



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLINIČKA ISTRAŽIVANJA



**ISPITIVANJE 8-HIDROKSI-2-DEOKSIGUANOZINA, PRODUKATA LIPIDNE
PEROKSIDACIJE I AKTIVNOSTI ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA KOD
PREKANCEROZNIH LEZIJA I U KARCINOMU GRLIĆA MATERICE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Branislava Srđenović Čonić

Prof. dr Aljoša Mandić

Kandidat:

Marija Jelić

NOVI SAD, 2019.

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	REAKTIVNE KISEONIČNE VRSTE I OKSIDATIVNI STRES	1
1.1.1	Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot -}$).....	3
1.1.2	Vodonik peroksid (H_2O_2)	5
1.1.3	Hidroksilni radikal (OH^{\cdot})	6
1.1.4	Singlet kiseonik (1O_2)	7
1.2	ANTIOKSIDATIVNI ENZIMI.....	7
1.2.1	Superoksid dismutaza (SOD)	8
1.2.2	Katalaza (CAT)	11
1.2.3	Glutation peroksidaza (GPx).....	12
1.2.4	Glutation reduktaza (GR)	13
1.2.5	Glutation-S-transferaza (GST)	14
1.3	OKSIDATIVNA MODIFIKACIJA BIOMOLEKULA	15
1.3.1	Oksidativna modifikacija lipida	15
1.3.2	Oksidativna modifikacija DNK.....	17
1.4	OKSIDATIVNI STRES I KARCINOGENEZA.....	20
1.5	KARCINOM GRLIĆA MATERICE	22
1.5.1	Epidemiologija i faktori rizika	22
1.5.2	Grlić materice	23
1.5.3	Patološke promene grlića materice.....	23
1.5.4	Terapija.....	25
1.5.5	Uzajamno dejstvo oksidativnog stresa i HPV u procesu karcinogeneze.....	26
1.5.6	Oksidativni stres i HPV infekcija.....	27
2	CILJEVI RADA	33
3	MATERIJAL I METODE.....	35
3.1	Konstrukcija i način izbora uzorka	35
3.2	Metod rada	36
3.3	Aparati i pribor	38
3.4	Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa	38
3.4.1	Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije	38
3.5	Određivanje pokazatelja antioksidativne zaštite.....	39
3.5.1	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	39

3.5.2	Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	40
3.5.3	Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx).....	41
3.5.4	Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze (GR)	42
3.5.5	Određivanje aktivnosti glutacion-S-transferaze (GST)	43
3.6	Statistička analiza	44
4	REZULTATI.....	46
4.1	Karakteristike ispitanica	46
4.2	Ispitivanje intenziteta lipidne peroksidacije i aktivnosti enzima antioksidative zaštite 48	
4.2.1	Intenzitet lipidne peroksidacije	48
4.2.2	Aktivnost enzima superoksid dismutaze	50
4.2.3	Aktivnost enzima katalaze.....	52
4.2.4	Aktivnost enzima glutacion-S-transferaze	54
4.2.5	Aktivnost enzima GPx	56
4.2.6	Aktivnost enzima GR	58
4.2.7	Koncentracija 8-hidroksi-2-deoksiguanozina	60
4.3	Kanonijska diskriminantna analiza.....	62
5	DISKUSIJA.....	66
5.1	Lipidna peroksidacija	69
5.2	Antioksidativni enzimi	71
5.2.1	Superoksid dismutaza (SOD)	72
5.2.2	Katalaza (CAT)	77
5.2.3	Sistem glutaciona	79
5.3	Razdvajanje grupa pacijentkinja kao posebnih klastera	82
5.4	8-OHdG	82
5.5	Potencijalni prediktivni značaj markera oksidativnog stresa na relaps bolesti	86
6	ZAKLJUČAK	89
7	REFERENCE	91

