

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 10.06.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Биљане Потпаревић и др Марије Савић Веселиновић о урађеној докторској дисертацији **Андреа М. Чабаркапа**, истраживача сарадника Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, под насловом „**Утицај етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) на геномску нестабилност, параметре оксидативног стреса и инфламације код пацијената са реуматоидним артритисом**”, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Биљана Потпаревић, редовни професор Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, др Лада Живковић, доцент Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и др Марија Савић Веселиновић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Андреа М. Чабаркапа** под насловом „**Утицај етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) на геномску нестабилност, параметре оксидативног стреса и инфламације код пацијената са реуматоидним артритисом**“, написана је на 132 стране, и подељена у 6 поглавља: **Увод** (29 страна), **Материјал и методе** (15 страна), **Резултати** (32 стране), **Дискусија** (25 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (28 страна). Дисертација садржи 193 литературна цитата, 35 слика, 3 табеле. На почетку дисертације се налази насловна страна на српском и енглеском језику, подаци о менторима и члановима комисије, изјаве захвалности, апстракт на српском и енглеском језику, листа скраћеница коришћених у тексту и садржај. На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

Поглавље **Увод** докторске дисертације је подељено у четири тематске целине. У првој целини је дата дефиниција реуматоидног артритиса, учесталост обољевања у укупној светској популацији, као и клиничка слика пацијената у зависности од фазе болести овог аутоимуног обољења. Друга целина је подељена на четири дела и у њој је дат опис процеса настајања слободних радикала у организму и механизма њихове регулације, са наглашавањем улоге оксидативног стреса у настанку овог обољења. Дат је преглед најчешћих продуката оксидативних процеса у ћелији, у зависности од биомолекула који се оксидују и који се као такви могу користити као биомаркери оксидативних оштећења. У трећој целини су наведене групе лекова које се данас најчешће користе у лечењу

реуматоидног артритиса, као и преглед литературе о антиоксидансима као потенцијалној помоћној терапији у лечењу ове болести. Посебно су описана позната својства екстракта листа маслине, његова досадашња комерцијална употреба у лечењу других болести и на животињама, као и његов хемијски састав. У последњој целини су истакнути научни циљеви ове докторске дисертације који су јасно организовани у четири целине. Први циљ се односио на испитивање *in vitro* антиоксидативног потенцијала екстракта листа маслине. Други циљ се односио на испитивање степена оксидативних оштећења, инфламације и геномске нестабилности код здравих испитаника и пацијената оболелих од реуматоидног артритиса који су у различитим фазама болести. Трећи циљ је формулисан ради испитивања утицаја екстракта листа маслине на степен оксидативног оштећења, инфламације и геномске нестабилности код пацијената са реуматоидним артритисом. Испитивани су пацијенти у различитим фазама болести – пацијенти са дуготрајним обољењем који су на терапији екстрактом листа маслине у комбинацији са стандардном терапијом метотрексатом која се користи у лечењу ове болести, и пацијенти који су у раној фази болести – који су или на стандардној или на комбинованој терапији. Четврти циљ се односи на утврђивање разлика у ефикасности комбиноване терапије у односу на ефекат стандардне терапије метотрексатом код пацијената у раној фази болести.

Поглавље **Материјал и методе** је организовано у шест делова, у којима су дате детаљне информације о дизајну експеримента, групама испитаника и примењеним методама. У првом делу дат је опис метода за процену антиоксидативног потенцијала етанолног екстракта листа маслине *in vitro* помоћу 3 методе. У наредном делу описане су методе за анализу параметара код пацијената са реуматоидним артритисом, који су показатељи оксидативних оштећења, геномске нестабилности и инфламације. За сваку групу испитаника су праћени исти параметри. Описане су методе мерења производа оксидативних оштећења протеина (преко концентracије нитрита и карбонилних група) и липида (преко концентracије малондиалдехида и изоензимске дистрибуције лактат-деhidрогеназе). Дат је опис метода мерења параметара антиоксидативне заштите – концентracије каталазе у еритроцитима и тиолних група у плазми. Описана су два теста којима је мерена геномска нестабилност – комет и микронуклеус тест. Представљена је и методологија мерења параметра инфламације, односно интерлеукина-6 у крвној плазми испитаника.

