, San Diego, USA). Senzitivnost ovog kita je 4 pg / mL. Uzorci su rađeni u duplikatu, zajedno sa slepom probom i serijom standarda. Vrednosti su očitane na ELISA čitaču (BIOTEK Model ELx800 Absorbance Microplate Reader, VT, USA). Pomoću poznatih koncentracija standarda, konstruisana je kalibraciona kriva sa koje su određivane koncentracije uzoraka.

2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

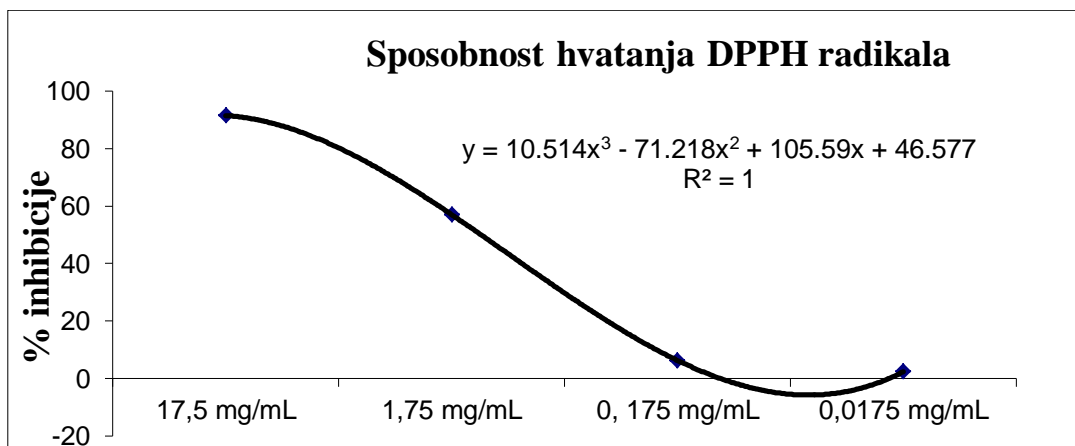
Statistička obrada podataka izvršena je korišćenjem kompjuterskog programa GraphPad Prism 5.00 (San Diego, CA, USA). Rezultati istraživanja su predstavljeni uz pomoć deskriptivnih statističkih parametara, srednje vrednosti \pm standardne devijacije ili srednje vrednosti \pm standardne greške i prikazani su tabelarno ili grafički. Pre statističke analize varijable su testirane na normalnu distribuciju upotrebom D'Agostino-Pearson omnibus statističkog testa. Statistička značajnost razlika ispitivanih vrednosti, utvrđena je upotrebom jednofaktorskog ANOVA testa sa Tukey-ovim post-hoc testom, pošto distribucije varijabli nisu odstupale od normalnosti. Kao statistički značajne, uzete su razlike na nivou od $p < 0,05$.

3. REZULTATI

3. 1. REZULTATI ISPITIVANJA ANTIOKSIDATIVNIH SVOJSTAVA EKSTRAKTA LISTA MASLINE U *IN VITRO* USLOVIMA

3.1.1. Analiza sposobnosti hvatanja DPPH radikala

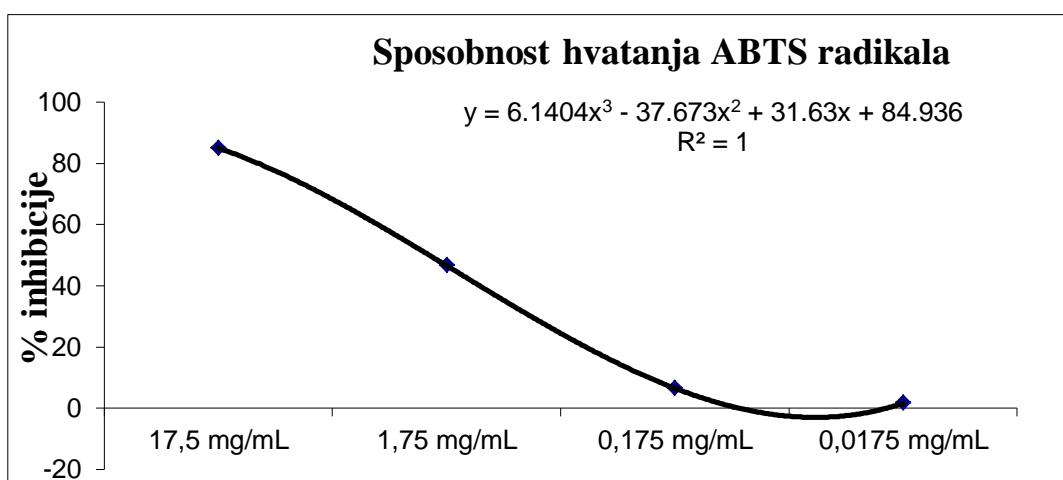
Rezultati sposobnosti različitih koncentracija ekstrakta lista masline da hvataju i neutrališu DPPH radikale su prikazani na slici 16. Zabeležena je dozno zavisna sposobnost ekstrakta da vrši inhibiciju DPPH radikala. Procenat inhibicije je proporcionalan antioksidativnoj aktivnosti supstance. Procenat inhibicije od 50% je dobijen sa koncentracijom ekstrakta 1,75 mg/mL, a skoro potpuna inhibicija je postignuta sa koncentracijom približno 17,5 mg/mL. Pri nižim vrednostima koncentracije ekstrakta, dobijene su niske vrednosti inhibicije radikala. Dobijene vrednosti za efikasnu koncentraciju (50% inhibicije) ukazuju na slabu antioksidativnu aktivnost ekstrakta, imajući u vidu da koncentracija ekstrakta lista masline od 1,75 mg/mL postiže isti efekat kao referentna supstanca, vitamin C, u koncentraciji od 0,054 mg/mL.



Slika 16. Smanjenje aktivnosti DPPH radikala pri različitim koncentracijama ekstrakta lista masline (DOLE)

3.1.2. Analiza sposobnosti hvatanja ABTS radikala

Za ispitivanje antioksidativne sposobnosti ekstrakta lista masline, korišćena je i ABTS metoda. Osim DPPH metode, na ovaj način se takođe može proceniti sposobnost ispitivanog ekstrakta da inhibira produkciju slobodnih radikala. Antioksidativne sposobnosti različitih koncentracija ekstrakta lista masline, izražene preko procenta inhibicije ABTS radikala prikazane su na slici 17. Kao i u DPPH testu, rezultati su pokazali da se procenat inhibicije uvećavao sa porastom koncentracije ekstrakta lista masline. Efikasne koncentracije koje su izazivale preko 50% inhibicije ABTS radikala su bile veće od 1,75 mg/mL, dok je maksimalna inhibicija postignuta sa koncentracijom približno 17,5 mg/mL.

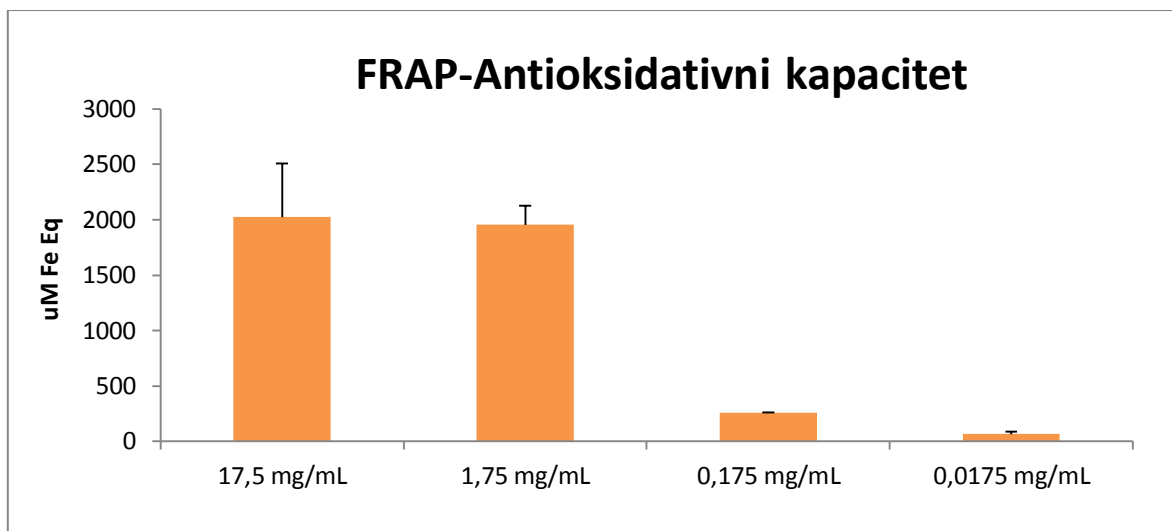


Slika 17. Smanjenje aktivnosti ABTS radikala pri različitim koncentracijama ekstrakta lista masline (DOLE)

3.1.3. Analiza ukupne redukcione sposobnosti primenom FRAP metode

Redukciona sposobnost spektra ispitivanih koncentracija ekstrakta lista masline u FRAP testu prikazana je na slici 18. U FRAP testu redukcione sposobnosti, doniranjem elektrona od strane antioksidansa dolazi do redukcije kompleksa feri-tripiridiltriazina [Fe^{3+} -TPTZ] do kompleksa fero-tripiridiltriazina [Fe^{2+} -TPTZ] koji je intezivno plave boje i reakcija se prati određivanjem apsorpcije na 593 nm (maksimum apsorpcije redukcionog

proizvoda). Na osnovu prikazanih rezultata se uočava da je najveću FRAP vrednost, a time i najbolju redukcionu sposobnost, pokazala najveća koncentracija ekstrakta od 17,5 mg/mL, dok su značajne redukcionne sposobnosti detektovane pri koncentraciji od 1,75 mg/mL.



Slika 18. Redukciona sposobnost različitih koncentracija ekstrakta lista masline (DOLE) u FRAP testu

3.2. REZULTATI ISPITIVANJA KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM

3.2.1. DEMOGRAFSKI PODACI, OSNOVNI KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM

Početne vrednosti kliničkih parametara, indikatora aktivnosti bolesti i kliničkih biohemijskih pokazatelja kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom podeljenih u 3 eksperimentalne grupe, su prikazane u Tabeli 2. Ispitivanjem demografskih karakteristika pacijenata sa RA, pokazano je da su među pacijentima dominirale osobe ženskog pola (79,4%). Dve eksperimentalne grupe pacijenata u ranoj fazi RA, bile su približno jednakih vrednosti u pogledu perioda početka bolesti i propisanih doza metotreksata sa kojom treba

da započnu terapiju u studiji. Takođe, dve pomenute grupe su imale slične vrednosti svih parametara aktivnosti bolesti. Pacijenti iz grupe sa dugotrajnim RA, imali su prosečan period trajanja bolesti $13,8 \pm 11,3$ godina i primali su 10 mg do 17,5 mg metotreksata nedeljno, u pojedinačnim terapijskim dozama tokom minimum 6 meseci pre početka učešća u studiji.

Tabela 2. Opšti podaci, kliničke karakteristike i parametri aktivnosti bolesti kod grupa pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i opšte karakteristike zdravih kontrolnih ispitanika na početku studije.

Demografske karakteristike	Pacijenti sa RA		Zdravi kontrolni ispitanici
Starost (godine)	65.1 ± 11.2		54.2 ± 9.1
Ženski pol, br. ispitanika (%)	27 (79.4%)		7 (70.0%)
Muški pol, br. ispitanika (%)	5 (21.6%)		3 (30%)
Pušenje, br. ispitanika (%), prosečan broj cigareta po danu	13 (38.2%); 11.3 ± 5.5		3 (33.0%); 5.3 ± 0.8
Konzumiranje alkohola, br. ispitanika (%), prosečan broj alkoholnih pića po danu	8 (23.6%); 1.6 ± 0.7		2 (20.0%); 0.5 ± 0.8
Kliničke karakteristike pacijenata sa RA	Pacijenti u ranoj fazi RA (R MTX) (n=8)	Pacijenti u ranoj fazi RA (R MTX + DOLE) (n=8)	Pacijenti sa dugotrajnim RA (D-t MTX + DOLE) (n=16)
Trajanje bolesti (godine)	<1	<1	3-35 (13.8 ± 11.3)
Početak bolesti (godine)	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.6	14.9 ± 11.7
Pozitivni na RF, br. ispitanika (%)	6 (75%)	7 (87.5%)	16 (100%)
Propisana terapijska koncentracija metotreksata (mg/ nedeljno)	9.7 ± 0.9	9.7 ± 0.9	11.8 ± 2.9
Indikatori aktivnosti bolesti			
Br. bolnih zglobova	11.6 ± 4.1	11.5 ± 5.6	6.5 ± 5.9
Br. otečenih zglobova	6.1 ± 1.4	5.0 ± 2.2	2.3 ± 1.7
Vrednosti DAS28 ESR	5.6 ± 0.7	5.6 ± 0.9	4.6 ± 1.1
Vrednosti DAS28 CRP	4.7 ± 0.6	5.1 ± 0.7	3.8 ± 1.1
PGA (Vizuelna Analogna Skala)	64.4 ± 17.6	70.7 ± 19.0	51.9 ± 17.1
PGH (Vizuelna Analogna Skala)	65.1 ± 16.0	61.9 ± 18.7	53.2 ± 16.2
PhGA (Vizuelna Analogna Skala)	54.4 ± 17.1	58.6 ± 16.1	47.7 ± 11.6
Klinički laboratorijski parametri			
Serum CRP (mg/ L)	3.3 ± 3.7	9.8 ± 8.0	7.9 ± 6.3
Fibrinogen (g/ L)	4.1 ± 0.9	4.5 ± 1.3	4.7 ± 1.2
SE	25.0 ± 13.4	31.1 ± 15.3	28.3 ± 15.4

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

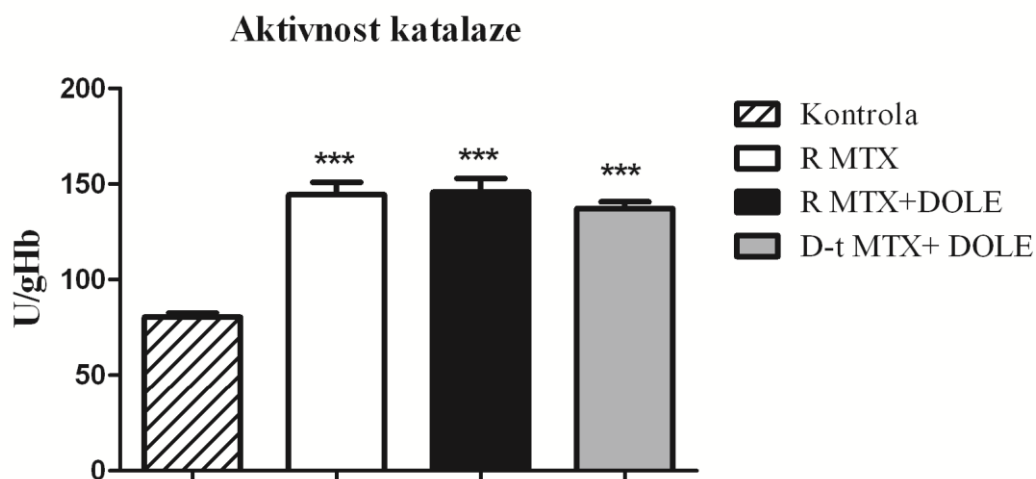
Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD.

Tokom šestonedelnog trajanja studije, pacijenti su primali nepromenjene doze metotreksata. Sve tri eksperimentalne grupe pacijenata sa RA su pokazale početnu vrednost DAS 28 > 3,2 izraženu i preko DAS ESR i kroz DAS CRP, ukazujući na umeren do visok stepen aktivnosti bolesti. Upoređivanjem parametara aktivnosti bolesti, utvrđena je veća aktivnost bolesti u dve grupe RA pacijenata u ranoj fazi bolesti u odnosu na grupu sa dugotrajnim RA.

3.2.2. ANALIZA PARAMETARA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM

3.2.2.1. Nivo aktivnosti enzima katalaze (CAT) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritisom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Aktivnost enzima katalaze u eritrocitima pacijenata u ranoj fazi reumatoidnog artritisa, kao i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem, ispitivan je pre uvođenja eksperimentalne terapije, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 19. Ispitivanja su obavljena u okviru dve grupe pacijenata sa ranim RA (R MTX, R MTX+DOLE) i jedne grupe pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem (D-t MTX+DOLE). Uočeno je značajno povećanje ($p < 0,001$) aktivnosti enzima katalaze kod svih grupa obolelih od reumatoidnog artritisa u odnosu na aktivnost zabeleženu kod zdravih kontrolnih ispitanika. Poređenjem vrednosti između grupa pacijenata sa RA, kod pacijenata sa dugotrajnim RA utvrđena je nešto niža aktivnost katalaze nego kod pacijenata u ranoj fazi RA, međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na dve grupe obolelih u ranoj fazi bolesti.



*Slika 19. Nivo aktivnosti enzima katalaze pre uvođenja eksperimentalne terapije kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na kontrolu.*

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu terapiju samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE

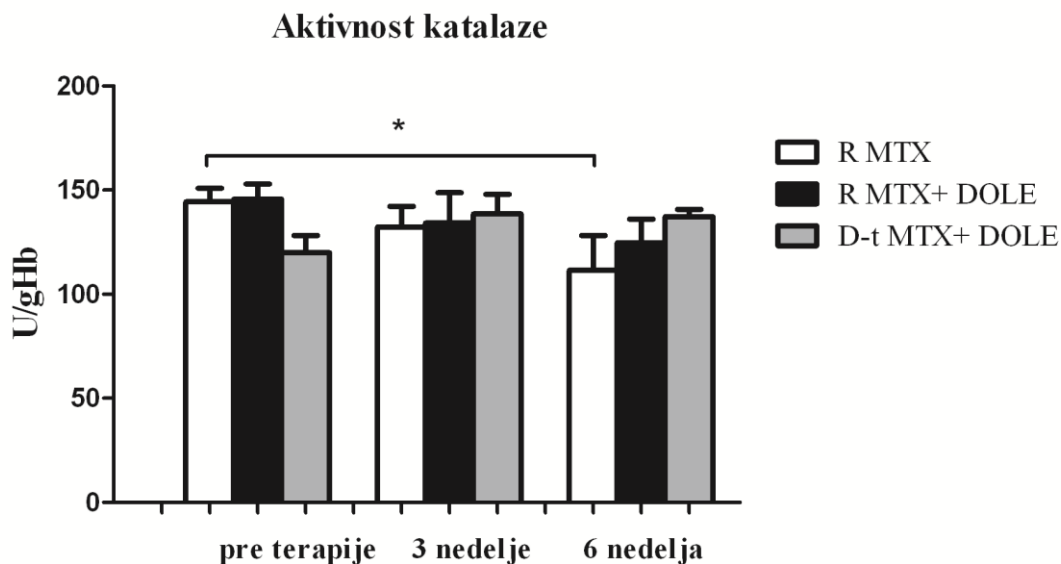
3.2.2.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na aktivnost enzima katalaze (CAT) kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na aktivnost enzima CAT u periodu od 3 i 6 nedelja kod pacijenata rane faze, kao i kod pacijenata sa dugotrajnim reumatoidnim artritismom, prikazan je na slici 20. Takođe su

prikazane i vrednosti aktivnosti katalaze kod grupe pacijenata u ranoj fazi RA koja je tretirana samo metotreksatom tokom 3 i 6 nedelja.

Kod obe grupe pacijenata sa ranim RA zabeleženo je opadanje aktivnosti CAT posle 3 nedelje. Kod istih grupa, posle 6 nedelja došlo je do dalje redukcije aktivnosti katalaze u odnosu na 3 nedelje. Pri tome, statistički značajno sniženje ($p < 0,05$) u odnosu na početnu vrednost postignuto je posle 6 nedelja samo u grupi R MTX, koja je bila na terapiji samo metotreksatom, ali ne i u grupi sa ranim RA na kombinovanoj terapiji MTX i DOLE. S druge strane, u grupi pacijenata sa dugotrajnim RA na kombinovanoj terapiji, zabeleženo je slabo povećanje aktivnosti CAT nakon 3 nedelje u odnosu na početnu vrednost, međutim, značajnost razlike nije pokazana. Posle 6 nedelja, aktivnost katalaze kod dugotrajno obolelih pacijenata je ostala nepromenjena u odnosu na nivo od 3 nedelje.

Poređenjem šestonedeljnih vrednosti aktivnosti katalaze između tri grupe pacijenata, nisu utvrđene značajne razlike. Najnižu vrednost je pokazala grupa R MTX koja je bila samo na metotreksatu, dok je najvišu vrednost imala grupa pacijenata sa dugotrajnim RA na kombinovanoj terapiji (D-t MTX+DOLE).