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Marija Jelić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Branislava Srđenović Čonić, vanredni profesor Prof. dr Aljoša Mandić, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Ispitivanje 8-hidroksi-2-deoksiguanozina, produkata lipidne peroksidacije i aktivnosti antioksidativnih enzima kod prekanceroznih lezija i u karcinomu grlića materice
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	<u>srp.</u> / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Vojvodina, Srbija
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja / 109 stranica / 5 slika / 18 grafikona / 20 tabela / 187 referenci
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmacija, Toksikološka hemija

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	oksidativni stres; antioksidansi; lipidna peroksidacija; tumorski biomarkeri; neoplazme grlića materice; stadijum neoplazmi; lokalna rekurencija tumora; prognoza
UDK	618.146-006.03/.04-074:577 543.48+543.544.3
Čuva se: ČU	Univerzitet u Novom Sadu, Biblioteka Medicinskog fakulteta, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Vojvodina, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>U organizmu se, pod fiziološkim uslovima, produkuju slobodni radikali. Iako se u organizmu nalaze u veoma niskoj koncentraciji, slobodni radikali mogu ispoljiti toksične efekte. Težeći da spare elektrone, u hemijskoj reakciji oksidacije, dolazi do brzog i nepredvidivog vezivanja za susedne molekule, proteine, lipide, ugljene hidrate i nukleinske kiseline od kojih su sačinjeni strukturni elementi ćelije, pokrećući unutrašnji put apoptoze. Antioksidansi su supstance koje sprečavaju ili značajno smanjuju oksidaciju biomolekula. Oksidativni stres je stanje koje nastaje kada produkcija slobodnih radikala premaši kapacitete antioksidativnih enzima da ih neutrališu. U antioksidativne enzime spadaju: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST). Lipidna peroksidacija (LP) je proces oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina od strane slobodnih radikala. Malondialdehid predstavlja biohemijski marker pomoću kog je moguće meriti stepen oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana. Oksidativna modifikacija DNK dovodi do promene strukture DNK koje rezultuju genetskim oštećenjima. Najčešće korišćen marker oksidativnog stresa je urinarni 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG). Oštećenja proteina, lipida, DNK čine važan osnov mnogih oboljenja kao što su ateroskleroza, neurodegenerativna oboljenja, dijabetes, gojaznost, proces starenja, retinopatija, hronične inflamatorne bolesti i karcinom. Polazeći od hipoteze da su ovi biomolekuli različiti u različitim stadijumima bolesti, oni bi mogli predstavljati prognostički marker proširenosti bolesti.</p> <p>Cilj istraživanja je bio da se ispita da li postoje razlike između kontrolne grupe (zdravih žena), pacijentkinja sa prekanceroznim lezijama na grliću materice (HSIL), pacijentkinja sa lokalno ograničenim (FIGO Ia-Ib) i pacijentkinja sa lokalno uznapredovalim karcinomom grlića materice (IIa-IV) u pokazateljima oštećenja DNK (određivanjem vrednosti 8-OHdG), pokazateljima oksidativnog stresa (određivanjem intenziteta lipidne peroksidacije (TBARS)), pokazateljima antioksidativne odbrane (određivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation</p>

peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR) i glutation-S-transferaze (GST)). Pored toga, cilj istraživanja je bio da se uporede vrednosti 8-OHdG, proizvoda lipidne peroksidacije (TBARS) i aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GST, GPx, GR) unutar grupe pacijentkinja sa lokalno ograničenim karcinomom grlića materice podeljenih u dve podgrupe sa niskim i visokim rizikom u odnosu na relaps bolesti. Takođe, u radu je koreliran nivo 8-OHdG, MDA i antioksidativnih enzima sa relapsom bolesti.