У поглављу **Резултати** је кандидаткиња добијене резултате груписала у пет тематских целина. У првој целини су приказана антиоксидативна својства екстракта листа маслине *in vitro* и утврђене су концентracије при којима је редукција слободних радикала највећа. Све три коришћене методе су показале да је концентracија од 17,5 mg/ml имала највећа антиоксидативна својства. У осталим целинама су прегледно и униформно представљени резултати студије на испитаницима, организовани на исти начин за сваки анализирани параметар, а у складу са постављеним другим, трећим и четвртим циљем ове докторске дисертације. Пацијенти свих група су имали значајно више нивое геномске нестабилности и параметара који указују на оксидативна оштећења и повећану инфламацију. Разлике између краткотрајно и дуготрајно оболелих пацијената су биле значајне само за неке од мерених параметара. Екстракт листа маслине је показао значајан ефекат на смањење геномске нестабилности, али мерене преко комет теста (не и преко микронуклеус теста) само код пацијената у раној фази болести. Није уочен значајан ефекат на антиоксидативну заштиту, односно на активност ензима каталазе и концентracију тиолних група ни у једној од група испитаника. Значајан ефекат у виду мањег нивоа оксидативних оштећења је

уочен за нитрите и изоензимску форму лактат- дехидрогеназе ЛДХ5 код пацијената у раној фази болести, а за МДА и за све изоензимске форме ЛДХ код дуготрајно оболелих испитаника. Екстракт листа маслине је значајно утицао на смањење параметра инфламације, односно интерлеукина-6 код пацијената у раној фази болести као и код дуготрајно оболелих испитаника. На крају су извршена поређења резулата анализе група раној фази болести који су били само на метотрекасату или комбинацији метотрексата и екстракта листа маслине. Комбинована терапија је показала значајан ефекат, у односу на терапију само метотрексатом, у виду смањења геномске нестабилности (смањења примарних оштећења мерених преко комет теста), смањења оксидативних оштећења липида (мерених преко концентracије МДА) и смањења инфламације (преко интерлеукина-6).

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња јасно и детаљно коментарише резултате који су проистекли из докторске дисертације. У уводном делу овог поглавља се истиче значај и предности студије овог типа, као вредној допуни конвенционалним епидемиолошким студијама. Истиче се њена посебна улога у откривању молекуларних механизма који су укључени у етиологију ове болести. Дискутује се о стандардним терапијама које се користе у лечењу реуматоидног артритиса и њиховим штетним ефектима и проблему резистенције код пацијената, и потенцијалу нових терапија са антиоксидативним и инфламаторним потенцијалом, са освртима на литературне податке. Након овог дела следи дискусија о добијеним резултатима према постављеним циљевима и праћеним биомаркерима оксидативних оштећења, инфламације и геномске нестабилности. Кандидаткиња је анализирала сваки резултат поређењем са подацима добијеним у другим радовима, али са аспекта коришћеног дизајна експеримента и категорија испитаника. Разлике између пацијената код којих је тек дијагностикован реуматоидни артритис (рана фаза болести) и пацијената код којих је минимум 6 месеци присутно обољење и који су током тог периода били на континуираној терапији метотрексатом (пацијенти са дуготрајним обољењем) објашњава генерално дејством стандардне терапије на смањење инфламације, која онда има утицаја и на оксидативни стрес односно биомаркере оксидативног стреса. Добијене разлике за мерене биомаркере различитих биолошких процеса кандидаткиња објашњава специфичним редоследом тих процеса, као и одговором ћелија на њих у зависности од степена и трајања инфламације и оксидативног стреса.