Slika 20. Nivo aktivnosti enzima katalaze pre tretmana, posle 3 i 6 nedelja tretmana u grupama pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na početnu vrednost pre uvođenja eksperimentalne terapije.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

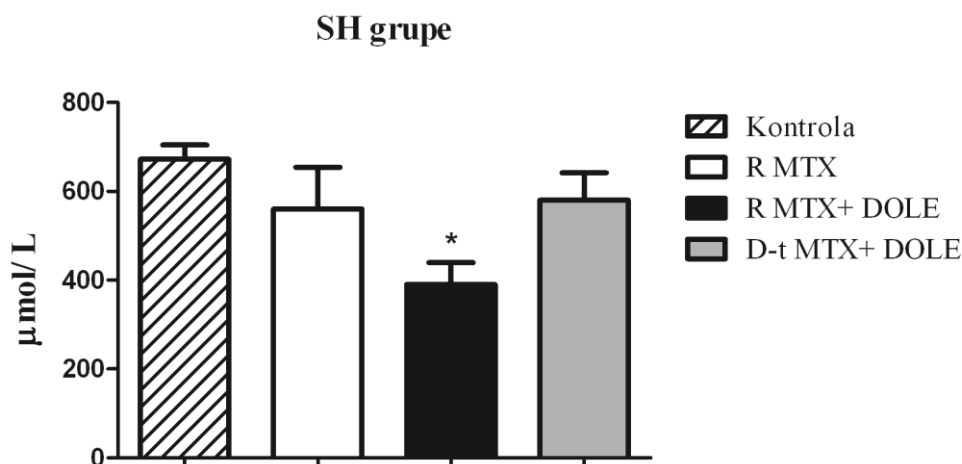
R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.2.3. Koncentracija slobodnih tiolnih grupa u plazmi (SH) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Na slici 21 prikazane su početne koncentracije slobodnih tiolnih grupa iz plazme pacijenata u ranoj fazi reumatoidnog artritisa, kao i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem pre uvođenja eksperimentalne terapije. Zabeleženi su sniženi nivoi slobodnih tiolnih grupa u sve tri grupe sa RA u odnosu na vrednosti kontrolne grupe. Najniža vrednost utvrđena je kod grupe pacijenata R MTX+ DOLE i bila je značajno snižena u odnosu na vrednosti u kontrolama ($p < 0,05$). Kod ostalih grupa pacijenata sa RA nije pokazana značajna razlika u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Kada su upoređene vrednosti u dve grupe pacijenata u ranoj fazi RA sa vrednostima kod dugotrajnih pacijenata, nisu pokazane značajne razlike u koncentraciji tiolnih grupa.



Slika 21. Koncentracije tiolnih grupa (SH) pre uvođenja eksperimentalne terapije kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu terapiju samo metotreksatom

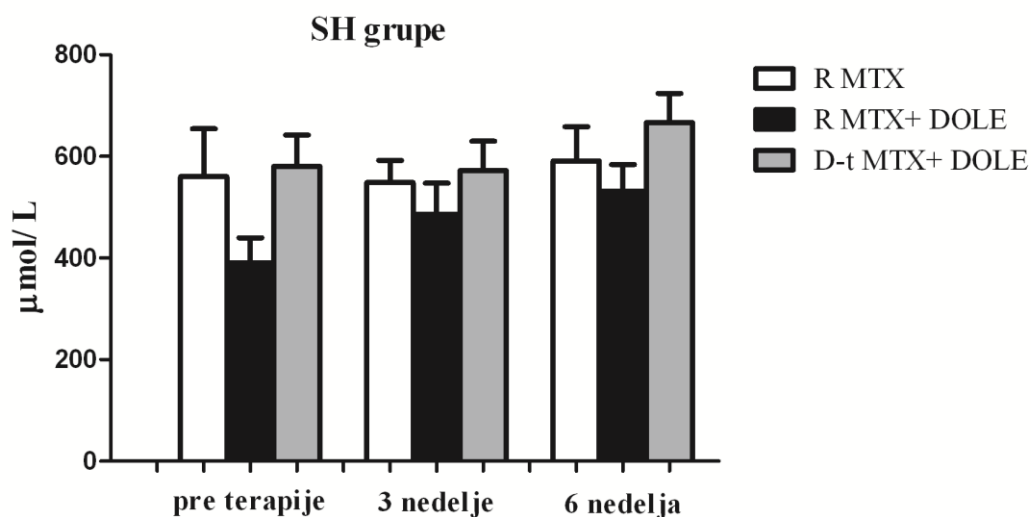
R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE

3.2.2.4. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na koncentraciju tiolnih grupa (SH) u plazmi pacijenata sa reumatoidnim artritisom

Rezultati uticaja kombinovane terapije MTX i DOLE posle 3 i 6 nedelja na nivo slobodnih tiolnih grupa u plazmi pacijenata sa RA, kao i kod grupe pacijenata tretirane samo metotreksatom prikazani su na slici 22. Posle 3 nedelje tretmana, uočeno je povećanje nivoa SH grupa kod pacijenata rane faze na kombinovanoj terapiji MTX i DOLE, međutim bez statističke značajnosti. Kod ostale dve grupe pacijenata nisu zabeležene promene nakon

3 nedelje. Posle 6 nedelja, u grupi rane faze RA na kombinovanoj terapiji ustanovljeno je povećanje vrednosti u odnosu na početnu vredost i vrednost dobijenu nakon 3 nedelje, ali razlike i dalje nisu bile statistički značajne. Kod pacijenata sa dugotrajnim RA koji su bili na kombinovanoj terapiji takođe je posle 6 nedelja uočen porast koncentracije SH grupa, u odnosu na početni nivo pre terapije. U grupi R MTX koja je bila na terapiji samo metotreksatom, nisu zabeležene promene u ukupnom sadržaju tiolnih grupa tokom šestonedelnog perioda. Uprkos pokazanim promenama tokom 6 nedelja u grupama na kombinovanom tretmanu, razlike nisu pokazale značajnost ni u jednoj od grupa u poređenju sa njihovim početnim vrednostima. Poređenjem šestonedelnih vrednosti između tri grupe pacijenata sa RA, nisu utvrđene statistički značajne razlike.



Slika 22. Koncentracija slobodnih tiolnih grupa u plazmi (SH) pre tretmana, posle 3 i 6 nedelja tretmana u grupama pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

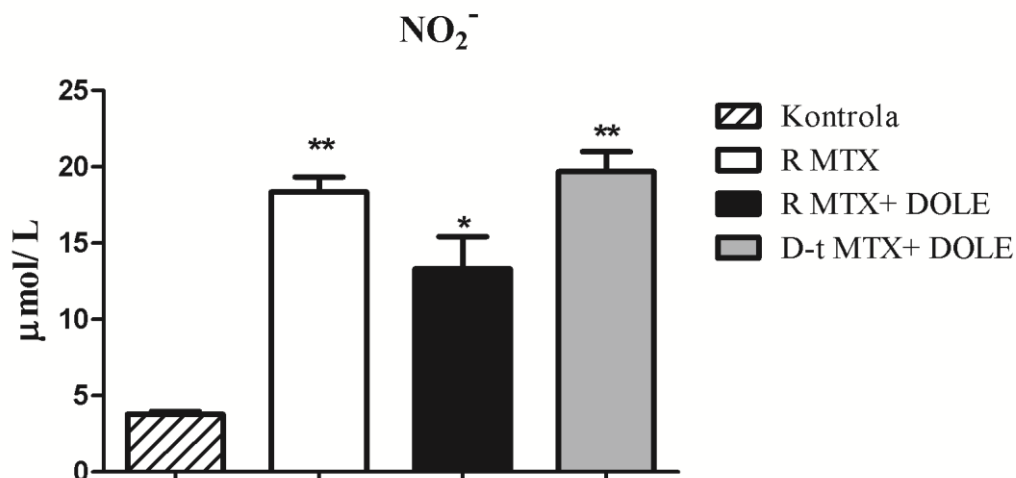
D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.3. ANALIZA PARAMETARA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA ĆELIJE KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM

3.2.3.1. Indikatori oksidativnog oštećenja proteina (nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritisom pre uvođenja eksperimentalne terapije

3.2.3.1.1. Rezultati koncentracija nitrita (NO_2^-) pre uvođenja eksperimentalne terapije

Nivo nitrita zabeležen na početku studije pre uvođenja eksperimentalne terapije u grupama pacijenata sa RA i kod zdravih kontrolnih ispitanika prikazan je na slici 23. Koncentracije slobodnih nitrita u svim grupama pacijenta sa RA pre započinjanja tretmana bile su povišene značajno u odnosu na kontrolnu grupu. Manju razliku u vrednostima na početku studije u odnosu na kontrolnu, pokazala je grupa pacijenata u ranoj fazi RA koja treba da započne kombinovanu terapiju MTX i DOLE ($p < 0,05$), dok su ostale dve grupe pokazale izrazito povišene vrednosti u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$). Međutim, statistički značajnih razika između grupa pacijenata u ranoj fazi RA i grupe sa dugotrajnim RA nije bilo.



Slika 23. Koncentracije nitrata (NO_2^-) pre uvođenja eksperimentalne terapije kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (); $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na kontrolu.*

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

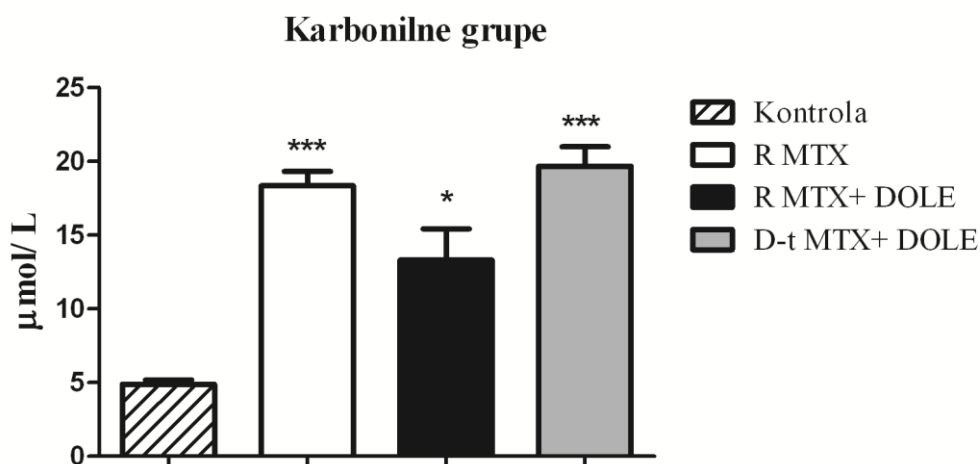
R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu terapiju samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE

3.2.3.1.2. Rezultati koncentracija karbonilnih grupa pre uvođenja eksperimentalne terapije

Slika 24 pokazuje izmerene koncentracije karbonilnih grupa proteina u grupama pacijenata sa RA u ranoj fazi bolesti i kod grupe sa dugotrajnim oboljenjem pre uvođenja eksperimentalne terapije, kao i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Koncentracija karbonilnih grupa u početnim uzorcima sve tri grupe pacijenata sa RA bila je značajno povišena u odnosu na nivo zabeležen u kontrolama ($p < 0,05$). Približne vrednosti koncentracije karbonilnih grupa su zabeležene kod obe grupe pacijenata u ranoj fazi RA i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem. Nije bilo statistički značajnih međusobnih razlika u nivou karbonilnih grupa između tri eksperimentalne grupe pacijenata sa RA pre uvođenja eksperimentalne terapije.



Slika 24. Koncentracije karbonilnih grupa pre uvođenja eksperimentalne terapije kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. $p < 0,05$ (); $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na kontrolu.*

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu terapiju samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji treba da započnu kombinovanu terapiju sa metotreksatom i DOLE

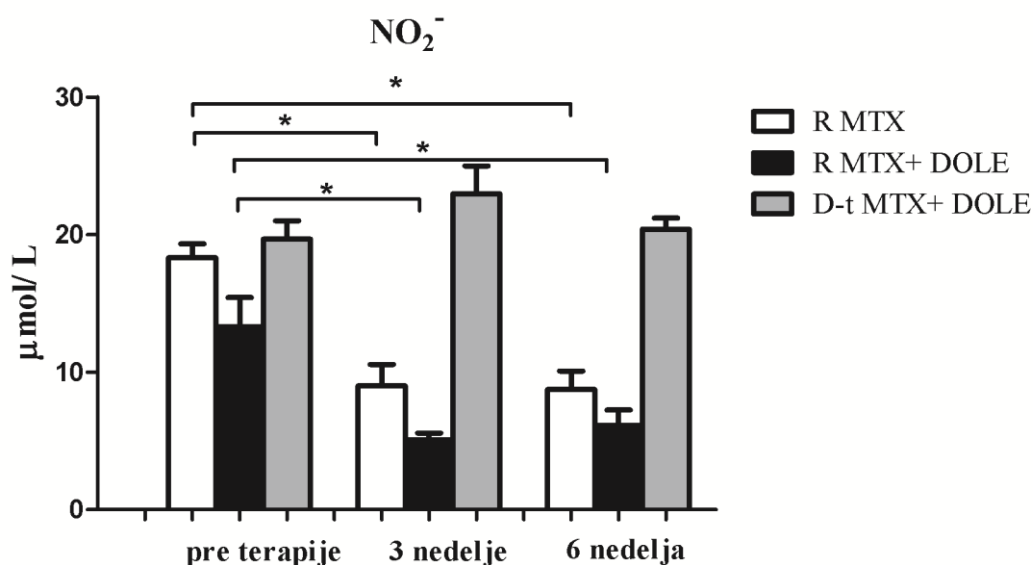
3.2.3.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na indikatore oksidativnog oštećenja proteina (nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

3.2.3.1.1. Uticaj kombinovane terapije na koncentraciju nitrita (NO₂⁻)

Nivo nitrita pre tretmana i nakon 3 i 6 nedelja kombinovane terapije MTX i DOLE u grupama pacijenata sa RA kao i promene vrednosti nitrita u grupi pacijenata koja je samo

na terapiji metotreksatom prikazan je na slici 25. Posle 3 nedelje, obe grupe pacijenata u ranoj fazi bolesti R MTX i R MTX + DOLE su pokazale izražen pad koncentracije nitrita u odnosu na početnu vrednost ($p < 0,05$). Sniženje vrednosti u pomenute dve grupe je zabeleženo već posle 3 nedelje i isti nivo vrednosti nitrita je zadržan i posle 6 nedelja. S druge strane, grupa pacijenata sa dugotrajnim RA na kombinovanoj terapiji pokazala je nepromenjen nivo nitrita tokom trajanja studije. Koncentracije nitrita kod ove grupe pacijenata su ostale visoke tokom 3 i 6 nedelja.

Upoređivanjem koncentracija nitrita između tri grupe pacijenata sa RA nakon 6 nedelja, pokazana je veća vrednost kod grupe sa dugotrajnim RA u odnosu na obe grupe u ranoj fazi RA. S druge strane, nije bilo međusobnih razlika u koncentraciji nitrita nakon 6 nedelja između grupe u ranoj fazi koja je bila samo na metotreksatu i grupe koja je bila na kombinovanoj terapiji.



Slika 25. Koncentracija nitrita u plazmi (NO_2^-) pre tretmana, posle 3 i posle 6 nedelja tretmana u grupama pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na početnu vrednost pre uvođenja eksperimentalne terapije.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

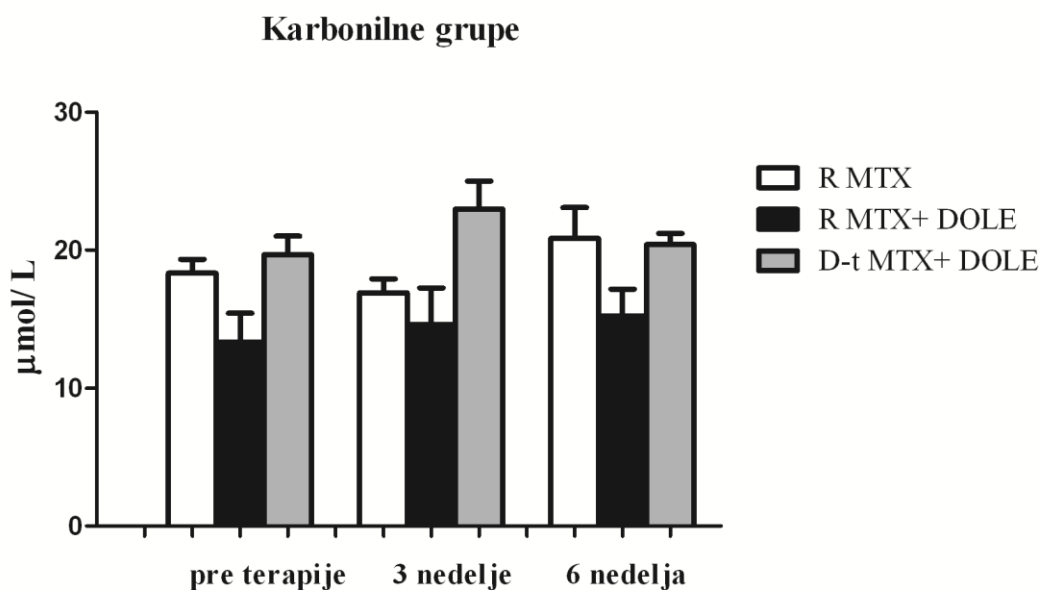
R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.3.1.2. Uticaj kombinovane terapije na koncentraciju karbonilnih grupa

Slika 26 prikazuje izmerene koncentracije karbonilnih grupa proteina u grupi pacijenata sa RA u ranoj fazi bolesti i kod grupe sa dugotrajnim oboljenjem, nakon 3 i 6 nedelja kombinovane terapije MTX i DOLE. Takođe su prikazane i promene vrednosti karbonilnih grupa kod pacijenata u ranoj fazi RA koji su bili na terapiji samo metotreksatom tokom 6 nedelja. Visok nivo karbonilnih grupa koji je zabeležen na početku studije kod obe grupe pacijenata u ranoj fazi RA je ostao nepromenjen nakon 3 nedelje, dok su se koncentracije karbonilnih grupa kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem uvećale posle 3 nedelje. Posle 6 nedelja kod grupa pacijenata sa ranim kao i dugotrajnim RA na terapiji ekstraktom lista masline i metotreksatom nije došlo do značajnih promena u ukupnom sadržaju karbonilnih grupa u odnosu na početni nivo. Njihove vrednosti ostale su približne vrednostima od 3 nedelje. Slično kao i kod dve grupe pacijenata na kombinovanoj terapiji, ni kod ispitanika na terapiji samo sa metotreksatom nije bilo značajnog efekta terapije na promenu nivoa karbonilnih grupa posle 3, kao ni posle 6 nedelja. Kada su upoređene šestonedeljne koncentracije karbonilnih grupa između tri grupe pacijenata, nisu zabeležene značajne razlike, i vrednosti sve tri grupe su bile približne.



Slika 26. *Koncentracija karbonilnih grupa pre tretmana, posle 3 i posle 6 nedelja tretmana u grupama pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.*

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

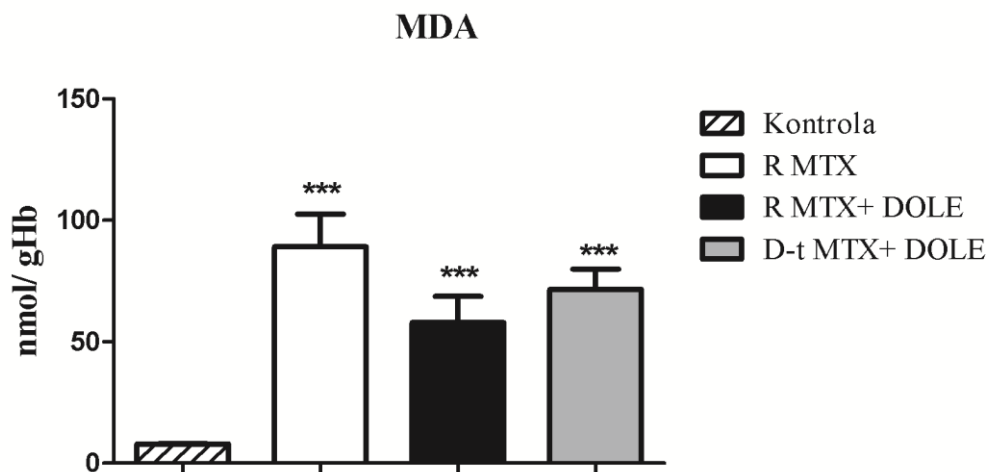
3.2.3.3. Indikatori lipidne peroksidacije kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Da bi se ispitaio uticaj oksidativnog stresa na nivo oštećenja ćelijskih membrana kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom, kao i njegova modulacija pod uticajem kombinovane terapije metotreksatom i DOLE, određivane su koncentracije

malondialdehida preko TBARS, kao i aktivnosti izoenzima laktat-dehidrogenaze kao specifičnog pokazatelja oštećenja membrane u ćelijama određenih organa.

3.2.3.3.1. Rezultati nivoa malondialdehida (MDA)

Slika 26 pokazuje izmerene koncentracije MDA kod grupa pacijenata sa RA u ranoj fazi bolesti kao i kod grupe sa dugotrajnim oboljenjem pre uvođenja eksperimentalne terapije i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Vrednosti MDA pre uvođenja terapije u sve tri grupe pacijenata su bile značajno povišene u odnosu na koncentracije pokazane u kontrolnim uzorcima. Najviša koncentracija MDA zabeležena je kod grupe pacijenata u ranoj fazi RA, R MTX. Grupa pacijenata sa dugotrajnim RA imala je koncentracije MDA koje su bile približne grupama sa ranim RA. Upoređivanjem vrednosti između tri različite grupe pacijenata sa RA, pa nisu zabeležene statistički značajne razlike.