Istraživanje je izvedeno na Klinici za operativnu onkologiju, odeljenje za ginekologiju na Institutu za onkologiju Vojvodine, Zavodu za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika Novi Sad u periodu od 2013. godine do 2017. godine. Od ispitanica su prikupljeni uzorci krvi i urina, pripremljeni na adekvatan način i čuvani na -80° do analiza. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite, kao i intenzitet lipidne peroksidacije određivani su spektrofotometrijskim metodama, a koncentracija 8-OHdG određivana je gasnom hromatografijom uz masenu detekciju. Za sprovođenje istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog odbora Instituta za onkologiju Vojvodine.

Pokazano je da postoje statistički značajne razlike između kontrolne grupe (zdravih žena), pacijentkinja saprekanceroznim lezijama na grliću materice (HSIL), pacijentkinja sa lokalno ograničenim (FIGO Ia-Ib) u odnosu napacijentkinje sa lokalno uznapredovalim karcinomom grlića materice (IIa-IV) u pokazateljima oštećenja DNK (koncentracija 8-OHdG), pokazateljima oksidativnog stresa (intenziteta lipidne peroksidacije (TBARS)), pokazateljima antioksidativne odbrane (aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, CAT i GST). Nisu pokazane razlike između ispitivanih grupa u aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR). Nisu pronađene razlike u koncentraciji 8-OHdG, proizvoda lipidne peroksidacije (TBARS) i aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GST, GPx i GR) unutar grupe pacijentkinja sa lokalno ograničenim karcinomom grlića materice podeljenih u dve podgrupe sa niskim i visokim rizikom u odnosu na relaps bolesti. Aktivnosti CAT i GST bile najbolji prediktori rekurencije bolesti kod definisanih pacijentkinja. Na osnovu aktivnosti ova dva oksidativna enzima, separacija grupe pacijentkinja kod kojih nije došlo do rekurencije bolesti nakon perioda praćenja od ostale dve grupe kod kojih je došlo do rekurencije bolesti je bila moguća.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da je moguće koristiti navedene biomarkere kao dijagnostičke markere kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice. Ovi biomolekuli mogu pomoći lakšem svrstavanju pacijentkinja u određene grupe prema stadijumu bolesti, a sledstveno i bržem odabiru

	odgovarajućeg lečenja. Pored toga, pokazano je da su aktivnosti enzima CAT i GST prediktori rekurencije bolesti kod definisanih grupa pacijentkinja.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	12.7.2018.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	Predsednik: Član: Član: Član: Član:

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Marija Jelić
Mentor: MN	Prof. dr Branislava Srđenović Čonić, MPharm, PhD, Associate Professor Prof. dr Aljoša Mandić, MD, PhD, Associate Professor
Title: TI	Analysis of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, lipid peroxidation products and activity of antioxidative enzymes in precancerous lesions and in cervical cancer
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Physical description: PD	7 chapters / 109 pages / 5 pictures / 18 graphs / 20 tables / 187 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pharmacy, Toxicological chemistry
Subject, Key words	Oxidative Stress; Antioxidants; Lipid Peroxidation;

SKW	Biomarkers, Tumor; Uterine Cervical Neoplasms; Neoplasm Staging; Neoplasm Recurrence, Local; Prognosis
UC	618.146-006.03/.04-074:577 543.48+543.544.3
Holding data: HD	University of Novi Sad, Library of the Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Vojvodina, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>Free radicals are produced in our body under physiological conditions. Although in very low concentrations, they can show some toxic effects. While trying to bind electrons, in the chemical reaction of oxidation, they rapidly and unpredictably bind to adjacent molecules- proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids from which the structural elements of the cell are made, triggering the internal pathway of apoptosis. Antioxidants are substances that prevent or significantly reduce the oxidation of biomolecules. Oxidative stress is a condition that occurs when the production of free radicals exceeds the capacity of antioxidant enzymes to neutralize them. The antioxidant enzymes include: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and glutathione-S-transferase (GST). Lipid Peroxidation (LP) is the process of oxidation of polyunsaturated fatty acids by free radicals. Malondialdehyde is a biochemical marker by which it is possible to measure the degree of oxidative damage of cell membranes. The oxidative modification of DNA leads to a change in DNA structure that results in genetic damage. The most commonly used marker of oxidative stress is urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG). The damage to proteins, lipids and DNA is an important basis for many diseases such as atherosclerosis, neurodegenerative diseases, diabetes, obesity, aging, retinopathy, chronic inflammatory disease and cancer. Starting from the hypothesis that these biomolecules are different at different stages of the disease, they could represent a prognostic marker of the progression of the disease.</p> <p>The aim of the study was to examine whether there were differences between the control group (healthy women), the patients with precancerous lesions on the cervix (HSIL), the patients with early stage cervical cancer (FIGO Ia-Ib) and the patient with locally advanced cervical cancer (IIa - IV) in the indicators of DNA damage (determining the value of 8-OHdG), indicators of oxidative stress (by determining the lipid peroxidation intensity (TBARS)), indicators of antioxidant defense (by determining the activity of antioxidative enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase GPx), glutathione reductase (GR), and glutathione-S-transferase (GST)). In addition, the aim of the study was to compare the values of 8-</p>