У поглављу **Закључци** је дат кратак преглед најбитнијих резултата проистеклих из ове докторске дисертације, у складу са постављеним циљевима. Кандидаткиња закључује да екстракт листа маслине има потенцијал за примену у виду додатне терапијеу лечењу реуматоидног артритиса. Наводи се да су најзначајнији исходи комбиноване терапије побољшање ендогених антиоксидативних способности ћелија, снижавање обима ћелијског оштећења насталих од слободних радикала током инфламаторног процеса и ефикаснија редукција инфламације. Кандидаткиња такође истиче да су, и поред тога што су овакви ефекти уочени углавном код пацијената у раној фази болести, уочени корисни ефекти екстракта листа маслине показатељ да екстракт листа маслине утиче на више биолошких функција у ћелији и да као такав може имати примену и у другим аутоимуним обољењима.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Čabarkapa, A.**, Živković, L., Borozan, S., Zlatković-Švenda, M., Dekanski, D., Jančić, I., Radak-Perović, M., Bajić, V. and Spremo-Potparević, B. (2016) Dry Olive Leaf Extract in Combination with Methotrexate Reduces Cell Damage in Early Rheumatoid Arthritis Patients—A Pilot Study. *Phytother. Res.*, doi: 10.1002/ptr.5662. **M22**
2. **Cabarkapa, A.**, Zivković, L., Zukovec, D., Djelić, N., Bajić, V., Dekanski, D., Spremo-Potparević, B. (2014) 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* 28: 451-456. **M21**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Čabarkapa, A.**, Živković, L., Bajić, V., Dekanski, D., Spremo-Potparević, B. Effects of dry olive leaf extract against H₂O₂ induced toxicity in human lymphocytes. Third International Congress on Pharmacology of Natural Products, Cuban Society of Pharmacology, June 6-10, 2012, Topes de Collantes, Santi Spiritus, Cuba. *Revista Cubana de Farmacia* vol.46 (Suplemento Especial No2.), pp 74. **M34**
2. Bajić, V., Spremo-Potparević, B., **Čabarkapa, A.**, Bogdanović, N., Đelić, N., Dekanski, D., Živković, L. Protective potential of olive leaf extract against adrenaline induced oxidative stress in human lymphocytes. VII Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, May 27-30, 2012, Subotica, Serbia. Book of abstracts, Poster section 2/20. **M34**
3. Žukovec, D., **Čabarkapa, A.**, Živković, L., Djelić, N., Dekanski, D., Bajić, V., Spremo-Potparević, B. Protective Potential of Dry Olive Leaf Extract Against Oxidative Stress in Human Lymphocytes Induced by Thyroxin. World Forum for Nutrition Research Conference; Mediterranean Foods on Health and Disease, May 20–21, 2013, Reus, Spain. *Annals of Nutrition & Metabolism* 2013; 62(suppl 2), pp 51, doi: 10.1159/000351281. **M34**
4. **Cabarkapa, A.**, Zivkovic, L., Zlatkovic-Svenda, M., Topalovic-Zukovec, D., Bajić, V., Dekanski, D., Borozan, S., Spremo-Potparevic, B. Dry olive leaf extract supplementation reduces DNA damage in chronic rheumatoid arthritis patients. Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine of the Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), September 21-23, 2014, Cologne, Germany. Book of Abstracts, pp19. **M34**
5. **Cabarkapa, A.**, Zivkovic, L., Jancic, I., Borozan, S., Zlatkovic-Svenda, M., Dekanski, D., Arsenovic-Ranin, N., Spremo-Potparevic, B. Beneficial effects of combined therapy with Dry olive leaf extract (DOLE) and methotrexate in early rheumatoid arthritis patients. The 7th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH), October 27-30, 2015, Tours, France. Book of abstracts, pp 246. **M34**

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација **Андреа М. Чабаркапа** под насловом „Утицај етанолног екстракта листа маслине (*Olea europaea* L.) на геномску нестабилност, параметре оксидативног стреса и инфламације код пацијената са реуматоидним артритисом“, представља оригиналан научни допринос разумевању биолошких процеса у основи реуматоидног артритиса, као и потенцијалне примене екстракта листа маслине као додатне терапије у лечењу овог обољења. Како су у основи аутоимуних обољења исти или слични биолошки процеси, коришћен биомедицински приступ ће имати апликацију у истраживањима и терапији других обољења. Примена адекватне и савремене методологије, јасно представљање резултата, и њихово критичко дискутовање са освртом на савремене литературне податке чине ову тезу квалитетним научним радом.

Сумирајући све наведено, Комисија позитивно оцењује ову докторску дисертацију и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Андреа Чабаркапа** јавну одбрану докторске тезе.

У Београду, 29.07.2016. године

КОМИСИЈА:

др Биљана Потпаревић, редовни професор
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

др Лада Живковић, доцент
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

др Марија Савић Веселиновић, доцент
Универзитет у Београду - Биолошки факултет