*Slika 27. Koncentracija malondialdehida (MDA) pre uvođenja eksperimentalne terapije u grupama pacijenata sa reumatoidnim artritisom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***) : značajna razlika u odnosu na kontrolu.*

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

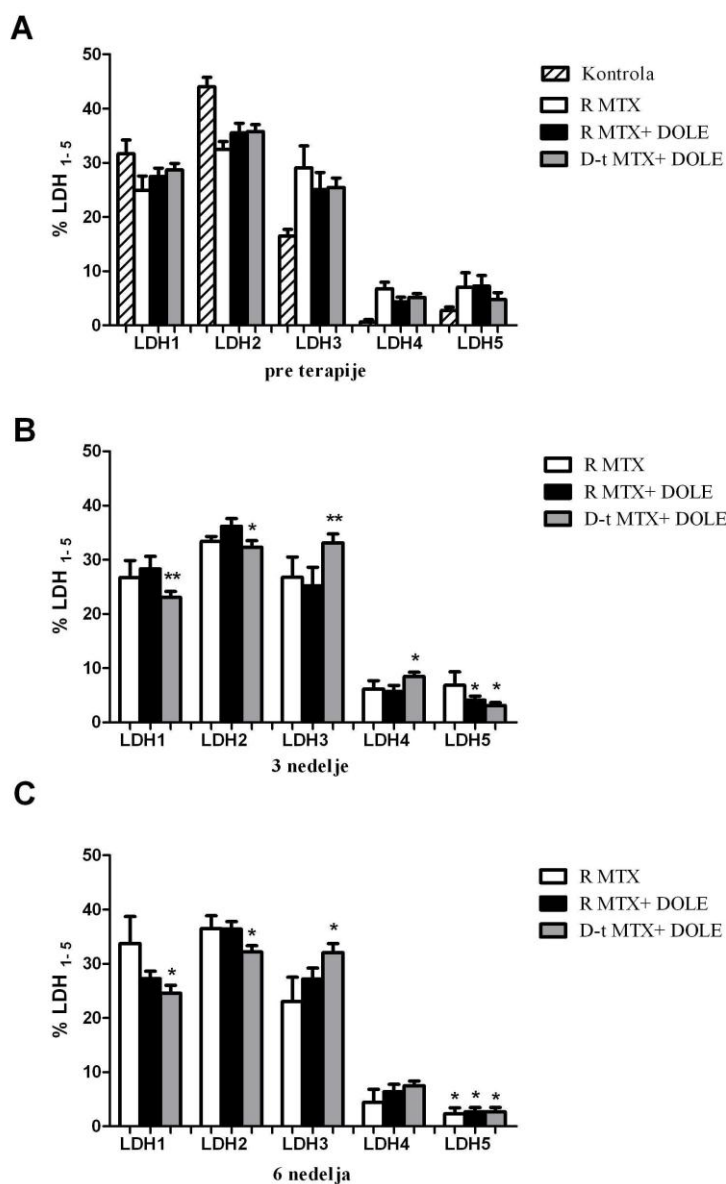
R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.3.3.2. Rezultati izoenzimske distribucije enzima laktat-dehidrogenaze

Ispitivanja aktivnosti izoenzima LDH₁₋₅ kod grupa pacijenata sa RA u ranoj fazi bolesti kao i kod grupe sa dugotrajnim oboljenjem pre uvođenja eksperimentalne terapije i kod zdravih kontrolnih ispitanika su prikazana na slici 28A. Analizom zabeleženih vrednosti je utvrđeno da sve tri eksperimentalne grupe pacijenata sa RA pokazuju povišene aktivnosti LDH₃, LDH₄, LDH₅ i smanjenu aktivost LDH₁ i LDH₂ u odnosu na aktivnost istih LDH izoenzima kod kontrole (Slika 28A). Međutim, statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu nisu dobijene. Takođe nisu zabeležene statistički značajne razlike u vrednostima LDH izoenzima ni između različitih grupa pacijenata sa RA pre uvođenja terapije. Približne vrednosti su zabeležene kod obe grupa u ranoj fazi RA kao i kod grupe sa dugotrajnim RA.



Slika 28. Distribucija tkivno-specifičnih izoenzimskih formi laktat-dehidrogenaze (LDH₁₋₅) pre tretmana, posle 3 i posle 6 nedelja tretmana u grupama pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**): značajna razlika nakon 3 i 6 nedelja u odnosu na početnu vrednost pre uvođenja eksperimentalne terapije.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

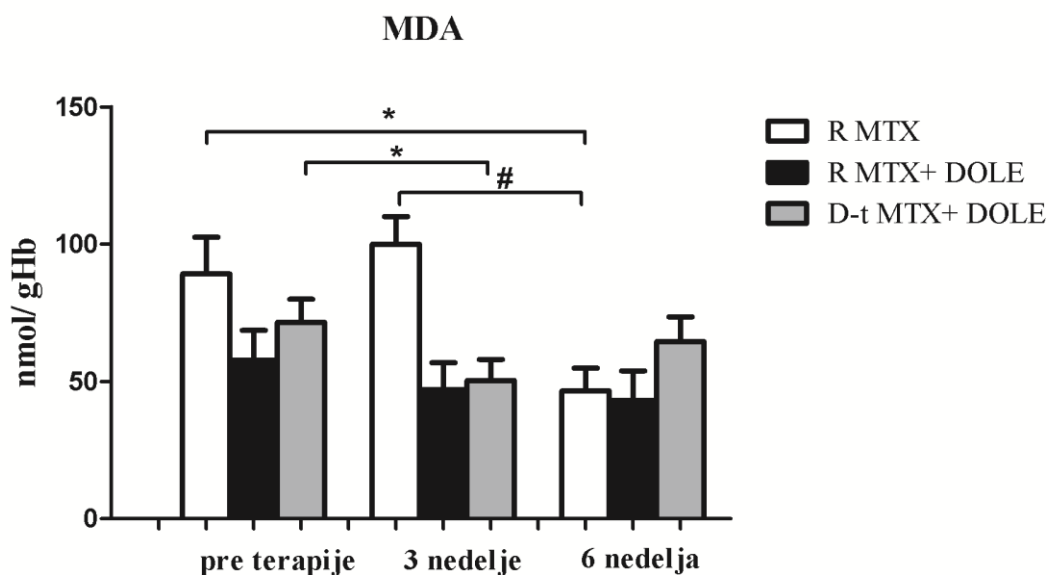
R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.3.4. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na indikatore lipidne peroksidacije kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

3.2.3.4.1. Uticaj kombinovane terapije na nivo malondialdehida (MDA)

Uticaj kombinovane terapije MTX i DOLE-om na stepen lipidne peroksidacije izražen preko koncentracije MDA posle 3 i 6 nedelja tretmana prikazan je na slici 29. Takođe su prikazane i promene vrednosti MDA u grupi pacijenata koja je samo na terapiji metotreksatom. Kod dve grupe na kombinovanoj terapiji R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE utvrđene su snižene vrednosti posle 3 nedelje u odnosu na početne vrednosti pre tretmana. Grupa D-t MTX+DOLE pokazala je statistički značajno nižu koncentraciju MDA posle 3 nedelje u odnosu na početni nivo ($p < 0,05$), dok u grupi R MTX+DOLE redukcija nije bila značajna. S druge strane, grupa R MTX koja je bila na terapiji samo metotreksatom, posle 3 nedelje ostala je na istom nivou vrednosti kao i pre uvođenja terapije. Međutim, posle 6 nedelja tretmana, grupa R MTX je pokazala statistički značajan pad koncentracije MDA u odnosu na vrednosti dobijene nakon tri nedelje. S druge strane, kod dve grupe na kombinovanoj terapiji R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE vrednosti dobijene posle 6 nedelja ostale su nepromenjene u poređenju sa vrednostima MDA nakon 3 nedelje.



Slika 29. Koncentracija malondialdehida (MDA) pre tretmana, posle 3 i posle 6 nedelja tretmana u grupama pacijenata sa reumatoidnim artritisom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na početnu vrednost pre uvođenja eksperimentalne terapije. $p < 0,05$ (#): značajna razlika 6 nedelja u odnosu na 3 nedelje.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.3.4.2. Uticaj kombinovane terapije na izoenzimsku distribuciju enzima laktat-dehidrogenaze

Uticaj kombinovane terapije MTX i DOLE u trajanju od 3 i 6 nedelja na izoenzimski profil pacijenata sa ranim RA kao i kod pacijenata sa dugotrajnim RA, i efekat terapije samo metotreksatom kod pacijenata u ranoj fazi RA prikazan je na slici 28 B i C. Nakon 3 nedelje primene terapije, dve grupe u ranoj fazi RA nisu pokazale značajne

promene aktivnosti izoenzima u odnosu na vrednosti pre terapije (Slika 28B). Izuzetak je vrednost LDH₅ koja je značajno snižena posle 3 nedelje kombinovanog tretmana kod grupe u ranoj fazi RA ($p < 0,05$). Za razliku od grupa pacijenata u ranoj fazi RA, kod grupe sa dugotrajnim RA na kombinovanoj terapiji, zabeleženo je značajno smanjenje aktivnosti LDH₁, LDH₂ i LDH₅ posle 3 nedelje, dok su nivoi aktivnosti LDH₃ i LDH₄ povećani u odnosu na njihovu početnu vrednost.

Posle šest nedelja od početka terapije, obe grupe pacijenata u ranoj fazi RA nisu pokazale promene vrednosti izoenzimske aktivnosti u odnosu na rezultate dobijene pre terapije kao ni u odnosu na vrednosti izmerene nakon tri nedelje. Izuzetak je zabeležen za nivo aktivnosti LDH₅, koji je pokazao značajno nižu vrednost u odnosu na vrednost pre terapije i u R MTX kao i u R MTX + DOLE grupi (Slika 28B i C). U obe grupe pacijenata u ranoj fazi RA i kod pacijenata sa dugotrajnim RA posle 6 nedelja je došlo do statistički značajnog sniženja aktivnosti LDH₅ u odnosu na početnu vrednost pre tretmana ($p < 0,05$). Osim toga, kod pacijenata sa dugotrajnim RA, nakon 6 nedelja zabeležena je i značajno niža aktivnost LDH₁ i LDH₂ i povećana aktivnost izoenzima LDH₃ i LDH₄ u odnosu na vrednosti pre terapije, s tim što nije bilo razlike u odnosu na nivo aktivnosti istih izoenzima dobijenih posle 3 nedelje (Slika 28C).

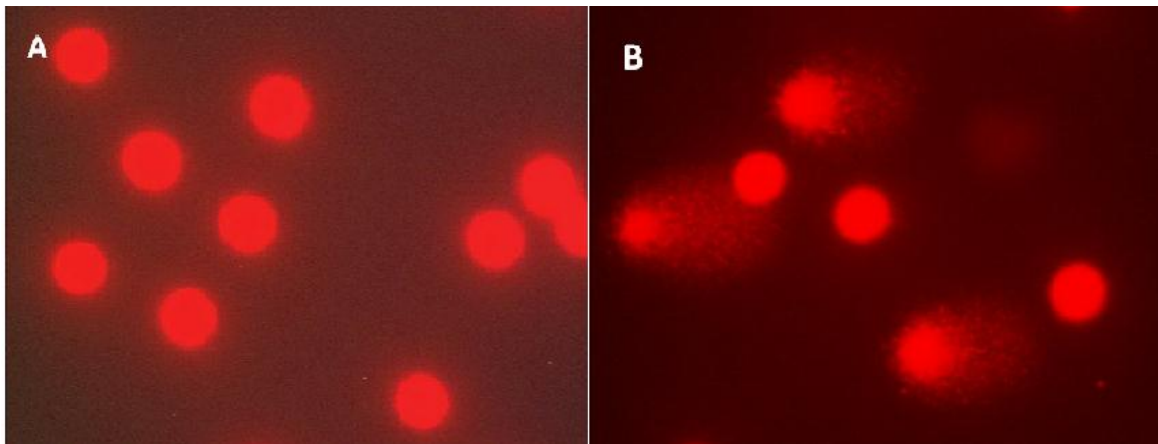
Poređenjem aktivnosti izoenzima LDH₁₋₅ nakon šest nedelja između tri grupe pacijenata sa RA, pokazano je da nema značajnih razlika u vrednostima, najverovatnije usled velikih devijacija u individualnim vrednostima unutar grupa.

3.2.4. ANALIZA PARAMETARA GENOMSKE NESTABILNOSTI KOD PACIJENATA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM

3.2.4.1. Analiza stepena DNK oštećenja kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritisom pre uvođenja eksperimentalne terapije

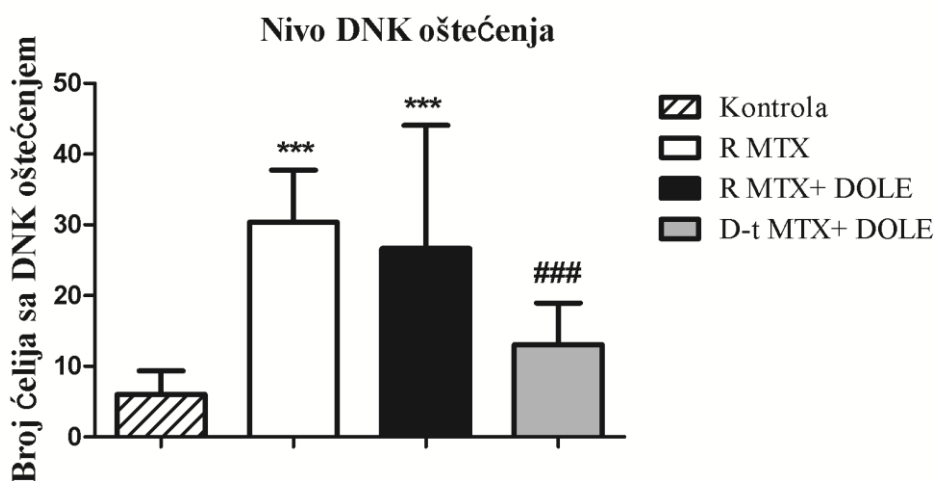
Kvantifikacija DNK oštećenja u limfocitima pacijenata sa RA izvršena je evaluacijom ukupnog broja ćelija sa različitim stepenom fragmentacije DNK (Slika 15). Na slici 30 dat je primer preparata limfocita u komet testu kod kontrola, gde je većina ćelija

bez oštećenja i migracije DNK (Slika 30A), i kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Slika 30B), gde se mogu uvideti ćelije sa različitim stepenom migracije oštećene DNK.



Slika 30. Primer prepata limfocita u komet testu kod A) kontrola (ćelije bez oštećenja i migracije DNK) i B) pacijenata sa reumatoidnim artritisom (ćelije sa različitim stepenom migracije oštećene DNK)

Na slici 31 prikazan je nivo DNK oštećenja u limfocitima periferne krvi tri grupe pacijenata sa RA, pre uvođenja eksperimentalne terapije. Rezultati su pokazali povišene nivoe oštećenja DNK u početnim uzorcima sve tri grupe RA pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, što se moglo uočiti kroz povećanje srednjeg broja limfocita sa oštećenom DNK. U grupama R MTX i R MTX + DOLE pre početka tretmana zabeleženi su značajno povišeni nivoi DNK oštećenja ($28,28 \pm 1,9$ i $30,75 \pm 3,90$) u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$). Kod pacijenata sa dugotrajnim RA je pokazan umeren nivo oštećenje DNK ($16,83 \pm 1,40$) koji nije bio značajno različit od kontrola ($6,00 \pm 0,59$). Poređenjem vrednosti između tri grupe pacijenata sa RA, utvrđen je značajno viši nivo DNK oštećenja u grupi rane faze oboljenja R MTX u odnosu na grupu pacijenata sa dugotrajnim artritisom ($p < 0,001$).



*Slika 31. Nivo DNK oštećenja u limfocitima periferne krvi pacijenata sa reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na kontrolu; $p < 0,001$ (###): značajna razlika u odnosu na R MTX.*

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

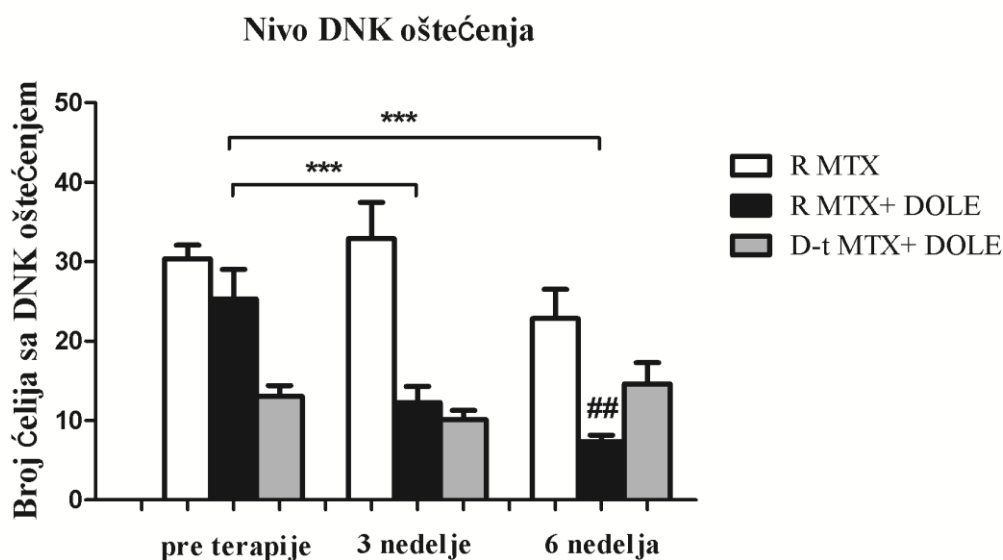
R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.4.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na stepen DNK oštećenja

Na Slici 32 su pokazani rezultati nivoa DNK oštećenja u limfocitima periferne krvi pacijenata sa RA u ranoj fazi i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem nakon 3 i 6 nedelja kombinovane terapije MTX i DOLE, kao rezultati grupe pacijenata u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom. Kod grupe R MTX + DOLE, nakon 3 nedelje od početka tretmana, broj limfocita sa oštećenom DNK je značajno smanjen ($p < 0,001$) u odnosu na početnu vrednost pre tretmana. U grupi R MTX ispoljen je pad DNK oštećenja tek nakon 6

nedelja, međutim razlika nije bila značajna u odnosu na početnu vrednost pre uvođenja terapije. Vrednosti u grupi D-t MTX + DOLE ostale su nepromenjene tokom 6 nedelja.



Slika 32. Nivo DNK oštećenja u limfocitima periferne krvi pacijenata sa reumatoidnim artritismom pre tretmana, posle 3 i posle 6 nedelja tretmana (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***) : značajna razlika u odnosu na početnu vrednost pre uvođenja eksperimentalne terapije. $p < 0,01$ (##) : značajna razlika u šestonedeljnim vrednostima u odnosu na grupu R MTX.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

Upoređivanjem rezultata dobijenih posle 6 nedelja između tri RA grupe, utvrđeno je da R MTX + DOLE pokazuje najmanji broj ćelija sa DNK oštećenjem ($7,84 \pm 0,95$). U grupama D-t MTX + DOLE i R MTX posle 6 nedelja dostignut je umeren stepen oštećenja

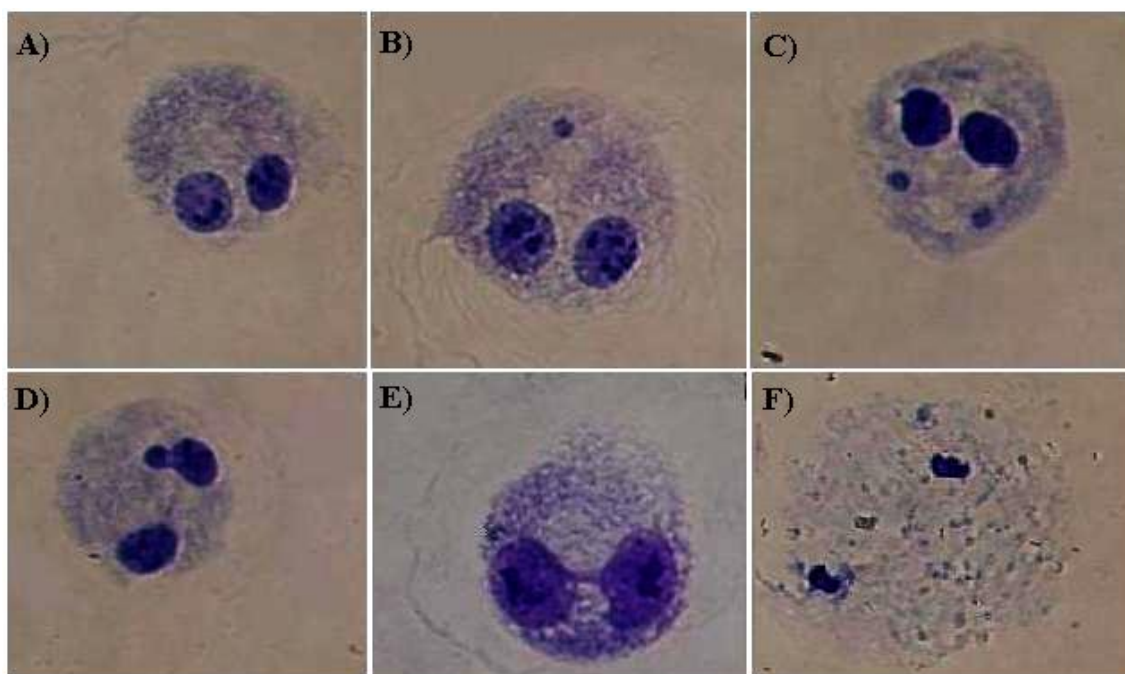
DNK ($13,84 \pm 1,6$ i $22,84 \pm 3,6$). Utvrđena je razlika između šestonedeljnog nivoa DNK oštećena kod grupe pacijenata u ranoj fazi RA samo na MTX i grupe koja je bila na tretmanu sa DOLE i MTX, gde je vrednost grupe na kombinovanom tretmanu bila značajno niža od grupe samo na MTX ($p < 0,01$).

3.2.4.3. Analiza parametara genomske nestabilnosti pomoću mikronukleus testa kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

U cilju ispitivanja prisustva genomske nestabilnosti kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim RA izvršena je analiza metodom mikronukleusa u kulturi limfocita periferne krvi. Mikronukleusi su uočavani u binukleusnim limfocitima u vidu hromatinskog materijala ovalnog oblika, morfološki identičnog, ali po veličini manjeg od glavnog jedra (dijametra od $1/16$ do $1/3$ veličine jedra) i čije se granice ne dodiruju sa jedrom. Binukleusni limfociti sa 1 ili više mikronukleusa, koji se mogu bodovati, su ilustrovani na Slici 33 B, C i predstavljaju uzorke limfocita pacijenata sa RA iz ove studije. U analizu nastalih promena u binukleusnim limfocitima u mikronukleus testu, uključene su i učestalosti drugih aberantnih promena, uzimajući u obzir nukleusne pupove i nukleoplazmatske mostove (Slika 33 D, E). Nukleusni pupovi su po izgledu i veličini slični mikronukleusima, ali su za razliku od njih spojeni svojim granicama sa glavnim jedrom. Primeri pronađeni u uzorcima pacijenta sa RA su prikazani na Slici 33 D. Nukleoplazmatski mostovi su identifikovani kao kontinuirana nukleoplazmatska nit koja se proteže između dva jedra binukleusne ćelije, koje može biti debljine do jedne četvrtine dijametra jedra. Primeri zabeleženi kod RA pacijenata su dati na Slici 33 E. Iz analize su isključene ćelije koje su bile u procesu apoptoze ili nekroze (Slika 33 F).