OHdG, lipid peroxidation products (TBARS) and the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GST, GPx, GR) within the group of patients with early stage cervical cancer divided into two subgroups- with low and high risk in relation to the relapse of the disease.

The research was performed at the Clinic for operative oncology, Department of Gynecology at the Institute of Oncology of Vojvodina, Medical Faculty in Novi Sad, Department of Pharmacy and the Institute for Health Care of Novi Sad in the period from 2013 to 2017. Samples of blood and urine of the patients were collected, prepared adequately and stored at -80 ° until the analysis. The activity of the antioxidant enzymes as well as the lipid peroxidation were determined by spectrophotometric methods, and the concentration of 8-OHdG was determined by gas chromatography with mass detection. The approval of the Ethical Committee of the Institute for Oncology of Vojvodina was obtained before conducting the research.

It has been shown that there are statistically significant differences between the control group (healthy women), patient with precancerous cervical lesions (HSIL), the patients with early stage cervical cancer (FIGO Ia-Ib) compared to a group of patients with locally advanced cervical cancer (IIa-IV) in indicators of damage to DNA (concentration of 8-OHdG), indicators of oxidative stress (lipid peroxidation (TBARS)), indicators of antioxidant defense (activities of antioxidant enzymes SOD, CAT and GST). There was no difference between the groups in activity of glutathione peroxidase enzyme (GPx) and glutathione reductase (GR). There were no differences in the concentration of 8-OHdG, lipid peroxidation products (TBARS) and the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GST, GPx and GR) within the group of patients with locally restricted cervical cancer divided into two subgroups with low and high risk in relation on relapses of the disease. CAT and GST activities were the best predictors of disease recurrence among defined groups. Based on the activities of these two oxidative enzymes, the separation of the group of patients who did not experience disease recurrence after a follow-up period from the other two groups in which recurrence of the disease occurred was possible.

Based on the obtained results it is concluded that it is possible to use the studied biomarkers as diagnostic markers in patients with cervical cancer. These biomolecules can help in the patient's classification into certain groups according to the stage of the disease, and consequently the more efficient choice of appropriate treatment. In addition, CAT and GST enzyme activity have been shown to be predictors of disease recurrence in defined patient groups.

Accepted on Senate on: AS	July 12, 2018
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: Member: Member: Member: Member:

Zahvaljujem se najboljim mentorima koje sam mogla imati, vredelo ih je tri godine tražiti...

Prof. dr Branislavi Srđenović Čonić neizmerno hvala na konstantnoj podršci, konstruktivnim idejama, satima i danima provedenim u laboratoriji uz mene, dodatnom paru ruku, sprovedenim merenjima aktivnosti antioksidativnih enzima i nivoa lipidne peroksidacije, dragocenim savetima tokom čitavog procesa, uvek spremnim odgovorima na svako moje pitanje, postavljeno u bilo koje doba. Hvala joj na svemu što me je naučila, na pozitivnom stavu, upornosti i veri i kada je ja nisam imala.