Analizom rezultata binukleusnih ćelija u mikronukleus testu pre uvođenja eksperimentalne terapije, pokazana je značajno veća učestalosti mikronukleusa u početnim uzorcima sve tri grupe pacijenata sa reumatoidnim artritismom nego u kontrolnoj grupi

($p < 0,05$) (Tabela 3). Najviša učestalost MN je pokazana u grupi R MTX. Poređenjem učestalosti MN između tri grupe pacijenata sa RA, nije zabeležena statistički značajna razlika. Kada su analizirane učestalosti drugih aberantnih promena u binukleusnim ćelijama, uzimajući u obzir nukleusne pupove i nukleoplazmatske mostove, nije pokazana značajna razlika između početnih vrednosti u grupama R MTX i R MTX+ DOLE kao ni u poređenju ovih grupa sa kontrolom, za oba parametra (Tabela 3). Sa druge strane, grupa D-t MTX+DOLE, pokazala je značajno povišene učestalosti NP i NPM u odnosu na kontrolne vrednosti, kao i u poređenju sa grupama u ranoj fazi RA ($p < 0,05$).



Slika 33. Fotografije preparata limfocita u mikronukleus testu kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom: A) binukleusna ćelija, B) binukleusna ćelija sa jednim mikronukleusom, C) binukleusna ćelija sa više mikronukleusa, D) binukleusna ćelija sa nukleusnim pupom, E) binukleusna ćelija sa nukleoplazmatskim mostom, F) nekrotična ćelija.

3.2.4.4. Uticaj kombinovane terapije na genomsku nestabilnost, prikazan pomoću mikronukleus testa

Upotrebom mikronukleus testa utvrđen je uticaj kombinovane terapije MTX i DOLE nakon 3 i 6 nedelja tretmana na stepen nestabilnosti genoma kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom. Takođe je evaluiran efekat terapije samo metotreksatom kod pacijenata u ranoj fazi RA u trajanju od tri i šest nedelja.

Tri nedelje nakon početka tretmana, učestalost MN je smanjena u odnosu na početne vrednosti u obe grupe pacijenata u ranoj fazi RA. Međutim, vrednosti detektovane posle 3 nedelja nisu bile statistički značajno različite od početnih vrednosti zabeleženih u ovim grupama pre terapije. Posle 6 nedelja nije došlo do značajnih promena učestalosti MN kod obe grupa pacijenata sa ranim RA u odnosu na učestalosti utvrđene posle 3 nedelje. Pacijenti grupe sa dugotrajnim RA nisu pokazali promenu učestalosti MN posle 3 kao ni posle 6 nedelja kombinovanog tretmana. Kada su analizirane promene u učestalostima drugih aberantnih promena u binukleusnim ćelijama, primećeno je da se učestalosti NP i NPM u grupama R MTX i R MTX+ DOLE nisu značajno promenile nakon 3 kao ni nakon 6 nedelja tretmana. Grupa D-t MTX+DOLE sa dugotrajnim RA na kombinovanom tretmanu pokazala je pad učestalosti oba parametra posle 6 nedelja. Učestalost nukleusnih pupova u toj grupi je svedena na vrednosti približne kontrolnim, dok je učestalost nukleoplazmatskih mostova nakon 6 nedelja i dalje bila značajno veća od kontrolne (Tabela 3).

RA grupe	Učestalost MN / 1000 ćelija			Učestalost NP/ 1000 ćelija			Učestalost NPM/ 1000 ćelija		
	Srednja vrednost ± SD			Srednja vrednost ± SD			Srednja vrednost ± SD		
	Min-Max			Min-Max			Min-Max		
	pre terapije	3 nedelje	6 nedelja	pre terapije	3 nedelje	6 nedelja	pre terapije	3 nedelje	6 nedelja
R MTX	35.3±18.0* 18-54	24.6±11.1 16-38	26.5±11.9 10-36	6.5±6.2 1-13	5.1±1.0 4-6	6.75±3.4 2-10	7.7±6.6 0-12	5.3±2.5 3-8	4.7±4.2 3-11
R MTX+ DOLE	33.0±16.9* 21-45	30.1±4.9 24-35	27.3±14.1 27-59	10.5±8.3 1-19	7.0 ±6.1 1-15	8.3±2.1 6-10	5.7±4.7 1-11	5.0±1.5 4-6	6.1±3.4 2-8
D-t MTX+DOLE	34.2±6.6* 25-39	33.3±12.8 19-49	32.2±12.1 22-60	19.7±4.7* 16-26	10.8±6.1 2-16	6.6±5.8 1-19	17.2±5.1* 12-23	17.2±11.9 2-31	11.2±5.5 2-17
KONTROLA	5.7 ± 3.8 1-10			2.2 ± 2.4 0-6			3.1 ± 2.5 0-8		

Tabela 3. Učestalost mikronukleusa (MN), nukleusnih pupova (NP) i nukleoplazmatskih mostova (NPM) i njihova distribucija u binukleusnim limfocitima periferne krvi pacijenata sa reumatoidnim artritismom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) pre tretmana, posle 3 i 6 nedelja tretmana i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Analizirano na 1000 binukleusnih limfocita in vitro. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

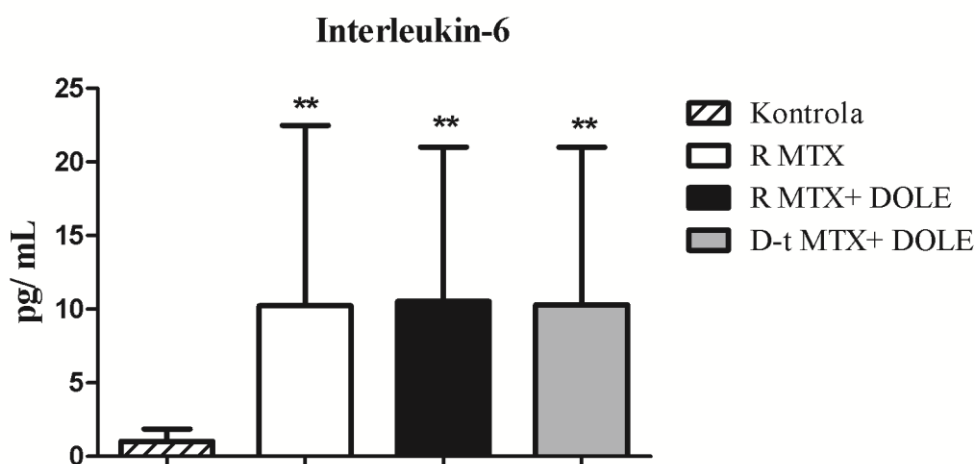
D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.5. ANALIZA NIVOVA INFLAMACIJE ODREĐIVANJEM PROINFLAMATORNOG CITOKINA

IL-6

3.2.5.1. Rezultati nivoa proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Da bi se utvrdio stepen inflamacije kod različitih grupa pacijenata sa reumatoidnim artritismom praćena je koncentracija interleukina-6 (IL-6), važnog proinflamatornog citokina. Ispitane su koncentracije IL-6 kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije kao i kod zdravih kontrolnih ispitanika i rezultati su prikazani na slici 34. Početna koncentracija IL-6 pre tretmana, zabeležena u sve tri grupe RA pacijenata bila je značajno veća u odnosu na vrednost u kontroli ($p < 0,01$). Između tri grupe RA pacijenata nisu pokazane međusobne razlike u početnim koncentracijama IL-6.



Slika 34. Koncentracija interleukina-6 u plazmi pacijenata sa reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE) i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na kontrolu.

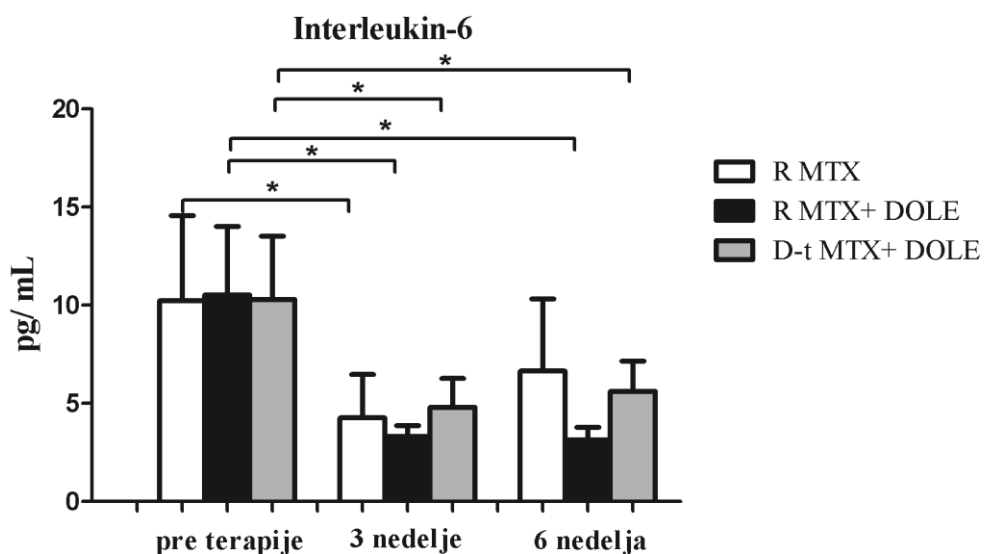
Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

3.2.5.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa reumatoidnim artritism

Antiinflamatorni efekat kombinovane terapije MTX i DOLE su evaluirani praćenjem koncentracija IL-6 kod pacijenata u ranoj fazi RA (R MTX + DOLE) i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem (D-t MTX+DOLE) tokom 3 i 6 nedelja tretmana i rezultati su prikazani na slici 35. Takođe je praćena i promena koncentracije IL-6 kod pacijenata u ranoj fazi RA koji su bili na terapiji samo metotreksatom tokom 3 i 6 nedelja (R MTX). Nakon 3 nedelje tretmana, sve tri RA grupe su pokazale značajno smanjenje koncentracije IL-6 u odnosu na početnu vrednost pre terapije ($p < 0,05$). Nakon perioda od 6 nedelja, R MTX grupa je zabeležila porast vrednosti IL-6, dok su vrednosti u R MTX + DOLE i D-t MTX+DOLE grupi ostale približne koncentracijama od 3 nedelje. Grupe na kombinovanoj terapiji R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE su imale značajno nižu koncentraciju IL-6 posle 6 nedelja u odnosu na vrednost pre tretmana ($p < 0,05$), dok u grupi R MTX zbog velike devijacije u vrednostima nije zabeležena statistička značajnost, uprkos postojanju razlike u srednjim vrednostima. Poređenjem šestonedeljne koncentracije IL-6 između tri grupe RA pacijenata, pokazano je da su vrednosti grupe R MTX + DOLE bile najniže, međutim, razlike u vrednostima između RA grupa nisu bile statistički značajne.



Slika 35. Koncentracija interleukina-6 iz plazme pacijenata sa reumatoidnim artritisom (R MTX, R MTX+DOLE i D-t MTX+DOLE)) pre tretmana, posle 3 i posle 6 nedelja tretmana i kod zdravih kontrolnih ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (): značajna razlika u odnosu na početnu vrednost pre uvođenja eksperimentalne terapije.*

Kontrola – zdravi kontrolni ispitanici

R MTX – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji samo metotreksatom

R MTX + DOLE – pacijenti u ranoj fazi RA na terapiji kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

D-t MTX + DOLE – pacijenti sa dugotrajnim RA koji su tretirani sa kombinovanom terapijom metotreksatom i DOLE

4. DISKUSIJA

U ovoj studiji pokazan je efekat kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom maslinovog lista na očuvanje antioksidativne zaštite, snižavanje oksidativnih oštećenja ćelije, sprečavanje pojave genomske nestabilnosti i redukciju inflamacije kod novodijagnostikovanih pacijenata u ranoj fazi RA i kod pacijenata sa dugotrajnim RA, u odnosu na standardnu terapiju samo metotreksatom. Uticaj suplementacije ekstraktom maslinovog lista na promenu ispitivanih parametara, bio je efikasniji kod pacijenata u ranoj fazi bolesti, nego kod dugotrajne faze bolesti, ukazujući da odgovor na ispitivanu kombinovanu terapiju može zavisiti od dužine trajanja bolesti i od prethodne dugoročne primene lekova.

Molekularni epidemiološki pristup, odnosno merenje molekularnih i ćelijskih biomarkera kao pokazatelja uzročnih ili preventivnih faktora za razvoj bolesti predstavlja vredan dodatak konvencionalnim epidemiološkim studijama. Njegove glavne prednosti, u odnosu na konvencionalne epidemiološke pristupe, su manji uzorak ispitanika i znatno manje utrošenog vremena, pa su stoga i ekonomičnije (Dusinska i Collins, 2008). Pored toga, ukoliko su biomarkeri pažljivo odabrani, mogu dati veoma korisne informacije o molekulskim mehanizmima uključenim u etiologiju bolesti, na primer, ukoliko odražavaju promene u ranoj fazi progresije bolesti (Dusinska i Collins, 2008). Takođe mogu pružiti i dobar uvid u interindividualne varijabilnosti u odgovoru na ključne faktore u razvoju bolesti. Bazična istraživanja u reumatologiji se nekoliko decenija unazad bave rasvetljavanjem etiologije reumatskih bolesti, a zahvaljujući razvoju molekularnih bioloških metoda, sada je moguće i sagledavanje bioloških procesa u ćelijama obolelih tkiva koji imaju ključni značaj u razumevanju patofizioloških mehanizama. Reumatoidni artritis je jedna od najviše proučavanih inflamatornih bolesti zglobova. Podaci studija na ćelijskom nivou ukazuju da povećana intracelularna proizvodnja ROS značajno utiče na inflamatorni proces i pojavu degeneracije hrskavice kao i gubitka kostiju u *in vitro* i *in vivo* modelima RA. Povećana proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika i deregulacija

proinflammatornih citokina, kao što su $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 i $\text{INF-}\gamma$, od strane aktiviranih makrofaga i neutrofila u sinovijalnim tkivima, su identifikovani kao ključni faktori u održavanju inflamatornih procesa u RA (Feldmann i sar., 1996; Firestein, 2003; Heliovaara i sar., 1994). Uloga oksidativnog stresa u patofiziologiji RA se, pre svega, ogleda u amplifikaciji antigenih signala, posredovanju u lokalnim zapaljenskim procesima i degradaciji hrskavice (Gordon, 2003; Reth, 2002; Wauquier i sar., 2010). Povišen nivo oksidativnog stresa dovodi do oksidativnih oštećenja važnih biomolekula u ćeliji: lipida, proteina i DNK, pa samim tim i pojave ćelijske disfunkcije. S obzirom na ulogu oksidativnog stresa u RA, potrebno je istražiti da li ROS proizvodnja i parametri oksidativnog oštećenja ćelije mogu biti korisni kao prediktivni biomarkeri u patologiji RA i pružiti uvid u osnovne mehanizme bolesti. Imajući u vidu značaj oksidativnog stresa u razvoju patoloških promena u RA, smanjenje proizvodnje ROS može biti relevantan terapijski cilj pored snižavanja inflamacije kao glavnog cilja u terapiji.

Osim stepena inflamacije, trajanje bolesti je takođe veoma važan prognostički faktor koji utiče na razvoj patoloških promena i ishod lečenja RA (van Beers-Tas i sar., 2015). Rana detekcija i početak terapije su ključni faktori za uspešnost prevencije degenerativnih promena koje nastupaju u kasnijim stadijumima bolesti, a koje se mogu naći kod pacijenata sa dugotrajnim RA (Kourilovitch i sar., 2014). Pored toga, kod pacijenata sa dugotrajnim RA vremenom dolazi do pojave rezistencije na terapiju koja dodatno snižava mogućnost efikasnog lečenja. Naime, pokazano je da hondrociti u zglobovima pokazuju određene promene u vezi sa starenjem i da vremenom dolazi do pada njihove sposobnosti proliferacije, ali ne i mogućnosti proizvodnje proinflammatornih medijatora i matriks-degradujućih enzima (Fay i sar., 2006). Lek metotreksat, antagonist folne kiseline sa jakim antiinflamatornim dejstvom, je jedan od najčešće korišćenih terapeutika za lečenje RA (Braun i Rau, 2009). S obzirom da se njegovo dejstvo zasniva prvenstveno na citostatskom efektu, odnosno sprečavanju proliferacije ćelija, efikasnost njegovog dejstva može biti slabija kod pacijenata sa dugotrajnim RA. Pored toga, većina lekova koji se koriste za terapiju reumatoidnog artritisa (DMARD: metotreksat, ciklofosamid, ciklosporin, glukokortikoidi) su citotoksični *per se*, i kao takvi mogu dodatno da povećaju stepen oštećenja ćelija u okolnim, zdravim tkivima RA pacijenata. Ispitivanje udela primene

lekova u ukupnim ćelijskim oštećenjima kod pacijenata sa RA se može vršiti istovremenim praćenjem novodijagnostikovanih pacijenata sa RA, kod kojih su oštećenja uzrokovana isključivo aktivacijom bolesti, i kod pacijenata sa dugotrajnim RA, gde su oštećenja posledica kako bolesti, tako i dugoročne primene lekova kao što je npr. metotreksat.

Imajući u vidu da primena standardne terapije može dovesti do neželjenih efekata na zdrava tkiva, novi terapijski pristupi u lečenju RA teže primeni kombinovanih terapija standardnih antireumatika (DMARD) sa bioaktivnim komponentama iz prirodnih izvora. Na taj način bi se suzbili negativni efekti dugogodišnje primene lekova i poboljšao efekat standardne terapije na koju hronični pacijenti postaju vremenom slabo reaktivni (Lü i sar., 2015). U tom kontekstu, dizajn terapijskih strategija, koje uključuju i upotrebu antioksidansa je od velikog interesa, a manipulacija redoks ravnoteže u ćelijama pacijenata sa RA je potencijalni terapijski pristup, koji je neophodno istražiti. Do sada je nekoliko studija pružilo dokaze o efikasnosti uključivanja antioksidanasa u terapiju RA zajedno sa standardnim lekovima (Drafi i sar., 2012; Roy i sar., 2012; Rovensky i sar., 2009; McCann 2007; Nanjundaiah i sar., 2013). Razni dijetetski izvori antioksidanasa su privukli pažnju u istraživanjima bioaktivnih komponenti sa potencijalnom ulogom u lečenju RA (Laev i Salakhutdinov, 2015, Lu i sar., 2015).

S obzirom da je u regionu Mediterana zabeležena niža incidenca reumatoloških i kardiovaskularnih oboljenja u odnosu na ostatak Evropske populacije, efekti tzv. mediteranske dijeta, koja je bogata polifenolnim supstancama poreklom iz grožđa i ulja masline, široko su ispitivani kao potencijalni komplementarni tretman uz standardnu terapiju ovih oboljenja. Studija u kojoj je pacijentima sa RA uveden režim mediteranske dijeta, u kojem su preovlađivale polifenolne komponente iz maslinovog ulja, pokazala je poboljšanje fizičke funkcije kod pacijenata i sniženje aktivnosti bolesti, posle tri meseca modifikovane ishrane, u odnosu na standardnu ishranu (Skoldstam i sar., 2003). Takođe, suplementacija maslinovim uljem je kod pacijenata sa aterosklerozom pokazala značajan efekat na snižavanje serumskih i ćelijskih markera inflamacije, posle tromesečne primene (Urpi-Sarda i sar., 2012). Modeli RA na životinjama su pokazali da suplementacija polifenolnim ekstraktom maslinovog ulja može smanjiti oticanje zglobova, migraciju ćelija u sinoviju i degradaciju hrskavice i eroziju kosti (Rossilo i sar., 2014). Pokazano je da se na

molekulskom nivou taj rezultat ostvaruje putem redukcije nivoa proinflammatoryh citokina, i prostaglandina E2, kao i smanjenja ekspresije ciklooksigenaze-2 i sprečavanja nukleusne translokacije Nf-kB (Rossilo i sar., 2014). U studijama na ljudima, kod zdravih ispitanika četvoronedeljna konzumacija mediteranske ishrane obogaćene maslinovim uljem, pokazala je antiinflamatorni efekat u vidu snižene aktivnosti Nf-kB, koji je poznat kao ključni medijator u inflamatornim oboljenjima i procesima (Perez-Martinez i sar., 2007). Takođe je pokazano da primena omega-3 masnih kiselina u kombinaciji sa maslinovim uljem, uz standardnu terapiju antireumaticima, postiže poboljšanje kliničkih parametara kod pacijenata sa RA u donosu na konvencionalnu terapiju antireumaticima (Berbert i sar., 2005). Glavna bioaktivna komponenta, kojoj se pripisuje većina terapijskih efekata maslinovog ulja, je oleuropein. Oleuropein je do sada pokazao mnogobrojne izuzetne biološke efekte, kao što je antioksidativna, antiinflamatorna aktivnost, kardioprotektivna, neuroprotektivna i gastroprotektivna svojstva, hipoglikemijski efekat i sposobnost regulacije nivoa lipida (Hassen i sar., 2015). Pored toga, pokazao je dobre osobine u kombinovanju sa citostaticima, gde nije umanjivao terapijski efekat leka, dok je istovremeno smanjivao toksični efekat na zdrave ćelije (Andreadou i sar., 2007). Osim u maslinovom ulju, oleuropein se može naći i u plodu i listu masline, ali u znatno većoj količini nalazi se u listu nego u ulju i plodu masline (Silva i sar., 2006).