Prof. dr Aljoši Mandiću zahvaljujem se na podsticaju, idejama, neprekidnoj podršci na klinici, medicinskom znanju iz oblasti karcinoma grlića materice koje mi je poklonio, na način da ostane zauvek zapamćeno. Hvala na sugestijama na radovima, vedrom duhu, nadi, i nesebičnom gestu da pomogne u nabavci reagensa. Oboma mentorima zahvaljujem što su vrhunsku stručnost i veštine iz svojih oblasti prihvatili da podele sa mnom. Imala sam privilegiju da budem vaš učenik.

Izuzetnu zahvalnost dugujem Prof. dr Biljani Božin što je obezbedila reagense i time omogućila sprovođenje ovog istraživanja. Nebojši Kladaru, hvala na pomoći prilikom pisanja radova i statističke obrade podataka.

Doktoru Janu Suđiju, zahvaljujem se na korisnim savetima, ukazanoj pomoći i uloženom vremenu i trudu za merenja vezana za 8-OHdG, za kog je ekspert.

Zahvaljujem se dalje medicinskim sestrama sa Odseka za brahiterapiju i Odeljenju za ginekologiju Instituta za onkologiju Vojvodine na pomoći pri prikupljanju uzoraka od pacijentkinja. Veliko hvala osoblju Laboratorije za hematologiju, na čelu sa Miodragom Trajkovićem i Dejanom Dobrićem, koji su mi bez izuzetka pružali pomoć u prikupljanju uzoraka i merenjima izvršenim u laboratoriji.

Hvala dragim koleginicama iz apoteke jer su me bodrile i verovala u mene.

Dubravki Striber Devaja, hvala što je usmeravala moj karijerni put.

Ogromno hvala kolegi, a pre svega prijatelju, dr Slobodanu Maričiću što mi je olakšao čitav proces izrade ove disertacije, kako konstantnom praktičnom pomoći, tako i prijateljskom podrškom, savetima, slušanjem i razumevanjem.

Hvala mojoj porodici bez koje bi sve ovo bilo nemoguće.

Disertaciju posvećujem Diki, mami i tati.

1 UVOD

1.1 REAKTIVNE KISEONIČNE VRSTE I OKSIDATIVNI STRES

U metaboličkim procesima aerobnih organizama odvija se konverzija organskih supstrata u hemijsku energiju, uz korišćenje kiseonika. Najveća količina energije stvara se u ćelijama koje sadrže mitohondrije, u procesu tkivnog disanja tj. oksidativnoj fosforilaciji. Evolutivno, aerobni organizmi su, razvijajući mehanizme korišćenja kiseonika, paralelno razvijali mehanizme zaštite od njegove toksičnosti. Toksičnost kiseonika proizilazi iz njegovog prelaska u slobodne radikale. Ovaj proces se dešava u katalizovanim reakcijama uz pomoć oksidaza i oksigenaza, transferom elektrona na molekularni kiseonik (1).

U organizmu se, pod fiziološkim uslovima, produkuju slobodni radikali. Najveći deo kiseonika nastalog metaboličkim procesima ćelija, redukuje se do vode ili transformiše uz pomoć enzima. Od preostalog, malog dela kiseonika nastaju reaktivne kiseonične vrste (*eng. reactive oxygen species-ROS*) (2). Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli sa pozitivnim, negativnim ili neutralnim nabojem, ali mogu nastati i pucanjem kovalentnih veza. Slobodni radikali su uglavnom organske supstance, mada mogu biti i neorganskog porekla. Osim reaktivnih kiseoničnih, za biološke sisteme značajne su i reaktivne vrste azota (*eng. reactive nitrogen species-RNS*) (3).