Suvi ekstrakt lista masline (DOLE) predstavlja bogati izvor antioksidanasa, a jedna od njegovih glavnih aktivnih supstanci je oleuropein. Oleuropein je ester elenolinske kiseline i hidroksitirozola i pripada klasi sekoiridoida. Njegov sadržaj, u različitim derivatima poreklom od biljke masline *Olea europaea* L., zavisi od sorte, klimatskog podneblja, zrelosti u toku berbe i tehnologije obrade (Hassen i sar., 2015). U listu masline postoji 5 grupa fenolnih jedinjenja: oleuropeozidi (oleuropein i verbaskozid); flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, luteolin); flavonoli (rutin); flavanoli (katehin), i substituisani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilinska kiselina, i kafeinska kiselina) (El i Karakaya, 2009). Smatra se da je glavna bioaktivna komponenta ekstrakta lista masline i maslinovog ulja oleuropein, koji je zaslužan za većinu korisnih bioloških efekata. Analize prisustva metabolita u urinu nakon konzumacije ekstrakta lista masline u visokoj jednokratnoj dozi ili u vidu kontinuirane upotrebe od 28 dana kao suplementa kod zdravih

ispitanika su pokazale da je jedina aktivna komponenta ekstrakta lista masline, koja dostiže sistemsku cirkulaciju i čiji se metaboliti mogu naći u urinu u roku od 6 sati nakon ingestije, zapravo oleuropein (Kendall i sar., 2012). U istoj studiji pokazano je da je primenjena koncentracija ekstrakta i sadržaj oleuropeina u njemu, presudna za njegovo metaboličko prisustvo, a ne dužina primene. Takođe, i studija u kojoj je postignuta redukcija inflamacije kod ispitanika koji su 4 nedelje konzumirali modifikovanu mediteransku dijetu obogaćenu maslinovim uljem, ukazuje da i vremenski kratkoročne intervencije sa povećanim koncentracijama komponenti prisutnih u maslinovom ulju, mogu proizvesti biološki značajan efekat (Perez-Martinez i sar., 2007).

Ključni faktor ostvarivanja bioloških efekata prirodnih supstanci iz dijetetskih izvora je bioraspoloživost. Pokazano je da na bioraspoloživost fenolnih komponenti značajno mogu uticati godine starosti i hormonski status individua (Garcia-Villalba i sar., 2014). Fenolne komponente iz masline i njenih derivata su pokazale brzu apsorpciju nakon ingestije i široku distribuciju u unutrašnjim organima kao što su: jetra, bubrezi, mozak i slezina (Serra i sar., 2012). Farmakokinetička studija Garcia-Villalba i sar. (2014) je pokazala da se nakon ingestije DOLE, u plazmi i urinu, u roku od nekoliko časova, mogu naći njegovi metaboliti hidrositirozol, oleuropein aglikon, elenolinska kiselina, luteolin i apigenin. Visioli i sar. (2000) i Vissers i sar. (2002) su pokazali da je apsorpcija fenolnih komponenti iz produkata masline dozno zavisna i da se najmanje 55-66% unesenih količina, uspešno absorbuje.

Ispitivanjem molekularskih mehanizama dejstva DOLE, utvrđeno je učešće u brojnim metaboličkim putevima u ćelijama. Studije su pokazale da DOLE poseduje protektivno dejstvo od raznih vrsta oštećenja na ćelijama, a smatra se da su za pomenuti efekat presudna njegova antioksidativna svojsva (Manna i sar., 1999). Do sada su pokazani protektivni efekti od oksidativnih oštećenja ćelija u koži, kardiomiocitama, hepatocitama itd. (Efentakis i sar., 2015). Mehanizmi kojima ispoljava antioksidativne efekte obuhvataju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i heliranje jona metala koji predstavljaju katalizatore oksidativnih reakcija, kao što su gvožđe i bakar. Pokazano je da ukupne antioksidativne sposobnosti svih komponenti koje sačinjavaju ekstrakt pokazuju snažnije dejstvo nego njegove izolovane pojedinačne komponente, što ukazuje na sinergističko

antioksidativno dejstvo komponenti u ekstraktu (Andrikopoulos i sar., 2002; Benavente-Garcia i sar., 2000). Njegovi genoprotektivni efekti takođe su pripisani sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, ali i stimulaciji mehanizama reparacije DNK (Anter i sar., 2011).

Proučavanja antiinflamatornih efekata DOLE veoma su intenzivna poslednjih godina i u fokusu su naučne sfere interesovanja. Pokazan je uticaj DOLE na nekoliko važnih molekulskih puteva uključenih u supresiju inflamacije. Poudyal i sar. (2010) su pokazali antiaterosklerotični efekat DOLE preko redukcije LDL, MDA, kao i snižavanja aktivnosti medijatora inflamacije Nf-kB i TNF α . Na eksperimentalnom modelu encefalomijelitisa kod pacova, primena DOLE je efikasno snižavala produkciju inflamatornih medijatora IFN- γ i IL-17 (Miljković i sar., 2009). Na modelu traumatske povrede kičmene moždine, primena oleuropeina je dovela do atenuacije inflamacije preko sniženja nivoa TNF α , IL-1, redukcije aktivnosti enzima inducibilne azot oksid sintaze i ciklooksigenaze-2 (Khalatbary i Zarrinjoei, 2012). Flemmig i sar. (2014) su ustanovili da je za antiinflamatorni efekat DOLE zaslužna njegova sposobnost da izvrši regeneraciju aktivnosti enzima laktoperoksidaze, koji je inače inhibiran prevelikim količinama vodonik-peroksida, a predstavlja jedan od ključnih enzima u imunskom odgovoru. Takođe, utvrđeno je da se DOLE ponaša kao inhibitor ksantin-oksidge, enzima značajnog kod post-ishemijskih povreda i inflamatornih oboljenja, i da su apigenin i oleuropein glavne komponente ekstrakta, zaslužne za ovaj efekat (Flemmig i sar., 2011). U kulturi humanih ćelija pune krvi, gde je produkcija citokina indukovana lipopolisaharidom, pokazano je da samo oleuropein i kafeinska kiselina, od svih komponenti maslinovog ulja, imaju mogućnost da redukuju inflamatorni proces (Miles i sar., 2005). Takođe, i na životinjskim modelima artritisa, pokazana je sposobnost inhibicije produkcije proinflamatornih citokina i sprečavanja progresije degeneracije hrskavičavog tkiva, posle primene terapije sa DOLE (Flemmig i sar., 2011; Gong i sar., 2012; Impellizzeri i sar., 2011).

4.1. Antioksidativne sposobnosti ekstrakta lista masline *in vitro*

Prethodna ispitivanja oksidativnog stresa kod pacijenata sa RA su pokazala visoku koncentraciju reaktivnih radikalskih vrsta poput peroksil i hidrokstil radikala i reaktivnih azotovih vrsta u perifernoj krvi i sinovijalnoj tečnosti (Filippin i sar., 2012). Pokazano je da produkcija ROS ima pozitivnu korelaciju sa indeksom aktivnosti bolesti DAS 28, kako u perifernoj krvi i sinovijalnoj tečnosti pacijenata sa RA (Kundu i sar., 2012). Intenzivan oksidativni stres u tkivima RA pacijenata potiče od aktiviranih makrofaga i neutofila koji ekstracelularno oslobađaju velike količine slobodnih radikala. Antioksidansi su supstance sa sposobnošću da doniranjem elektrona neutrališu aktivnost ROS. Postoje brojne metode za merenje antioksidativne sposobnosti i procenu efikasnosti neutralizacije slobodnih radikala, a u ovoj studiji su korišćene metoda DPPH i ABTS, i FRAP kao pogodne i jednostavne metode, visoke osetljivosti i reproducibilnosti. Ispitivanjem sposobnosti hvatanja radikala u DPPH i ABTS testu, pokazano je da efikasnost DOLE zavisi od primenjene koncentracije i da se značajna neutralizacija aktivnosti slobodnih radikala *in vitro*, postiže pri koncentracijama većim od 1,75 mg/mL. U oba testa su dobijeni slični rezultati, koji su bili u skladu i sa pokazateljima redukcionih sposobnosti ekstrakta dobijenih u FRAP testu. Pokazana antioksidativna aktivnost DOLE *in vitro* se, najverovatnije, može pripisati visokom sadržaju polifenola, a oleuropein je najvažnija polifenolna komponenta detektovana u visokoj koncentraciji (19,8%). Lee i Lee (2010) su ukazali da je antioksidativna aktivnost ukupnih komponenti iz ekstrakta lista masline, veća od aktivnosti pojedinih sastojaka i da je sinergistički efekat, zaslužan za njegovu dobru efikasnost, u neutralizaciji slobodnih radikala. Međutim, oleuropein je i kao najznačajnija izolovana komponenta iz lista masline, u mnogim studijama pokazao izuzetna biološka svojstva, između ostalog i izraženu antioksidativnu aktivnost (Hassen i sar., 2015). U DPPH testu, oleuropein je pri visokim koncentracijama pokazao snažni antioksidativni potencijal, približan efektu vitamina C i tokoferola (Visioli i sar., 1998). Rezultati naše studije sa DOLE su u DPPH i ABTS testu, pokazali antioksidativnu aktivnost koja može dostići aktivnosti referentnog antioksidansa vitamina C, međutim, pri znatno većim koncentracijama DOLE od vitamina C.

4.2.1. Analiza nivoa aktivnosti enzima katalaze kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritisom pre uvođenja eksperimentalne terapije

U normalnim fiziološkim uslovima *in vivo*, antioksidativni sistem ćelije, koji čini grupa enzima i neenzimskih komponenti, efikasno snižava nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta na fiziološki prihvatljiv nivo, koji ne ugrožava funkcije i opstanak ćelije. Međutim, u inflamatornim oboljenjima, kao što je RA, ovaj sistem je narušen i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite su izmenjene i može doći do pojave oksidativnog oštećenja u ćelijama usled povišenog nivoa oksidativnog stresa (Akyol i sar., 2001; Islamov i sar., 2002; Kalpakcioglu i Senel, 2007). Analizom aktivnosti katalaze u eritrocitima, jednog od enzima prve linije antioksidativne odbrane, zabeležili smo značajan porast aktivnosti ovog enzima u ispitivanim grupama pacijenta sa RA u odnosu na nivo u kontrolnim uzorcima. Poređenjem vrednosti između eksperimentalnih RA grupa, uočene su niže početne vrednosti enzimske aktivnosti u grupi sa dugotrajnim RA, u odnosu na grupe pacijenata koji se nalaze u ranom stadijumu RA, a koje su imale i veći stepen inflamacije i aktivnosti bolesti. Moguće je, da je usled povećane inflamacije produkcija vodonik-peroksida u ćelijama povećana, pa je shodno tome i aktivnost katalaze veća. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Seven i sar. (2008) u kojoj su autori pokazali, da su biomarkeri oksidativnog stresa, uključujući i aktivnost katalaze, povećani kod grupa pacijenata sa RA kod kojih su zabeležene veće vrednosti indikatora aktivnosti bolesti DAS 28. Takođe, studija Mukherjee i sar. (2013) na pacovima je pokazala da metotreksat može uticati na sniženje aktivnosti katalaze i da se ovaj proces može sprečiti dodavanjem antioksidanasa uz terapiju metotreksatom. Imajući u vidu da je u ovoj studiji grupa pacijenata sa dugotrajnim RA, kontinuirano bila na terapiji metotreksatom minimum 6 meseci pre uključanja u studiju, zabeležen niži nivo aktivnosti katalaze kod ove grupe, može biti posledica inhibicije katalaze usled dugotrajne primene metotreksata. Literaturni podaci o aktivnosti antioksidativnih enzima kod pacijenata sa RA su veoma raznoliki, pa su tako u prethodnim studijama zabeleženi i povećani, smanjeni ili pak neizmenjeni nivoi aktivnosti (Akyol i sar., 2001; Islamov i sar., 2002; Kalpakcioglu i Senel, 2007). Pri razmatranju ovih podataka,

treba uzeti u obzir da je aktivnost katalaze u pomenutim studijama merena iz različitih uzoraka, uključujući eritrocite, plazmu i limfocite. Studija Dai i sar. (2003) je ukazala da je visoka aktivnost katalaze koja je postignuta indukovanjem ekspresije gena za ovaj enzim, pogodna za supresiju degenerativnih promena u zglobovima kod modela pacova sa antigen indukovanim artritismom. Takođe je pokazano da nivo katalaze *in vivo* može da utiče na ekspresiju gena u vezi sa inflamacijom (Benhamou i sar., 1998). Stoga, povećana aktivnost katalaze može imati protektivnu ulogu u razvoju RA, putem ograničenja proizvodnje ROS i regulacije ekspresije gena uključenih u inflamaciju (Kalpakcioglu i Senel, 2007).

4.2.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo aktivnosti enzima katalaze kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Održavanje visokog nivoa aktivnosti katalaze omogućava smanjenje proizvodnje vodonik-peroksida u ćelijama i sprečava pojavu oksidativnih oštećenja ćelija (Mukherjee i sar., 2013). U ovoj studiji pokazano je da, posle uvođenja metotreksata u terapiju pacijenata novodijagnostikovanih za RA, dolazi do opadanja nivoa aktivnosti katalaze, a da šestonedeljna kombinovana terapija metotreksatom i DOLE, može u određenoj meri da umanjuje pad aktivnosti i održi povoljniji antioksidativni status u eritrocitima. Studija autora Coleshowers i sar. (2010) je pokazala da pod dejstvom terapije metotreksatom dolazi do porasta aktivnosti katalaze u prvih 2 nedelje nakon uvođenja terapije, posle čega dolazi do značajnog pada aktivnosti enzima usled produžene upotrebe metotreksata tokom 6 nedelja u hepatocitama tretiranih pacova. Ovi rezultati se slažu sa našim nalazom, gde je posle 3 nedelje nakon uvođenja terapije metotreksatom došlo do sniženja aktivnosti katalaze kod obe grupe pacijenata novodijagnostikovanih za RA. Kod grupe koja je bila na terapiji samo MTX, statistički značajno je snižena aktivnost enzima posle 6 nedelja, dok je kod grupe novodijagnostikovanih pacijenata na kombinovanoj terapiji sa DOLE očuvana aktivnost enzima na nivou od 3 nedelje. Osim toga, važno je istaći da je kod grupe dugotrajno obolelih pacijenata kombinovana terapija uticala na povećanje aktivnosti katalaze tokom 6

nedelja. Roy i sar. (2012) su na pacovima sa RA pokazali povoljno dejstvo kombinovane primene MTX sa bioaktivnom biljnom komponentom epigalokatehinom na modulaciju antioksidativnih enzima. Takođe, studija autora Hemeida i Mohafez (2008) je ukazala da primena prirodnog antioksidansa kurkumina dovodi do povećanja aktivnosti katalaze i drugih antioksidativnih enzima, koji su prethodno bili redukovani usled tretmana metotreksatom. Naši rezultati su u skladu sa pomenutim studijama. Iako nisu pokazane statistički značajne razlike u srednjim vrednostima aktivnosti katalaze između različitih grupa pacijenata sa RA nakon šest nedelja, povećanje aktivnosti zabeleženo kod grupa na kombinovanoj terapiji metotreksatom i DOLE, za razliku od grupe samo na metotreksatu kod koje vrednost nije povećana, ukazuje na to da postoji mogućnost da je DOLE uticao na održanje visoke aktivnosti ovog enzima.

4.3.1. Analiza nivoa slobodnih tiolnih grupa proteina kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritisom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Osim enzima antioksidativne zaštite, antioksidativnom kapacitetu ćelija doprinose i neenzimski antioksidansi u koje spadaju i tioli. Tiolna jedinjenja imaju brojne funkcije u ćelijama osim važnog učešća u redoks sistemima, a u njih spadaju sva jedinjenja koja poseduju SH grupu vezanu za ugljenik. Proteini sa aminokiselinom cistein predstavljaju glavni izvor SH grupa i one podležu raznovrsnim reverzibilnim redoks modifikacijama kao što su nitrozilacija, hidroksilacija, formiranje disulfidnih mostova. Tiolna jedinjenja su među prvim komponentama u ćeliji koja podležu oksidaciji u uslovima povišenog oksidativnog stresa, štiteći druge molekule i funkcionalne grupe proteina od oksidativne modifikacije (Islamov i sar., 2002). Aktivacijom ćelijskog odgovora na oksidativni stres, dolazi do promene u sadržaju slobodnih tiolnih grupa, pa se one koriste kao indikator oksidacije proteina i drugih tiolnih jedinjenja u ćeliji. Studija Hassan i sar. (2011) je pokazala da inflamatorni proces u reumatoidnom artritisu dovodi do opadanja nivoa tiolnih grupa. U skladu sa time, rezultati ove studije su pokazali da je početni nivo SH grupa

snižen u odnosu na fiziološki normalan nivo, kako kod pacijenata rane faze RA, tako i kod pacijenata sa dugotrajnim RA. Grupa koja je imala najniži početni nivo SH grupa su pacijenti rane faze RA. U toj grupi su zabeleženi i najviši nivoi proteina akutne faze CRP i najviša sedimentacija eritocita, ukazujući na snažnu inflamaciju. Moguće je da je pad SH grupa u vezi sa povećanim stepenom inflamacije, na šta ukazuje i prisustvo negativne korelacije između nivoa SH i CRP i fibrinogena kod pacijenata rane faze RA u ovoj studiji (Čabarkapa i sar., 2016). Ovakav rezultat potvrđuje nalaze studije Lemarechal i sar. (2006) koji su pokazali da kod pacijenata sa RA postoji snižen nivo tiolnih grupa u odnosu na zdrave kontrole, i da postoji negativna korelacija tiolnih grupa sa indeksom aktivnosti bolesti DAS 28 i nivoom CRP.

4.3.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo slobodnih tiolnih grupa proteina kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Tokom 6 nedelja, grupa pacijenata sa RA u ranoj fazi i pacijenata sa dugotrajnim RA, koje su bile na kombinovanoj terapiji zabeležile su trend povećanja koncentracije SH, dok je u grupi pacijenata sa RA u ranoj fazi samo na metotreksatu vrednost ostala na početnom nivou tokom trajanja studije. Ovo ukazuje da je DOLE mogao uticati na povećanje nivoa SH grupa i poboljšanje antioksidativnog kapaciteta. Povećan nivo tiolnih grupa posle 6 nedelja je prethodno zabeležen u studiji Lemarechal i sar. (2006) posle primene infliximaba, efikasnog biološkog leka za snižavanje inflamacije kod RA. Ta studija je takođe pokazala da se nivo tiolnih grupa menja pod dejstvom inflamacije i oksidativnog stresa i da se može koristiti kao indikator efikasnosti supresivnih terapija protiv inflamacije u RA. Iako u našoj studiji povećanje SH grupa pod uticajem kombinovanog tretmana nije bilo statistički značajno, treba istaći ovaj rezultat jer je pokazano da snižen nivo SH grupa može dovesti do onemogućavanja apoptotskog dejstva MTX. Na osnovu toga može se uticati na tok bolesti i ishod lečenja, koji se zasniva na dejstvu MTX (Jang i sar., 2003). Restauracija SH sadržaja u ćelijama pacijenata sa RA bi, prema tome, imala potencijalni terapijski značaj.

4.4.1. Analiza indikatora oštećenja proteina (nivo nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Hidroksilni radikali mogu u različitim reakcijama u ćeliji da modifikuju biomolekule, kao što DNK, proteini i lipidi. Tokom inflamatornog odgovora, aktivirane ćelije imunskog sistema proizvode povišene količine H_2O_2 , koji ukoliko se ne razgradi dejstvom katalaze, može da oksiduje enzim mijeloperoksidazu do višeg oksidacionog stanja, a koja dalje reaguje sa brojnim molekulima u ćeliji proizvodeći specifične produkte. U reakciji sa Cl^- proizvodi hipohlornu kiselinu koja je izuzetno reaktivna i u ćelijama brzo reaguje sa tiolnim grupama, kao primarnim meta (Winterbourn i sar., 2000). U sličnoj reakciji, u prisustvu nitrita i H_2O_2 mijeloperoksidaza je takođe u stanju da formira reaktivne azotove vrste, koje mogu dovesti do nitrozilacije proteina (Eiserich i sar., 1998). Molekulski proizvodi koji nastaju kao posledica pomenutih reakcija i povišenog oksidativnog/nitrozativnog stresa su generalno stabilniji i duže živeći od samih reaktivnih vrsta ROS i RNS, koje su induktori reakcije, pa je za određivanje stepena oksidativnog/nitrozativnog stresa pogodnije određivanje nivoa njihovih oksidacionih produkata, nego samih induktora. Proteini su jedna od glavnih meta delovanja ROS i RNS u ćelijama, pa su stoga pogodni indikatori za merenje oksidativnog oštećenja u ćelijama (Dalle-Donne i sar., 2005). Određivanje proteinskih karbonila je najčešće korišćeni marker oksidacije proteina, jer su to stabilni produkti, koji ne podležu daljim metaboličkim modifikacijama u organizmu. Akumulacija proteinskih karbonila je zabeležena u mnogim patološkim stanjima i oboljenjima (Dalle-Donne i sar., 2003). U studiji Lemarechal i sar. (2006) je pokazano da pacijenati sa RA imaju povišen nivo karbonilnih grupa u odnosu na zdrave kontrole, i da se njihov nivo ne menja u zavisnosti od promene stepena aktivnosti bolesti. Rezultati nivoa karbonilnih grupa kod pacijenata sa RA u našoj studiji su u skladu sa ovim nalazom. Pokazane su povišene vrednosti protein karbonila u odnosu na zdrave kontrole, kod svih grupa pacijenata sa RA pre uvođenja eksperimentalne terapije. Takođe, nisu zabeležene značajne razlike u nivou karbonilnih grupa kod novodijagnostikovanih

pacijenata i kod pacijenata sa dugotrajnim RA, što potvrđuje nalaz studije Lemarechal i sar. (2006). Treba imati u vidu da karbonilne grupe (aldehidi i ketoni) nastaju direktnom oksidacijom proteinskih rezidua na bočnim lancima (posebno prolina, arginina, lizina i treonina), ali mogu nastati i kao sekundarni produkti u reakciji sa proizvodima lipidne peroksidacije, kao što je malondialdehid (Dalle-Donne i sar., 2003). Stoga, njihova produkcija nije pokazatelj isključivo direktne oksidacije proteina, već može biti uvećana i usled sekundarnih reakcija sa produktima oksidacije drugih biomolekula u ćeliji. Još jedan od indikatora oštećenja proteina je i prisutvo NO_2^- u plazmi. Prethodne studije su pokazale da je kod inflamatornih oboljenja povećana koncentracija nitrita u plazmi, kao i da je nivo produkcije nitrita zavisao od stepena inflamacije kod pacijenata sa RA (Ersoy i sar., 2002; Nadeem i sar., 2003). Oštećenja proteina izazvana oksidativnim modifikacijama, fragmentacijom proteina ili formiranjem unakrsnih protein-protein veza, su naročito važna u patogenezi reumatoidnog artritisa jer je pokazano da mogu dovesti do degradacije kolagena i progresije u oštećenjima hrskavice i zglobova (Hawkins i Davies, 1997). Naši rezultati su pokazali visoke koncentracije nitrita u plazmi kod sve tri grupe pacijenata sa RA u odnosu na zdrave kontrole, što je očekivano imajući u vidu da je i indeks aktivnosti bolesti kod sve tri grupe ukazivao na visok nivo inflamacije. Najvišu koncentraciju pokazala je grupa sa dugotrajnim RA, što se može objasniti prolongiranom perzistentnom inflamacijom kod ovih pacijenata u dugom vremenskom periodu za razliku od novodijagnostikovanih pacijenata gde je bolest tek otpočela.

4.4.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na indikatore oštećenja proteina (nivo nitrita i karbonilnih grupa) kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Jaswal i sar. (2003) su pokazali da suplementacija antioksidansima u trajanju od 12 nedelja, može doprineti smanjenju oštećenja proteina i lipida kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom. U ovoj studiji šestonedeljna kombinovana terapija metotreksatom i DOLE nije ispoljila uticaj na sadržaj proteinskih karbonila, koji je ostao povišen u odnosu na nivo zabeležen u kontrolama u svim ispitivanim grupama, od početka do kraja studije.

Moguće je da je relativno kratak vremenski period od šest nedelja suplementacije sa antioksidansom DOLE u ovoj studiji, bio dovoljan za obnavljanje sadržaja proteinskih tiola, koji predstavljaju prvu liniju odbrane od oksidativnog oštećenja proteina u ćelijama, ali ne i dovoljno dug da obezbedi smanjenje koncentracije krajnjih proizvoda degradacije proteina, kao što su karbonilne grupe sa relativno dugim vremenom poluraspada (Levine i sar., 1990). S druge strane, posle 3 i 6 nedelja zabeleženi su redukovani nivoi nitrita u obe grupe pacijenata u ranoj fazi RA, ali ne i kod pacijenata sa dugotrajnim RA. Pošto je ranije pokazano da proizvodnja nitrita zavisi od nivoa inflamacije (Ersoy i sar., 2002), moguće je da pad koncentracije nitrita, zabeležen kod obe grupe pacijenata sa ranom fazom RA, ukazuje da se proces smanjenja inflamacije u te dve grupe, događao približno sličnim tempom. Usled velikih devijacija u početnim vrednostima nitrita u obe pomenute grupe, nije mogla biti utvrđena razlika između efekata kombinovanog metotreksata sa DOLE u odnosu na efekat terapije samo metotreksatom, pa doprinos DOLE u redukciji koncentracije nitrita kod pacijenata rane faze RA u ovoj studiji, ne može biti jasno potvrđen. Imajući u vidu da kod pacijenata sa dugotrajnim RA nije bilo promene nivoa nitrita tokom 6 nedelja kombinovane primene metotreksata i DOLE, može se zaključiti da DOLE ne utiče značajno na nivo nitrita kod dugotrajne bolesti.

4.5.1. Analiza stepena lipidne peroksidacije preko malondialdehida i aktivnosti izoenzima laktat-dehidrogenaze kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritisom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Osim oksidativnih oštećenja proteina, lipidna peroksidacija je jedna od najčešćih posledica oksidativnog stresa u ćelijama. Oštećenje dvosloja lipida u ćelijama dovodi do gubitka integriteta ćelijske membrane, inaktivacije proteina u membrani, gubitka membranskog potencijala, i izmenjene funkcije važnih signalnih puteva koji su u vezi sa ćelijskom membranom (Valko i sar., 2007). Stepem lipidne peroksidacije kod pacijenata sa RA je praćen preko koncentracije MDA, jednog od krajnjih produkata ciklične reakcije lipidne peroksidacije i pokazatelja oksidativnog oštećenja u ćelijama. MDA je naročito

važan produkt, jer je pokazano mutageno dejstvo u ćelijama sisara i kancerogeni efekat kod glodara (Valko i sar., 2007). Rad autora Baskol i sar. (2006) je pokazao da pacijenti sa RA imaju povišen nivo MDA u odnosu na zdrave kontrole. U istom radu pokazana je korelacija između nivoa MDA, oštećenja proteina i aktivnosti enzima mijeloperoksidaze, što ukazuje na povezanost ovih parametara. Poznato je da u prisustvu nitrita i H_2O_2 mijeloperoksidaza vrši formiranje reaktivnih azotovih vrsta, koje mogu dovesti do oštećenja lipida i proteina (Eiserich i sar., 1998). Naši rezultati su pokazali povišene vrednosti MDA kod sve tri grupe pacijenata sa RA, u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike. Nisu zabeležene razlike u nivou MDA između tri grupe pacijenata sa RA pre uvođenja eksperimentalne terapije. Rad Baskol i sar. (2006) je ukazao i da postoji razlika u nivou MDA između pacijenata sa RA koji su u aktivnoj fazi bolesti i onih koji su u neaktivnoj fazi. Imajući u vidu da su svi pacijenti koji su uključeni u našu studiju bili u aktivnoj fazi bolesti, nepostojanje razlike u nivou MDA između tri grupe pacijenata je očekivano i u skladu sa pomenutom studijom.

Nivo lipidne peroksidacije u ovoj studiji je praćen i preko distribucije izoenzima laktat-dehidrogenaze. Postoji 5 različitih izoenzimskih formi ovog citoplazmatskog enzima (LDH_{1-5}) čija je distribucija tkivno-specifična i njihov udeo u ukupnoj aktivnosti enzima pruža informaciju iz kog tkiva potiče najviši stepen oštećenja ćelija. Naime, pri oštećenju ćelijskih membrana u tkivima, dolazi do izlaska citoplazmatskog enzima LDH iz ćelije. Merenjem zastupljenosti izoenzimskih formi LDH u serumu može se utvrditi u kom organu se odigrao najviši stepen narušavanja integriteta ćelijskih membrana.

Kod svih eksperimentalnih grupa pacijenata sa RA u ovoj studiji zabeležene su povišene početne aktivnosti LDH_3 , LDH_4 , LDH_5 , ukazujući na povišeni stepen oštećenja membrana poreklom od ćelija pluća (LDH_3), bubrega i pankreasa (LDH_4), i jetre i skeletnih mišića (LDH_5).

S druge strane, niže vrednosti aktivnosti LDH poreklom iz eritocita (LDH_1), i ćelija bele krvne loze (LDH_2) kod svih grupa RA pacijenata u odnosu na kontrole su moguća posledica snižene produkcije svih vrsta krvnih ćelija koja je često zabeležena kod pacijenata sa RA (Vreugdenhil i Swaak, 1990).

Ovo je u skladu sa nalazima Pejovic i sar. (1992) koji su pokazali da se u sinovijalnoj tečnosti pacijenata sa RA javljaju značajno snižene vrednosti LDH₁ i LDH₂, dok su vrednosti LDH₄ i LDH₅ značajno povišene u odnosu na kontrolu.

4.5.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo malondialdehida i aktivnost izoenzima laktat-dehidrogenaze kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Efekat šestonedeljne, kombinovane primene DOLE sa standardnom terapijom metotreksatom u ovoj studiji, ogledao se u snižavanju koncentracije MDA posle 3 nedelje u svim grupama na kombinovanoj terapiji. Ovo je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da, terapijsko kombinovanje antioksidanasa sa konvencionalnom terapijom, efikasno smanjuje stepen produkcije MDA kod pacijenata sa RA (Jaswal i sar., 2003). S druge strane, značajno sniženje MDA je zabeleženo u grupi koja je bila samo na metotreksatu, ali tek posle 6 nedelja, dok su obe grupe na kombinovanoj terapiji imale snižene MDA koncentracije već posle 3 nedelje. Treba napomenuti da je poznato, da i primena terapija samo metotreksatom kod pacijenta sa RA, takođe može dovesti do smanjenja produkcije MDA, kao što je prikazano u radu Akyol i sar. (2001). Imajući u vidu mutageni potencijal MDA, njegova ubrzana redukcija je poželjan efekat koji je zabeležen kod kombinovane terapije MTX i DOLE i može predstavljati značajan doprinos efektu metotreksata kod pacijenata sa RA.

Potencijal kombinovane terapije za zaštitu ćelija od lipidne peroksidacije u ovoj studiji je praćen i preko distribucije izoenzima laktat-dehidrogenaze. Jedina statistički značajna promena vrednosti koja je zabeležena preko ovog indikatora tokom 6 nedelja u svim ispitivanim RA grupama, je značajno sniženje oštećenja ćelija jetre i skeletnih mišića (LDH₅), koje se odigralo posle 3 nedelje u grupama na kombinovanom tretmanu, a posle 6 nedelja i u grupi samo na metotreksatu. Pejovic i sar. (1992) su pokazali da je LDH₅ iz seruma kao i sinovijalne tečnosti najpouzdaniji indikator aktivnosti bolesti, odnosno da najpouzdanije odslikava stepena oštećenja koje je u vezi sa aktivnošću bolesti u RA. Posebno treba istaći da se rezultati lipidne peroksidacije preko dva različita indikatora

MDA i LDH u našoj studiji međusobno u skladu. Naime, isti trend redukcije oštećenja koje se odigralo posle 3 nedelje u grupama na kombinovanom tretmanu, a posle 6 nedelja u grupi samo na metotreksatu, je pokazan preko oba indikatora, što ukazuje na njihovu pouzdanost.

Sniženje koje je zabeleženo posle kombinovane terapije kod pacijenata sa dugotrajnim RA u ovoj studiji je naročito značajno, imajući u vidu da je pokazano da metotreksat izaziva hepatotoksičnost kod pacijenata sa RA posle dugoročne primene, što predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik (Sotoudehmanesh i sar., 2010). Hepatoprotektivni efekat DOLE i sniženje lipidne peroksidacije je pokazano i u prethodnim studijama koje su ispitivale indukovana oštećenja jetre kod modela pacova (Abd El- Azim, 2014; Dekanski i sar., 2009). Ovi i naši rezultati su u skladu i sa nalazima studije Alirezaei i sar. (2012) u kojoj je pokazano da oleuropein, kao aktivna komponenta DOLE, ispoljava hepatoprotektivne i antioksidativne sposobnosti, koje su u međusobnoj vezi.

4.6.1. Analiza nivoa oštećenja DNK kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Jedan od najvažnijih i najosteljivijih biomarkera koji se primenjuje u molekularno-epidemiološkim studijama je praćenje stepena DNK oštećenja u ciljnim ćelijama (Dusinska i Collins, 2008). Oksidativno oštećenje DNK je zabeleženo kod velikog broja patoloških stanja, uključujući neoplastična, neurodegenerativna, kardiovaskularna i autoimunska oboljenja i može se koristiti kao jedan od prediktivnih biomarkera (Cooke i sar., 2006). U inflamatornim oboljenima, pojava oštećenja DNK je naročito važna jer može da indukuje signalne puteve za diferencijaciju hematopoetskih stem ćelija. Naime, u procesu diferencijacije stem ćelija hematopoetskog sistema, ona utiče na usmeravanje diferencijacije ćelija u pravcu razvoja mnogo reaktivnijeg inflamatornog fenotipa u subpopulacijama imunskih ćelija (Cavanagh i sar., 2012). Prisustvo oksidativnih modifikacija DNK kao što je 8-Oxo-dG, koje predstavljaju vrstu oštećenja DNK sa visokim mutagenim potencijalom, zabeleženo je u prethodnim studijama kod pacijenata sa RA

(Kageyama i sar., 2008). Ispitivanja su pokazala da, u sinovijalnom tkivu koje predstavlja glavno mesto zapaljenja u reumatoidnom artritisu, postoji veza između smanjenog antioksidativnog kapaciteta ćelija, povećanja stepena oksidacije i oštećenja DNK (Altindag i sar., 2007; Seven i sar., 2008). Takođe je pokazano, da su parametri oksidativnog oštećenja DNK u pozitivnoj korelaciji sa indeksom aktivnosti bolesti u razvoju RA (Seven i sar., 2008). Osim u sinovijalnom tkivu, povišen stepen genetičkih oštećenja je zabeležen i u limfocitima pacijenata sa RA (Rudaitane i sar., 2003; Seven i sar., 2008). U ovoj studiji korišćeni su odgovarajući markeri DNK oštećenja iz limfocita periferne krvi, zbog njihove lake dostupnosti za uzorkovanje, i pre svega, jer metabolizam limfocita može da odražava postojeće stanje i u ćelijama drugih tkiva koje putem cirkulacije dolaze u dodir sa čitavim organizmom (Shive i sar., 1986). Limfociti periferne krvi predstavljaju relativno dugoživeće ćelije sa periodom života od 3-4 godine, pa akumulacija DNK oštećenja u limfocitima može biti informativan biomarker kod hroničnih oboljenja kod kojih oslikava dugotrajnije stanje organizma (Kopjar i sar., 2002). Delovanje slobodnih radikala na DNK molekul u ćelijama, dovodi do formiranja različitih modifikovanih produkata oksidacije nukleinskih baza i šećera, koji se mogu meriti kao indikatori oksidativnog stresa. Komet test je jednostavan i pogodan metod koji omogućava detekciju primarnog DNK oštećenja na nivou jedarne DNK, koja uključuju: jednolančane prekide, alkalna labilna mesta, dvolančane prekide DNK, apurinska mesta i mesta na kojima je izvršena nepotpuna reparacija (Dusinska i Collins, 2008). Ovaj test je pokazao široku primenu u oblasti biomedicinskih istraživanja kao brz, jeftin i metod dobre reproducibilnosti. Može se upotrebiti za evaluaciju DNK oštećenja izazvanog egzogenim genotoksičnim agensima, kao i za procenu endogeno izazvanog oksidativnog oštećenja DNK koji potiču od patoloških procesa u različitim oboljenjima. Takođe se može koristiti i za evaluaciju antigenotoksičnih efekata prirodnih produkata i komercijalnih supstanci koje se nalaze u potencijanoj ljudskoj upotrebi (Dusinska i Collins, 2008).

Rezultati dobijeni upotrebom komet testa u ovoj studiji su pokazali visok nivo endogenih DNK oštećenja kod pacijenata u ranoj fazi RA, dok su pacijenti sa dugotrajnim RA, imali umereno povećan stepen oštećenja u odnosu na nivo u kontrolnim uzorcima. Moguće objašnjenje, za razliku u početnom nivou DNK oštećenja kod eksperimentalnih

grupa, je da stepen inflamacije i aktivnosti bolesti utiče na stepen DNK oštećenja. Naime, pacijenti u ranoj fazi RA su pokazali veoma visok stepen inflamacije koji može biti uzrok povećanja DNK oštećenja. Pomenute grupe u ranoj fazi RA su zaista imale i povećane markere inflamacije i aktivnosti bolesti u odnosu na grupu sa dugotrajnim RA. Drugi autori su takođe ukazali na moguću vezu između stepena genetičkih oštećenja i nivoa aktivnosti bolesti u RA (Altindag i sar., 2007; Rudaitane i sar., 2003).

4.6.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo oštećenja DNK kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Ispitivanjem efekata kombinovane terapije MTX i DOLE na nivo DNK oštećenja kod grupa pacijenata u ranoj fazi RA, utvrđeno je da šestonedeljna kombinovana terapija doprinosi bržem i efikasnijem snižavanju DNK oštećenja u odnosu na terapiju samo MTX. Uočeni efekat DOLE i doprinos terapiji MTX u redukciji DNK oštećenja, kod pacijenata sa RA, se može delimično objasniti prisustvom antioksidativnih i antiinflamatornih osobina komponenti ekstrakta lista masline, koje su prethodno pokazane u *in vitro* studijama, a koje mogu uticati na nivo DNK oštećenja (Čabarkapa i sar., 2014, Žukovec Topalović i sar., 2015, Miljković i sar., 2009). Naime, zabeleženo smanjenje DNK oštećenja kod pacijenata sa RA je verovatno rezultat snižene inflamacije kao i smanjenja produkcije ROS nakon primene terapije, pri čemu kombinovana primena DOLE sa metotreksatom, pokazuje efikasnije redukciju DNK oštećenja u odnosu na terapiju samo MTX. Osim toga, antigenotoksični efekat DOLE može poticati i od stimulacije mehanizama reparacije DNK, koja su takođe prethodno pokazana u *in vitro* studijama gde je primenjivan kao postaplikativni agens za redukciju DNK oštećenja (Čabarkapa i sar., 2014; Žukovec Topalović i sar., 2015).

S druge strane, treba istaći da je efekat kombinovane terapije na redukciju DNK oštećenja izostao kod pacijenata sa dugotrajnim RA. Pri razmatranju ovog rezultata treba prethodno imati u vidu da se nastala primarna DNK oštećenja, koja možemo detektovati

komet testom sastoje uglavnom od privremenih lezija koje podležu reparaciji. Izmereno ukupno DNK oštećenje, zapravo predstavlja mešavinu lezija koje mogu rezultirati iz odnosa trenutnog, indukovanog i repariranog oštećenja.

Kod hroničnih oboljenja kao što je RA, ćelije imaju smanjen reparacioni kapacitet i verovatno neefikasna popravka DNK dovodi do ubrzanog ćelijskog starenja (Cavanagh i sar., 2012). Cavanagh i sar. (2012) su pokazali da nivo DNK oštećenja kod pacijenata sa dugogodišnjim RA, u manjoj meri potiče od štetnih efekata slobodnih radikala, dok veći deo nastaje kao posledica neadekvatnih mehanizama reparacije. Prethodno je zabeleženo da se kod pacijenata sa RA javlja sniženje reparacionog kapaciteta i greške u procesu reparacije DNK, kao i da postoje velike interindividualne razlike u efikasnosti mehanizama reparacije DNK (Cavanagh i sar., 2012). Shodno tome, narušeni odgovor ćelija na nastala DNK oštećenja i sniženi DNK reparacioni kapacitet pacijenata sa dugotrajnim RA u ovoj studiji bi mogao biti objašnjenje za odsustvo efikasnosti kombinovane terapije kod ove grupe pacijenata.

4.7.1. Analiza parametara genomske nestabilnosti mikronukleusnim testom kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Proteklih 30 godina ustanovljeni su brojni biomarkeri oštećenja DNK koji su omogućili detekciju modifikacija na nivou pojedinačnih nukleotidnih baza, pa sve do oštećenja na nivou hromozoma, poput formiranja hromozomskih i hromatidnih prekida, acentričnih hromozomskih fragmenata, amplifikacija delova ili udvajanja čitavih hromozoma, koji dovode do pojave aneuploidija (Fenech, 2010). S obzirom da ne postoji jedinstveni test koji može dati uvid u sve aberantne pojave koje izazivaju genotoksični agensi, uobičajeni pristup u genotoksikologiji je upotreba kombinacije više testova, takozvane baterije testova, kako bi se dobio uvid u ukupno oštećenje genoma. Mikronukleusni test je jedna od konvencionalnih metoda za procenu *in vivo* klastogenih

efekata koja se primenjuje na ćelijama hematopoetskog sistema (Fenech, 2000). Njegova naročita pogodnost je visoka osetljivost na promene mikroelemenata u ćelijama, tako da je preporučljiv za ispitivanja efikasnosti dijetetskih intervencija na nivo genomske stabilnosti (Fenech, 2010). Osim toga, rezultati mikronukleus testa mogu prikazati integrisane efekte višestrukih interakcija i molekulskih genotoksičnih događaja koji narušavaju stabilnost genoma.