Iako se u organizmu nalaze u veoma niskoj koncentraciji, slobodni radikali mogu ispoljiti toksične efekte. Oni nastaju iz stabilnih neradikala, gubljenjem ili primanjem jednog elektrona. Ovo je faza inicijacije. Glavna karakteristika slobodnih radikala je da sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, što je uzrok njihove visoke nestabilnosti i reaktivnosti, pri čemu je specifičnost za reaktante niska. Težeći da spare elektrone, u hemijskoj reakciji oksidacije, dolazi do brzog i nepredvidivog vezivanja za susedne molekule, proteine, lipide, ugljene hidrate i nukleinske kiseline od kojih su sačinjeni strukturni elementi ćelije, pokrećući unutrašnji put apoptoze (1). Stvaranjem novih hemijskih veza, oslobađa se energija i par prelazi u niže energetske stanje. Pored kovalentne veze koja nastaje spajanjem slobodnih radikala može doći i do sledećih reakcija: davanje elektrona (sa redukujućeg agensa), primanje elektrona (na oksidujućem agensu), oduzimanje vodonika i reakcija adicije. Prečnik

difuzije slobodnih radikala je vrlo mali i poluživot u biološkim sastavima svega nekoliko mikrosekundi. Nakon sparivanja elektrona, ostaje novi molekul sa nesparenim elektronom, i tako nastaje niz lančanih reakcija. To je faza propagacije (4). U fazi terminacije štetno dejstvo slobodnih radikala okončava se njihovom neutralizacijom pomoću neenzimskih ili enzimskih antioksidanasa (5).

Kada produkcija slobodnih radikala premaši kapacitete antioksidativnih enzima da ih neutrališu, nastaje stanje koje se naziva oksidativni stres. Balans između oksidativnih i prooksidativnih reakcija, može se poremetiti kako zbog povećane produkcije slobodnih radikala tako i zbog istrošenosti antioksidantnog sistema zaštite ili neuspešne popravke oštećenja (6). Tokom oksidativnog stresa dolazi do ozbiljnog remećenja metabolizma ćelije, uključujući prekid DNK lanca, povećanje intracelularnog slobodnog Ca^{2+} , oštećenja membranskih jonskih transportera i/ili drugih specifičnih proteina i lipidne peroksidacije, koji posledično može dovesti do ćelijske smrti bilo mehanizmom apoptoze ili nekroze (7, 8).

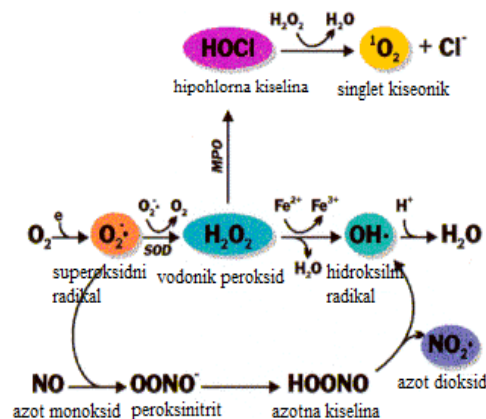
Neki od ćelijskih izvora ROS su: respiratorni lanac u mitohondrijama, leukociti, makrofagi, koji sadrže enzimski kompleks (NADPH oksidaze) vezan za membranu, beta-oksidacija masnih kiselina u peroksizomima, katabolizam ksenobiotika putem enzimskog sistema citohroma P450 (npr. monooksigenaze u endoplazmatskom retikulumu), lipooksigenaze i ciklooksigenaze čijim delovanjem dolazi do formiranja prostanoida i superoksidnog anjona, ksantin oksidaze koje konvertuju purinske baze u mokraćnu kiselinu, koristeći kiseonik kao akceptor elektrona, pri čemu nastaje superoksidni anjon (3). Egzogenim izvorima ROS smatraju se: jonizujuće i UV zračenje, kontaminirani vazduh, ksenobiotici, lekovi, alkohol, ekstremne temperature, pesticidi, biotoksini, teški metali, stres, povećan fizički napor i ultrazvuk (5, 9).

Imajući u vidu da je nastanak ROS deo fizioloških funkcija u organizmu, određen nivo oksidativnog stresa prisutan je i kod zdravih osoba. Reaktivne kiseonične vrste imaju i pozitivne efekte u organizmu. Do patofizioloških poremećaja može doći ne samo usled prevelike produkcije već i zbog nedovoljnog formiranja slobodnih radikala. Reaktivne kiseonične vrste učestvuju u odbrani organizma od infekcija. Veoma reaktivan superoksid anjon radikal učestvuje u stvaranju vodonik peroksida, koji dalje ispoljava svoje antimikrobno dejstvo posredujući u enzimskom formiranju prostaglandina, leukotriena i drugih biološki aktivnih molekula (1, 5). U procesima inflamacije oni uništavaju invazivne patogene agense. Makrofazi i neutrofili, privučeni od strane aktiviranih T limfocita i IL-2, proizvode veliku količinu superoksidnog anjona, koji zajedno sa ostalim ROS uništava bakterije. U kontaktu sa

patogenom, u fagocitima se dešava respiratorni prasak, kojeg karakteriše povećana potrošnja kiseonika i stvaranje ROS uz aktivaciju NAD(P)H oksidaze (3). Još jedna od pozitivnih funkcija slobodnih radikala je i prenos signala. To je proces koji podrazumeva prenošenje informacija iz ćelijskog okruženja u njenu unutrašnjost pod dejstvom neurotransmitera, hormona, faktora rasta, citokina kao inicijatora i ROS u ovom kontekstu imaju ulogu sekundarnih glasnika u ćeliji. ROS učestvuju u funkcionisanju regulatornih mehanizama i signalnim putevima unutar ćelije. Kontrolišu nivo ventilacije, relaksaciju mišića i imunološke funkcije (3).

Reaktivne kiseonične vrste aktiviraju protein kinaze i transkripcione faktore NF- κ B i AP-1, koji dovode do ekspresije određenih gena, koji aktiviraju imuni sistem, učestvuju u ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji, reparaciji i apoptozi. Regulacija transkripcionih faktora je redoks zavisna (10).

U reaktivne kiseonične vrste spadaju: superoksidni anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), perhidroksilni radikal (HO_2^{\cdot}), vodonik peroksid (H_2O_2), alkoksi radikal (RO^{\cdot}), peroksi radikal (ROO^{\cdot}), organski hidroperoksid ($ROOH$) (2). Na slici 1. dat je prikaz slobodnih kiseoničnih i azotnih radikala.



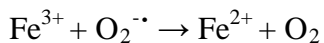
Slika 1. Prikaz reaktivnih kiseoničnih i azotnih radikala

1.1.1 Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$)

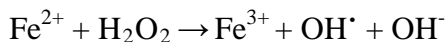
Protonovana forma superoksid anjon radikala je HO_2^{\cdot} . Može nastati redukcijom molekuskog kiseonika ili oksidacijom vodonik peroksida. S obzirom da je superoksid anjon radikal najviše i najčešće produkovana vrsta slobodnog radikala u živim organizmima, on se uglavnom nalazi na samom početku kaskade oksidativnog stresa u ćelijama. Nastaje u

velikom broju enzimskih reakcija, kao što su reakcije ksantin oksidaze, aldehid oksidaze, dehidroorotat dehidrogenaze, NADPH-citohrom C reduktaze, hidroksilaze i fagocitoze (5). U toku procesa fagocitoze u leukocitima se stvara 16 puta više superoksid anjon radikala u odnosu na količinu stvorenu u ćelijama u mirovanju. S obzirom da je molekularni kiseonik rastvorljiviji u organskim rastvaračima nego u vodi, velika količina stvorenog superoksid anjon radikala potiče iz unutrašnjosti hidrofobne ćelijske membrane. Nadalje izaziva oštećenje fosfolipida ćelijske membrane, raskidajući estarske veze između masnih kiselina i glicerola (10). Superoksid anjon radikal je češće redukciono nego oksidaciono sredstvo. U kiseloj sredini reakcija dismutacije teče spontano, dok se u baznoj ili neutralnoj sredini dešava sporo, tako da se *in vivo* superoksid anjon radikal uklanja uz pomoć enzima superoksid dismutaze (5).