Rezultati mikronukleus testa ovog istraživanja upućuju na povišenu genomsku nestabilnost u svim eksperimentalnim grupama sa RA, koja je u skladu sa nalazima drugih studija, kao što su pokazali Ramos-Remus i sar. (2002) i Karaman i sar. (2011). Utvrđen je statistički značajan porast učestalosti mikronukleusa u početnim uzorcima limfocita novodijagnostikovanih pacijenata sa RA, koji prethodno nisu bili na terapiji, što ukazuje da je zabeležen klastogeni efekat u vezi sa prisustvom bolesti i stepenom inflamacije, a ne sa terapijom metotreksatom. Približne početne učestalosti MN kod novodijagnostikovanih pacijenata sa RA i kod pacijenata sa dugotrajnim RA, koji su prethodno bili na terapiji MTX minimum 6 meseci, idu u prilog pretpostavci da MTX ne utiče na povećanje učestalosti MN, već samo stanje bolesti. Međutim, zabeležene su razlike između grupa novodijagnostikovanih RA i pacijenata sa dugotrajnim RA u početnim vrednostima ostalih tipova aberacija u mikronukleus testu, uključujući i nukleusne pupove i nukleoplazmatske mostove. Oni su bili značajno učestaliji kod pacijenata sa dugoročnim oboljenjem što ukazuju na mogući efekat trajanja bolesti na učestalost ovih tipova aberantnih pojava. Pojava ovih vrsta genomske nestabilnosti je u međusobnoj pozitivnoj korelaciji i njihovo istovremeno prisustvo unutar pojedinačnih ćelija, ukazuje na zajednički mehanizam nastajanja, bilo putem oštećenja hromozoma ili modifikacija unutar hromozoma (Cheong i sar., 2013). Dok povećane učestalosti mikronukleusa uglavnom potiču od hromozomskih ili hromatidnih prekida, nukleusni pupovi mogu poticati i od amplifikacija genomske DNK, koja biva isključena iz glavnog jedra procesom pupljenja (Imle i sar., 2009). Pojava oštećenja u vidu DNK adukata može da izazove amplifikaciju sekvenci tokom procesa replikacije i reparacije DNK, a potom i do formiranja mikronukleusa i nukleusnih pupova. Povećane učestalosti nukleoplazmatskih mostova uglavnom ukazuju na prisustvo strukturnih rearanžmana DNK (Thomas i sar., 2003). Ovi tipovi aberantnih promena bili su

značajno učestaliji, u odnosu na kontrole, samo kod pacijenata sa dugotrajnim RA, ali ne i kod novodijagostikovanih RA koji su imali nivo približan kontrolnom. To bi moglo ukazivati na uticaj dugoročnog zapaljenskog procesa ili pak dugotrajne terapije MTX.

4.7.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na parametre genomske nestabilnosti u mikronukleus testu kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom

Šest nedelje nakon početka odgovarajućih tretmana, mikronukleus test je pokazao smanjenje učestalosti MN u obe grupe pacijenata u ranoj fazi RA, ali ne i kod grupe sa dugotrajnim RA. Iako su redukovane, učestalosti MN kod pacijenata u ranoj fazi RA posle 6 nedelja nisu pokazale značajnu razliku u odnosu na početnu vrednost, i ostale su povišene i kod grupe na kombinovanom tretmanu kao i kod grupe na terapiji samo MTX. Iz ovog rezultata bi se moglo zaključiti, da DOLE nije značajno uticao na smanjenje učestalosti MN kod pacijenata u ranoj fazi RA, s obzirom da je sličan rezultat dobijen i sa terapijom samo sa metotreksatom. S druge strane, posle 6 nedelja kombinovanog tretmana kod pacijenata sa dugotrajnim RA, došlo je do sniženja učestalosti nukleusnih pupova i nukleoplazmatskih mostova, dok je učestalost MN ostala nepromenjena. Ovaj nalaz takođe ukazuje, da kombinovani tretman sa DOLE ne utiče na nivo učestalosti MN, ali da može modifikovati pojavu nukleusnih pupova i nukleoplazmatskih mostova. S obzirom da MN, nukleusni pupovi i nukleoplazmatski mostovi imaju različite mehanizame nastanka, moguće je da DOLE ispoljava antigenotoksični efekat u sprečavanju određenih genotoksičnih pojava efikasno, dok na neke ne može da utiče, poput hromozomskih i hromatidnih prekida od kojih uglavnom potiču MN. Jedina studija koja je do sada ispitivala protektivni efekat DOLE protiv pojave genomskih nestabilnosti rađena je na glodarima kod kojih je povećani broj hromozomskih aberacija i MN izazvan tretmanom permetrinom, a DOLE je pokazao sposobnost da delimično umanjí stepen nastalih genetičkih oštećenja (Turkez i sar., 2012). Budući da još nisu sprovedena druga istraživanja delovanja DOLE na učestalost pojave MN, nukleoplazmatskih mostova i nukleusnih pupova, rezultate ove studije nije moguće

uporediti s rezultatima drugih autora. U studiji Mijatović i sar. (2011) pokazano je da kombinovana primena DOLE, kao suplementa u antitumorskoj terapiji sa različitim hemoterapeuticima, može pokazati različite ishode i antagonističko i sinergističko dejstvo. U ovoj studiji, kombinovana primena DOLE i metotreksata nije umanjila terapijski efekat metotreksata kod pacijenata u ranoj fazi RA, dok je kod pacijenata sa dugotrajnim RA, pokazano umereno poboljšanje parametara genomske nestabilnosti nakon uvođenja DOLE u terapiju.

Razmatrajući rezultate oba testa genotoksičnosti, komet i mikronukleus testa, može se uočiti da je u komet testu kombinovana terapija DOLE i MTX pokazala poboljšani efekat na redukciju DNK oštećenja, u odnosu na terapiju samo MTX kod pacijenata u ranoj fazi RA, dok mikronukleus test nije pokazao razliku u efikasnosti između dva tretmana. Kod pacijenata sa dugotrajnim RA, nije pokazan uticaj kombinovane terapije na sniženje parametara DNK oštećenja u komet testu niti na učestalosti MN. Razlike u rezultatima kometa testa i mikronukleus testa mogu se objasniti činjenicom, da je DNK oštećenje koje se detektuje komet testom poreklom uglavnom od jednolančanih prekida DNK, koji se mogu popraviti mehanizmima reparacije brže i efikasnije nego dvolančani prekidi, koji su uključeni u formiranje mikronukleusa (Iliakis i sar., 2004). Ako se ne izvrši efikasna popravka, dva susedna jednolančana prekida dovode do formiranja dvolančanog prekida, a ova reakcija je pojačana u prisustvu peroksil radikala (Prise i sar., 1993). Osim toga, poznato je da reaktivne kiseonične vrste takođe mogu da dovedu do grešaka u reparaciji DNK i pogrešnog spajanja na mestima prekida DNK lanaca (Bryant, 2007). Neadekvatna reparacija DNK često vodi do pojave hromozomskih aberacija i povišenih učestalosti mikronukleusa. Naime, moguće je da visok nivo inflamacije u aktivnoj ranoj fazi RA dovodi do povećanja oksidativnog oštećenja DNK, najčešće u obliku jednolančanih prekida. Moguće je, da u kombinovanom tretmanu sa DOLE i MTX, DOLE dovodi do hvatanja slobodnih radikala, sprečavanja formiranja jednolančanih prekida DNK, a da ne može uticati na popravku već nastalih dvolančanih oštećenja. Ova pretpostavka je u skladu sa rezultatima studije Karaman i sar. (2011) koji je pokazao da nivo oštećenja DNK kod RA pacijenata detektovan komet testom, zavisi od stepena oksidativnog stresa i aktivnosti bolesti i da postoje povećana DNK oštećenja kod pacijenata sa aktivnim, u odnosu na

inaktivni RA, dok istovremeno nije zabeležena razlika u broju MN. Naši rezultati ukazuju da kombinovana terapija MTX i DOLE pokazuje poboljšanu efikasnost u sprečavanju primarnih DNK oštećenja i da verovatno može uticati na sniženje i popravku jednolančanih prekida DNK, dok je njen efekat na nivo već formiranih DNK oštećenja, koja mogu biti i dvolančana, zanemarljiv. Rezultati oba testa genotoksičnosti u ovoj studiji idu u prilog navedenim pretpostavkama i ukazuju da pacijenti sa RA u ranoj fazi bolesti verovatno imaju efikasnije otklanjanje DNK oštećenja od pacijenata sa dugotrajnim RA i da je kapacitet za popravku DNK oštećenja smanjen kod dugotrajnog oboljenja, usled perzistentne hronične inflamacije i povećane produkcije ROS tokom produženog trajanja bolesti.

4.8.1. Analiza nivoa proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa ranim i dugotrajnim reumatoidnim artritismom pre uvođenja eksperimentalne terapije

Ispitivanjem nivoa IL-6, važnog proinflamatorog medijatora u razvoju RA, u ovoj studiji su dobijeni važni podaci o stepenu inflamacije kod pacijenata sa RA, odnosno ključnim inflamatornim promenama na nivou ćelija. Interleukin-6 spada u proinflamatorne citokine koji učestvuju u reakciji akutne faze upale. Njegova povišena koncentracija utiče na stvaranje reaktanata akutne faze u jetri, i stvaranje imunoglobulina aktiviranih B limfocita, pojačava produkciju T limfocita, reguliše ekspresiju IL-2 (Karamehić i Dizdarević, 2007). U studiji Baillet i sar. (2015) je pokazano da je nivo IL-6 u serumu surogat marker, koji može ukazati na stepen inflamacije u sinoviji i progresiju strukturnih promena u zglobovima. Pre uvođenja eksperimentalne terapije, sve tri grupe pacijenata sa RA u našoj studiji pokazale su visok nivo IL-6 u plazmi. Nije zabeležena razlika u nivou IL-6 između grupa. Ovaj rezultat ukazuje da je na početku studije stepen inflamacije bio povišen i kod novodijagnostikovanih pacijenata sa RA, i kod pacijenata sa dugotrajnim RA. Imajući u vidu da su i indeksi aktivnosti bolesti kod sve tri grupe bili takođe visoki, odsustvo razlika u nivou inflamacije preko izmerenog IL-6, kao i preko drugih pokazatelja akutne faze upale (fibrinogena i sedimentacije eritrocita) između tri grupe pacijenata na početku studije su u međusobno u skladu.

4.8.2. Uticaj kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline na nivo proinflamatornog citokina IL-6 kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom

Rezultati analize nivoa IL-6 kod pacijenata sa RA u ovoj studiji su pokazali, da je u sve tri eksperimentalne grupe zabeleženo sniženje koncentracije tokom 6 nedelja, i kod grupa na kombinovanoj terapiji MTX i DOLE kao i kod grupe samo na MTX. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da MTX, u najvećoj meri, doprinosi redukciji inflamacije. Međutim, dok su grupe pacijenata tretirane kombinovanom terapijom pokazale statistički značajnu redukciju IL-6 i posle 3 i posle 6 nedelja, grupa samo na metotreksatu je imala sniženje IL-6 posle 3 nedelje, ali ne i posle 6 nedelja terapije. Takođe treba istaći da je i kod pacijenata sa dugotrajnim RA, koji su minimum 6 meseci pre početka studije bili kontinuirano na terapiji MTX, zabeleženo sniženje IL-6 nakon uvođenja DOLE u njihovu terapiju. Ovi rezultati potvrđuju da DOLE doprinosi antiinflamatornom efektu i da kombinovana terapija MTX i DOLE ima poboljšani efekat u odnosu na terapiju samo MTX. Ovaj zaključak je u skladu sa nalazima drugih studija, gde je pokazano da oleuropein, glavna aktivna komponenta DOLE, na pacovima sa indukovanim artritismom, može značajno da umani produkciju proinflamatornih citokina TNF α , IL-1 β , i IL-6 i da efekat pokazuje zavisnost od koncentracije oleuropeina (Impellizzeri i sar., 2011). Osim toga, oleuropein je pokazao sposobnost inhibicije nekoliko enzima uključenih u inflamatorne procese (Visioli i sar., 2002). Apigenin, još jedna od važnih komponenti ekstrakta lista masline, efikasan je inhibitor inflamatornih medijatora azotnih oksida i prostaglandina E₂ (De la Puerta et al., 1999). U studiji Saksida i sar. (2011) na eksperimentalnom modelu dijabetesa tipa 1 kod pacova, pokazano je da DOLE ima mogućnost da značajno snizi produkciju proinflamatornih medijatora INF- γ i IL-17 i da umereno redukuje nivo IL-6. Navedene studije ukazuju da je antiinflamatorni efekat ekstrakta lista masline verovatno kompleksan proces koji se ostvaruje putem nekoliko različitih mehanizama, a u ovoj studiji je pokazan njegov značajan uticaj na supresiju proinflamatornog IL-6 u plazmi pacijenata sa RA, jednog od ključnih citokina u patogenezi ove bolesti.

5. ZAKLJUČAK:

Celokupni rezultati istraživanja su pokazali efekte primene šestonedeljne kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline, na parametre genomske nestabilnosti, indikatore oksidativnog oštećenja ćelija i nivo inflamatornih markera kod novodijagnostikovanih pacijenata kao i kod pacijenata sa dugotrajnim reumatoidnim artritismom. Na osnovu rezultata ispitivanja i u skladu sa postavljenim ciljevima studije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Suvi etanolni ekstrakt lista masline je ispoljio značajne antioksidativne sposobnosti u svim ispitivanim koncentracijama (0,0175 mg/mL–17,5 mg/mL), pri čemu su najbolju antioksidativnu aktivnost pokazale koncentracije veće od 1,75 mg/mL

2. Ispitivanjem uticaja oksidativnog stresa u razvoju reumatoidnog artritisa na ćelijskom nivou, pokazano je da u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom, bolest uslovljava sledeće promene vrednosti kod pacijenata u ranoj fazi oboljenja:

- Povećanje aktivnosti antioksidativnog enzima katalaze i smanjenje nivoa ćelijskih antioksidanasa u vidu tiolnih grupa
- Povećanje oksidativnog oštećenja glavnih ćelijskih grupa biomolekula: proteina, lipida i DNK
- Porast genomske nestabilnosti u vidu povećane učestalosti mikronukleusa
- Povećanje produkcije proinflamatornog citokina IL-6

Pomenute promene ukazuju da su pacijenti u ranoj fazi reumatoidnog artritisa, izloženi većem nivou oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja ćelija u odnosu na zdrave osobe. Iste promene, ali u manje izraženoj meri, zabeležene su i kod pacijenata sa dugotrajnim reumatoidnim artritismom. S obzirom da su slične promene zabeležene i kod pacijenata u ranoj fazi oboljenja i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem, može se

zaključiti da su oksidativna oštećenja ćelija kod pacijenata sa dugotrajnim reumatoidnim artritismom najverovatnije posledica bolesti, a ne nepoželjnih dugotrajnih efekata tretmana metotreksatom.

3. Ispitivanjem protektivnog uticaja kombinovane terapije metotreksatom i ekstraktom lista masline u periodu od 3 i 6 nedelja, kod pacijenata u ranoj fazi bolesti i kod pacijenata sa dugotrajnim reumatoidnim artritismom, pokazano je da primena kombinovane terapije:

- Omogućava smanjenje produkcije nitrita i redukciju primarnih DNK oštećenja kod pacijenata u ranoj fazi reumatoidnog artritisa, ali ne i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem
- Dovodi do sniženja lipidne peroksidacije kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem, ali ne i kod pacijenata u ranoj fazi reumatoidnog artritisa
- Utiče značajno na sniženje nivoa proinflamatornog IL-6 kod pacijenata u ranoj fazi reumatoidnog artritisa kao i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem
- Ne utiče značajno na stepen oštećenja proteina preko karbonilnih grupa i proteinskih tiola, kao i na aktivnost enzima katalaze u eritrocitima pacijenata u ranoj fazi reumatoidnog artritisa kao i kod pacijenata sa dugotrajnim oboljenjem

4. Upoređivanjem efekata postignutih kombinovanom terapijom metotreksatom i ekstraktom lista masline u odnosu na efekat terapije samo metotreksatom kod pacijenata u ranoj fazi RA došli smo do zaljučka da kombinovana terapija pokazuje poboljšane efekte u odnosu na standardnu terapiju samo metotreksatom time što:

- Ispoljava efikasniju redukciju primarnih DNK oštećenja
- Poboljšava redukciju proinflamatornog IL-6

Ispitivanjem niza biomarkera kod pacijenta sa reumatoidnim artritismom u ovoj studiji ostvaren je doprinos u proučavanju promena koje nastaju kao posledica ove bolesti na ćelijskom nivou, kako u početnim fazama tako i posle dugotrajnog stanja bolesti. Sumiranjem ključnih nalaza ove studije i efekata koji su zabeleženi u kombinovanoj

primeni ekstrakta lista masline i metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom, može se istaći da je kombinovana terapija dala bolje rezultate u odnosu na primenu samo konvencionalnog leka. Snižavanje obima ćelijskog oštećenja uzrokovano slobodnim radikalima i efikasnija redukcija inflamacije su ishodi kombinovane terapije u odnosu na konvencionalnu terapiju samo metotreksatom. Pokazani korisni efekti su uglavnom zabeleženi u ranoj fazi bolesti, dok su efekti kod pacijenata sa dugotrajnim reumatoidnim artritismom bili manje izraženi.

Može se zaključiti da se pozitivni efekti primene ekstrakta lista masline ogledaju, pre svega, u sprečavanju patoloških procesa u početnim fazama reumatoidnog artritisa na ćelijskom nivou, kada se uvodi terapija metotreksatom. Ekstrakt lista masline kao potencijani dodatni agens u terapiji reumatoidnog artritisa zaslužuje buduća ispitivanja, a njegov doprinos terapeutskim efektima metotreksata je neophodno dalje ispitati.

6. LITERATURA :

Abd El- Azim AO. Antioxidant effect of olive leaf extract on methotrexate-induced hepatic injury in rats. *Can J Clin Nutr.* 2014; 2(1): 4-14.

Ademowo OS, Staunton L, Fitzgerald O, Pennington SR. Genes and Autoimmunity - Biomarkers of Inflammatory Arthritis and Proteomics. Poglavlje 11 u: Stanilova SA, (Ur). Genes and Autoimmunity - Intracellular Signaling and Microbiome Contribution. InTech; 2013

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.* 1984; 105: 121-6.

Akyol Ö, Isçi N, Temel I, Özgöçmen S, Uz E, Murat M, Büyükberber S. The relationships between plasma and erythrocyte antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2001; 68: 311-7.

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2006; 36 (3): 182-8.

Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clini Biochem.* 2007; 40: 167-171.

Alvarez-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, Loza E, Clemente D, Lamas JR. Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64 (9): 1357-9.

Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res.* 1994; 307: 261-271.

Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos DT. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42:549-558.

Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. *J Med Food* 2002; 5: 1-7.

Anter J, Fernández-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno-Millán M, Alonso-Moraga Á, Muñoz-Serrano A, Luque de Castro MD. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutat Res.* 2011; 723: 165-170.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31: 315-324.

Assayag D, Lee JS, King Jr TE. Rheumatoid arthritis associated interstitial lung disease: a review. *Medicina* 2014; 74: 158-165.

Backdahl L, Bushell A, Beck S. Inflammatory signaling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 41 (1): 176-184.

Baillet A, Gossec L, Paternotte S, Etcheto A, Combe B, Meyer O, Mariette X, Gottenberg J-E, Dougados M. Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a french national multicenter cohort. *Arthritis Care Res.* 2015; 67(7): 905-912.

Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2004; 3(5): 362-7.

Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, Ustdal M. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24(4) :307-11.

Bauerová K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys.* 1999; 18: 15-20.

Benavente-Garcia J, Castillo J, Lorente A, Ortuno A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 2000; 68: 457-462.

Benhamou PY, Moriscot C, Richard MJ i sar. Adenovirus mediated catalase gene transcription reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia* 1998; 41: 1093-1100.

Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S, Williams FM. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan J Med.* 2010; 5: 4637.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1):70-6.

Berbert AA, Mitiko Kondo CR, Almendra CL, Matsuo T, Dichi I. Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 2005; 21: 131-136.

Bhattacharjee S, Pennathur S, Byun J, Crowley J, Mueller D, Gischler J, Hotchkiss RS, Heinecke JW. NADPH oxidase of neutrophils elevates o,o'-dityrosine cross-links in proteins and urine during inflammation. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 395: 69-77.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001; 2(10): 907-916.

Braun J, Rau R. An update on methotrexate. *Curr Op Rheumatol*. 2009; 21: 216-223.

Bryant PE. Origin of Chromosome Abberations: Mechanisms. U: Günter Obe, Vijayalaxm, (Ur). *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*. Berlin: Springer-Verlag; 2007 str. 193-4.

Čabarkapa A, Živković L, Borozan S, Zlatković-Švenda M, Dekanski D , Jančić I, Radak-Perović M, Bajić V, Spremo-Potparević B. Dry olive leaf extract in combination with methotrexate reduces cell damage in early rheumatoid arthritis patients-a pilot study. *Phytother Res*. 2016 doi: 10.1002/ptr.5662.

Čabarkapa A, Živković L, Žukovec D, Djelić N, Bajić V, Dekanski D, Spremo-Potparević B. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicol in Vitro*, 2014; 28(3): 451-456.

Cantaert T, Brouard S, Thurlings RM, Pallier A, Salinas GF, Braud C, Klarenbeek PL, de Vries N, Zhang Y, Soullillou J-P, Tak PP, Baeten D. Alterations of the synovial T cell repertoire in anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60 (7): 1944-1956.

Cavanagh MM, Weyand CM, Goronzy JJ. Chronic inflammation and aging: DNA damage tips the balance *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(4): 488-493.

Chauveau C, Rémy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, Tesson L, Brion R, Beriou G, Gregoire M, Josien R, Cuturi MC, Anegon I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 2005; 106 (5): 1694-1702.

Chenevier-Gobeaux C, Lemarechal H, Bonnefont-Rousselot D, Poiraudou S, Ekindjian OG, Borderie D. Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Inflamm Res.* 2006; 55: 483-90.

Cheong HSJ, Seth I, Joiner MC, Tucker JD. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 2013; 28(4): 433-40.

Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Res.* 2000; 33 Suppl: S99-108.

Çoban J, Öztezcan S, Dođru-Abbasođlu S, Bingöl I, Yeşil-Mizrak K, Uysal M. Olive leaf extract decreases age-induced oxidative stress in major organs of aged rats. *Geriatr Gerontol Int.* 2014; 14: 996-1002.

Coleshowers CL, Oguntibeju OO, Ukpong M, Truter EJ. Effects of methotrexate on antioxidant enzymes status in a rodent model. *Medical Technology SA* 2010; 24(1): 5-9.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26: 249.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006; 365: 30-49.

Cronstein BN. Low-dose methotrexate: A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 163-172.

Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, Williams B, Gabriel S, Lassere M, Johns N, Buchbinder R, Woolf A, March L. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73: 1316-1322.

Dai L, Claxson A, Marklund SL, Feakins R, Yousaf N, Chernajovsky Y, Winyard PG. Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. *Gene Ther.* 2003; 10(7): 550-8.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem.* 2006; 52(4): 601-623.

Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Pproteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2005; 24: 55-99.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.

Dani Redžo. „Patološke promene na gastroduodenumu izazvane lekovima koji se koriste u terapiji obolelih od reumatoidnog artritisa”, doktorska disertacija. Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet; 2014.

Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 1151-1161.

De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 445-449.

Dekanski D, Ristić S, Radonjić NV, Petronijević ND, Dekanski A, Mitrović DM. Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidative changes in rat liver. *J Serb Chem Soc.* 2011; 76 (9): 1207-1218.

Dekanski D, Janićijević-Hudomal S, Tadić V, Marković G, Arsić I, Mitrović D. Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *J Serb Chem Soc.* 2009; 74(4): 367-377.

Demoruelle MK, Deane KD. Treatment strategies in early rheumatoid arthritis and prevention of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2012; 14(5): 472-480.

Dervieux T, Orentas Lein D, Marcelletti J, Pischel K, Smith K, Walsh M, Richerson R. HPLC determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem*. 2003; 49:1632-1641.

Drafi F, Bauerova K, Kuncirova V, Ponist S, Mihalova D, Fedorova T, Harmatha J, Nosal R. Pharmacological influence on processes of adjuvant arthritis: Effect of the combination of an antioxidant active substance with methotrexate. *Interdiscip Toxicol*. 2012; 5(2): 84-91.

Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 2008; 23(3):191-205.

Efentakis P, Iliodromitis EK, Mikros E, Papachristodoulou A, Dages N, Skaltsounis A-L, Andreadou I. Effects of the olive tree leaf constituents on myocardial oxidative damage and atherosclerosis. *Planta Med*. 2015; 81: 648-654.

Egsmose C, Lund B, Borg G, Pettersson H, Berg E, Brodin U, Trang L. Patients with rheumatoid arthritis benefit from early 2nd line therapy: 5-year follow up of a prospective double blind placebo controlled study. *J Rheumatol*. 1995; 22: 2208-13.

Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-397.

El SN, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev*. 2009; 67(11): 632-638.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959; 82: 70-77.

Ersoy Y, Ozerol E, Baysal O, Temel I, MacWalter RS, Meral U, Altay ZE. Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(1): 76-8.

Fay J, Varoga D, Wruck CJ, Kurz B, Goldring MB, Pufe T. Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 (6): 189.

Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 364-371.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 397-440.

Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys.* 2010; 98(2): 234-43.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000; 455: 81-95.

Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993; 285(1): 35-44.

Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signaling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2012; 152: 415-22.

Firestein, GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-361.

Flemmig J, Rusch D, Ewa Czerwinska M, Rauwald H-W, Arnhold J. Components of a standardised olive leaf dry extract (Ph. Eur.) promote hypothiocyanite production by lactoperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 549: 17-25.

Flemmig J, Kuchta K, Arnhold J, Rauwald HW. *Olea europaea* leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase *Phytomedicine* 2011; 18: 561-566.

Ganesan R, Doss HM, Rasool M. Majoon ushba, a polyherbal compound ameliorates rheumatoid arthritis via regulating inflammatory and bone remodeling markers in rats. *Cytokine* 2016; 77: 115-126.

Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat Res.* 2000; 469: 279-285.

Garcia-Villalba R, Larrosa M, Possemiers S, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and postmenopausal women *Eur J Nutr.* 2014; 53:1015-1027.

Garinis GA, van der Horst GTJ, Vijg J, Hoeijmakers JHJ. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol.* 2008; 10: 1241-1247.

Ghaffar A. Hypersensitivity reactions. Poglavlja 23-26 u: Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I, (Ur). *Immunology.* 7th Ed. Amsterdam: Elsevier; 2006.

Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM, Zwinderman AH, Ronday HK, Han KH, Westedt ML, Gerards AH, van Groenendael JH, Lems WF, van Krugten MV, Breedveld FC, Dijkmans BA. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 3381-90.

Gong D, Geng C, Jiang L, Wang L, Yoshimura H, Zhong L. Mechanisms of olive leaf extract-ameliorated rat arthritis caused by kaolin and carrageenan. *Phytother Res.* 2012; 26(3): 397-402.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(1): 23-35.

Griffiths HR. Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease? *Autoimmun Rev.* 2008; 7: 544-9.

Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. *Physician's Desk Reference for Herbal Medicines.* 1st Ed. Montvale: Medical Economics Co; 1998 str. 1244.

Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJA. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 2519-2530.

Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Golabek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/ nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998; 274(2): 177-188.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18: 685-716.

Halliwell B, Gutteridge JMC, (Ur). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd Ed. New York: Oxford University Press; 1999. str. 936.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Catalytic metal ions in human diseases. *Molec Aspects Med*. 1985; 8: 89-193.

Hassen I, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. *J Func Foods* 2015; 18: 926-940.

Hawkins CL, Davies MJ. Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: random attack or site-specific damage? *Biochim Biophys Acta* 1997; 1360: 84-96.

Heliövaara M, Knekt P, Aho K, Aaran RK, Alfthan G, Aromaa A. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 51-53.

Hemeida RAM, Mohafez OM. Curcumin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic Oxidative Damage in Rats. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* 2008; 20(2): 141-148.

Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6(6): 265-78.

Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:498.

<http://www.birmingham.ac.uk/research/activity/cancer-genomics/research/dna-damage-repair/index.aspx>

Hurd TR, Murphy MP. Biological systems relevant for redox signalling and control. U: Jacob C, Winyard PG, (Ur). Redox signaling and regulation in biology and medicine. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2009. str. 13-45.

Ikeda Y, Masuko K, Nakai Y, Kato T, Hasanuma T, Yoshino SI, Mizushima Y, Nishioka K, Yamamoto K. High frequencies of identical T cell clonotypes in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients suggest the occurrence of common antigen-driven immune responses. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 446-53.

Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 104: 14-20.

Imle A, Polzer B, Alexander S, Klein CA, Friedl P. Genomic instability of micronucleated cells revealed by single-cell comparative genomic hybridization. *Cytometry Part A* 2009; 75: 562-8.

Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Morittu VM, Procopio A, Britti D, Cuzzocrea S. Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 339(3): 859-69.

Islamov BI, Balabanova RM, Funtikov VA. Effect of bioresonance therapy on antioxidant system in lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Bull Exp Biol Med.* 2002; 134: 248-250.

Jang J-H, Surh Y-J. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1371-1379.

Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta* 2003; 338: 123-129.

Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, et al. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(5): 1134-1144.

Kageyama Y, Takahashi M, Ichikawa T, Torikai E, Nagano A. Reduction of oxidative stress, and the cardio-ankle vascular index in hypertensive marker levels by anti-TNF-alpha antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26: 73-80.

Kalpakcioglu B, Şenel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2008; 27: 141-145.

Kaminiarczyk-Pyzalka D, Adamczak K, Mikos H, Klimecka I, Moczko J, Niedziela M. Serum TNF- α levels and indicators of disease activity in children with oligoarticular juvenile idiopathic arthritis (oJIA) in the first year of the disease. *Clin Lab.* 2014; 60:799-807.

Karaman A, Binici DN, Melikoglu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis. *Mutat Res.* 2011; 721: 1-5.

Karamehić J, Dizdarević Z. Klinička imunologija. U: Jasenko Karamehić, Zehra Dizdarević, Bećir Heljić, Armen Margaryan, Lamija Zečević, Nataša Šerić, (Ur). Citokini i njihova uloga u autoimunim bolestima. Sarajevo: Svjetlost; 2007 str. 87-120.

Kendall M, Batterham M, Callahan DL, Jardine D, Prenzler PD, Robards K, Ryan D. Randomized controlled study of the urinary excretion of biophenols following acute and chronic intake of olive leaf supplements Food Chem. 2012; 130: 651-659.

Khalatbary AR, Zarrinjoei GhR. Anti-inflammatory effect of oleuropein in experimental rat spinal cord trauma. Iran Red Crescent Med J. 2012; 14(4): 229-34.

Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. Teratog Carcinog Mutagen. 2002; 22(1): 13-30.

Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. J Autoimmun. 2014; 48-49: 26-30.

Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Free Rad Res. 2012; 46(12):1482-9.

Laev SS, Salakhutdinov NF. Anti-arthritic agents: Progress and potential. Bioorg Med Chem. 2015; 23(13): 3059-80.

Lahlou M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. Pharmacol Pharm. 2013; 4: 17-31.

Lama A, Saikia H. Targeted therapies for rheumatoid arthritis: a review. *IJPSR* 2011; 2(5): 1116-1134.

Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technol.* 2010; 101(10): 3751-3754.

Lee YH, Bae SC, Song GG. Coffee or tea consumption and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2014; 33(11): 1575-83.

Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian OG, Borderie D. Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clin. Chim Acta* 2006; 372(1-2):147-153.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shallttiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990; 186: 464-78.

Liew FY, McInnes IB. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol Immunol.* 2002; 38: 887-890.

Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys.* 2001; 35(2): 141-70.

Lü S, Wang Q, Li G, Sun S, Guo Y, Kuang H. The treatment of rheumatoid arthritis using Chinese medicinal plants: From pharmacology to potential molecular mechanisms *J Ethnopharmacol.* 2015; 176: 177-206.

Makol A, Crowson CS, Wetter DA, Sokumbi O, Matteson EL, Warrington KJ. Vasculitis associated with rheumatoid arthritis: a case-control study. *Rheumatology* 2014; 53: 890-899.

Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro G, Zappia V. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem*. 1999; 10 (3): 159-65.

Masri FA, Comhair SAA, Koeck T, Stuehr DJ, Xu W, Janocha A, et al. Abnormalities in nitric oxide and its derivatives in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172: 597-605.

McCann K. Nutrition and rheumatoid arthritis. *Explore (NY)* 2007; 3(6): 616-8.

Mijatović S, Timotijević G, Miljković Dj, Radović J, Maksimović-Ivanić D, Dekanski D, Stošić- Grujičić S. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *Int J Cancer* 2011; 128: 1955-1965.

Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005; 21: 389-394.

Miljković D, Dekanski D, Miljković Z, Momčilović M, Mostarica-Stojković M. Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Nutr*. 2009; 28: 346-350.

Mima T, Saeki Y, Ohshima S, Nishimoto N, Matsushita M, Shimizu M, Kobayashi Y, Nomura T, Kishimoto T. Transfer of rheumatoid arthritis into severe combined

immunodeficient mice: the pathogenetic implications of T cell populations oligoclonally expanding in the rheumatoid joints. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1746-58.

Mirjana Zlatković Švenda. „Epidemiološke i kliničke karakteristike obolelih od reumatoidnog artritisa i spondiloartropatija“, doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet; 2014.

Mukherjee S, Ghosh S, Choudhury S, Adhikary A, Manna K, Dey S, Sa G, Das T, Chattopadhyay S. Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF- κ B pathways. *J Nutr Biochem.* 2013; 24 (12): 2040-2050.

Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111:72-78.

Nanjundaiah SM, Astry B, Moudgil AD. Mediators of inflammation in induced bone damage in arthritis and their control by herbal products. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, Article ID 518094, 20 pages

Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res.* 2002; 504(1-2): 3-16.

Pan-Yun Ting J, Trowsdale J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 2002; 109 Suppl: S21-33.

Pejovic M, Stankovic A, Mitrovic DR. Lactate dehydrogenase activity and its isoenzymes in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1992;19(4): 529-33.

Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, Bellido C, Jimenez Y, Moreno JA, Delgado-Lista J, Egido J, Perez-Jimenez F. The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis* 2007; 194(2): 141-6.

Petkov V, Manolov P. Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein. *Arzneimittelforschung* 1972; 22: 1476-1486.

Phillips DC, Irundika Dias HK, Kitas GD, Griffiths HR. Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in rheumatoid arthritis (RA): Causes and consequences for immune function, cell survival, and therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12 (6):743-785.

Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr*. 2010; 140: 946-953.

Prise KM, Davies S, Michael BD. Evidence for Induction of DNA Double-Strand Breaks at Paired Radical Sites. *Radiat Res*. 1993; 134(1): 102-6.

Ramos-Remus G, Dorazco-Barragan FJ, Aceves-Avila, Alcaraz-Lopez F, Fuentes-Ramirez F, Michel-Diaz J, Torres-Bugarin O, Ventura-Aguilar A, Zuñiga-González G. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2002; (20)2: 208-212.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(9-10): 1231-7.

Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol.* 2002; 3(12): 1129-1134.

Rodriguez-Carrio J, Alperi-Lopez M, Lopez P, Ballina-Garcia FJ, Abal F, Suarez A. Antibodies to high-density lipoproteins are associated with inflammation and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Transl Res.* 2015; 166(6): 529-39.

Rosillo MÁ, Alcaraz MJ, Sánchez-Hidalgo M, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C, Ferrándiz ML. Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis. *J Nutr Biochem.* 2014; 25: 1275-1281.

Rovensky J, Stancikova M, Rovenska E, Stvrtina S, Stvrtinova V, Svik K. Treatment of rat adjuvant arthritis with flavonoid (Detralex), methotrexate, and their combination. *Ann NY Acad Sci.* 2009; 1173: 798-804.

Roy S, Sannigrahi S, Vaddepalli RP, Ghosh B, Pusp P. A novel combination of methotrexate and epigallocatechin attenuates the overexpression of pro-inflammatory cartilage cytokines and modulates antioxidant status in adjuvant arthritic rats. *Inflammation* 2012; 35 (4): 1435-47.

Rudaitane S, Lazutka JR, Mierauskiene J, Ranceva J, Jasiulevičiute L, Žvirbliene A, Mauricas M, Venalis A, Butrimiene I. Cytogenetic parameters in acute and chronic reactive arthritis in comparison with rheumatoid arthritis. *Biologija* 2003; (2): 23-26.

Ryan BJ, Nissim A, Winyard PG. Oxidative post-translational modifications and their involvement in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Redox Biol.* 2014; 2: 715-724.

Saksida T, Miljković D, Dekanski D, Stojanović I, Stošić-Grujičić S. Drz olive leaf extract (DOLE) down-regulates the progression of experimental immune-mediated diabetes by modulation of cytokine profile in the draining lymph nodes. *Arch Biol Sci.* 2011; 63 (2): 289-297.

Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.* 2002; 8: 121-137.

Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW. The diagnostic properties of RA antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 155-63.

Serra A, Rubio L, Borrás X, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56: 486-496.

Seven A, Güzel S, Aslan M. Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2008; 41: 538-543.

Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extra chromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S Phase. *JCB* 1998; 140 (6): 1307-1320.

Shive W, Pinkerton F, Humphreys J, Johnson MM, Hamilton WG, Matthews KS. Development of a chemically defined serum- and protein-free medium for growth of human peripheral lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 83: 9-13.

Silva S, Sepodes B, Rocha J, Direito R, Fernandes A, Brites D, Freitas M, Fernandes E, Bronze MR, Figueira ME. Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis. *J Nutr Biochem*. 2015; 26: 360-368.

Singal DP, Li J, Zhu Y. Genetic basis for rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp*. 1999; 47: 307-311.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175: 184-191.

Skoldstam L, Hagfors L, Johansson G. An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 208-214.

Sokka T. Assessment of pain in rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2005; 23(39): S77-S84.

Sotoudehmanesh R, Anvari B, Akhlaghi M, Shahraeeni S, Kolahdoozan S. Methotrexate hepatotoxicity in patients with rheumatoid arthritis. *Middle East J Dig Dis*. 2010; 2(2): 104-109.

Spurlock III CF, Olsen NJ, Aune TM. Will Understanding Methotrexate Modes of Action Teach us About Rheumatoid Arthritis? U: Katerina Chatzidionysiou (Ur.). *Autoimmunity - Pathogenesis, Clinical Aspects and Therapy of Specific Autoimmune Diseases*, InTech, 2015. DOI: 10.5772/59901.

Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.* 1998; 30: 225-243.

Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Brit J Haematol.* 1971; 20: 95-111.

Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, Kumagai S. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69 (1): 70-81.

Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Moccetti T, Verbruggen M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine* 2011; 18(4): 251-8.

Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 292-304.

Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 2003; 18(2):187-94.

Torres-Bugarín O, Macriz Romero N, Ramos Ibarra ML, Flores-García A, Valdez Aburto P, Guadalupe Zavala-Cerna M. Genotoxic effect in autoimmune diseases evaluated by the micronucleus test Assay: our experience and literature review. *BioMed Res Int.* 2015; Article ID 194031, 11.

Turkez H, Togar B, Polat E. Olive leaf extract modulates permethrin induced genetic and oxidative damage in rats *Cytotechnology* 2012; 64: 459-464.

Turko IV, Murad F. Protein Nitration in Cardiovascular Diseases. *Pharmacol Rev.* 2002; 54(4): 619-634.

Uchida K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* 2003; 25: 249-257.

Urpi-Sarda M, Casas R, Chiva-Blanch G, Romero-Mamani ES, Valderas-Martínez P, Arranz S, Andres-Lacueva C, Llorach R, Medina-Remón A, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 2012; 65: 577-583.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004; 266: 37-56.

van Beers-Tas MH, Turk SA, van Schaardenburg D. How does established rheumatoid arthritis develop, and are there possibilities for prevention? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2015; 29(4-5): 527-542.

van der Helm-van Mil AH, le Cessie S, van Dongen H, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 433-40.

van der Linden MP, Knevel R, Huizinga TW, van der Helmvan Mil AH. Classification of rheumatoid arthritis: comparison of the 1987 American College of Rheumatology criteria and the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 37-42.

Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.* 2002; 22: 65-75.

Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* 2000; 468: 159-160.

Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247:60–64.

Vissers MN, Zock PL, Leenen R, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *J Nutr.* 2002; 132: 409-417.

Vreugdenhil G, Swaak AJ. Anaemia in rheumatoid arthritis: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Rheumatol Int.* 1990; 9(6): 243-57.

Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009; 15: 468-477.

Weyand CM, Goronzy JJ. HLA-DRB1 alleles as severity markers in RA. *Bull Rheum Dis.* 1994; 43:5-8.

Willner C. An overview of the pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Altern Ther Health Med.* 2004; 10(4): 26-34.

Winterbourn CC, Bonham MJ, Buss H, Abu-Zidan FM, Windsor JA. Elevated protein carbonyls as plasma markers of oxidative stress in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 375-382.

Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol.* 2000; 7: 53-58.

Yoshida M, Takakuwa Y. Method for the simultaneous assay of initial velocities of lactate dehydrogenase isoenzymes following gel electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods* 1997; 34(3): 167-175.

Yurov YB, Vorsanova SG, Iourov IY. GIN'n'CIN hypothesis of brain aging: deciphering the role of somatic genetic instabilities and neural aneuploidy during ontogeny. *Mol Cytogenet.* 2009; 2: 23.

Žukovec Topalović D, Živković L, Čabarkapa A, Djelić N, Bajić V, Dekanski D, Spremo-Potparević B. Dry olive leaf extract counteracts L-thyroxine-induced genotoxicity in human peripheral blood leukocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; Article ID 762192, 8 pages

DODATAK

BIOGRAFIJA AUTORA

Andrea M. Čabarkapa je rođena 8.5.1985. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Devetu beogradsku gimnaziju je završila u Beogradu, a 2004. godine je upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,37 i iste godine se upisala na doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, u okviru studijske grupe Biologija, modula Genetika. Naučno-istraživački rad u okviru doktorskih studija kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije započela je 2011. godine u okviru Katedre za Fiziologiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na projektu osnovnih istraživanja OI173034, čiji je rukovodilac prof. dr Biljana Potparević. Od 2012. godine angažovana je kao istraživač pripravnik, a 2013. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik. U okviru ovog projekta je obuhvaćen i istraživački rad koji se odnosi na izradu njene doktorske disertacije pod mentorstvom prof. dr Biljane Potparević.

Tokom istraživačkog rada učestvovala je u realizaciji tri međunarodna projekta: bilateralnog projekta Republike Srbije sa Italijom i bilateralnog projekta sa Slovenijom, kao i evropskog projekta hCOMET. U okviru bilateralnog projekta sa Italijom, usavršavala se u periodu od dve nedelje na Odeljenju kliničkih nauka, Politehničkog Univerziteta Marke, Ankona, Italija.

Autor je 4 i koautor 8 radova u međunarodnim časopisima i 1 rada u časopisu od nacionalnog značaja, kao i brojnih domaćih i međunarodnih saopštenja. Do sada je publikovala ukupno 13 radova, 3 rada kategorije M21, 2 rada M22 kategorije i 6 radova M23 kategorije i jedan rad M52 kategorije.

Član je Evropskog udruženja za istraživanja slobodnih radikala (Society for Free radical research SFRR-Europe) i Društva genetičara Srbije.

Recenzirala je veći broj radova u međunarodnim časopisima Environmental Toxicology and Pharmacology; Journal of Alzheimer's disease: JAD; Toxicology in Vitro; BMC Complementary and Alternative Medicine.

Govori tečno engleski jezik, a služi se i ruskim, italijanskim i grčkim jezikom.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Андреа Чабаркапа
Број индекса Б3046/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Утицај етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) на
геномску нестабилност, параметре оксидативног стреса и инфламације
код пацијената са реуматоидним артритисом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

 Андреа Чабаркапа

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Андреа Чабаркапа

Број индекса Б3046/2010

Студијски програм Генетика

Наслов рада Утицај етанолног екстракта листа маслине (Olea europaea L.) на геномску нестабилност, параметре оксидативног стреса и инфламације код пацијената са реуматоидним артритисом

Ментор Др Биљана Потпаревић, редовни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Андреа Чабаркапа

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.)
на геномску нестабилност, параметре оксидативног стреса и инфламације
код пацијената са реуматоидним артритисом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.


Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.