Toksičnost $O_2^{\cdot -}$ se najvećim delom zasniva na učešću u Haber-Weissovoj reakciji.



U drugom koraku Haber Weissove reakcije, Fentonovoj reakciji katalizovanoj metalima sa promenljivom valencom (gvožđe, bakar), u reakciji sa vodonikom peroksidom, dolazi do stvaranja hidroksi radikala (3).

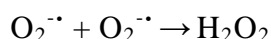
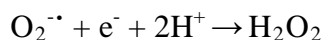
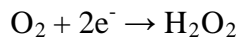


Superoksid anjon radikal učestvuje u reakcionom mehanizmu indolamindioksigenaze, biosintezi prostaglandina kao i u procesu fagocitoze. Uprkos značajnoj ulozi u odbrani od infekcija, $O_2^{\cdot -}$ u prevelikoj koncentraciji može dovesti do oštećenja tkiva. Dokazano je da povećana koncentracija $O_2^{\cdot -}$ dovodi i do oštećenja DNK i do procesa lipidne peroksidacije (11).

Superoksidni anjon radikal je važna karika u intraćelijskoj signalnoj kaskadi. Značajna je njegova uloga u inflamatornim procesima, u smislu: aktivacije inflamazoma, regulaciji sinteze inflamatornih citokina i mehanizmima urođenog imuniteta. Superoksidni anjon radikal aktivira NADPH-oksidadu putem aktivacije protein kinaze C, što sugeriše da on reguliše produkciju ćelijskih ROS usled inflamacije. NADPH-oksidade regulišu važne ćelijske procese kao što su ćelijska migracija, diferencijacija i proliferacija (3).

1.1.2 Vodonič peroksid (H_2O_2)

Vodonič peroksid nastaje dvoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, redukcijom superoksid anjon radikala ili dismutacijom superoksid anjon radikala u prisustvu SOD (2).



Vodonič peroksid nema nesparenih elektrona pa je zato najstabilniji slobodni radikal, tj. najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. S obzirom da ne poseduje nesparen elektron, ne može se ni smatrati slobodnim radikalom u pravom smislu (12). Može da prolazi kroz ćelijske membrane i difunduje unutar ćelije. Njegova sposobnost da slobodno difunduje kroz ćelijske membrane omogućava mu da svoje toksične efekte ispoljava daleko od mesta nastanka ROS. H_2O_2 je sekundarni glasnik koji lako difunduje kroz ćelijsku membranu putem akvaporina (13).

Nastaje najviše u peroksizomima, ali i u mitohondrijama, mikrozomima i ćelijskoj membrani. Najveće količine H_2O_2 nastaju u reakcijama oksidaza. Njegovu aktivnost inhibiše enzim katalaza, pa je efekat vodonič peroksida obrnuto srazmeran koncentraciji katalaze u datom ćelijskom kompartmanu (5). Takođe, enzim glutation peroksidaza (GPx) razlaže vodonič peroksid. Indirektno, SOD može sprečiti aktivnost H_2O_2 . Uklanjajući $\text{O}_2^{\cdot -}$ onemogućava Haber-Weissov reakciju i stvaranje H_2O_2 (8).

U zavisnosti od pH sredine, koncentracije supstrata i parcijalnog pritiska kiseonika, enzimi tipa oksidaze produkuju istovremeno superoksid anjon radikal i vodonič peroksid. Vodonič peroksid štetna dejstva ispoljava kroz direktnu i indirektnu hemijsku aktivnost. Direktno, zahvaljujući svojim oksidacionim svojstvima, vrši degradaciju hem proteina, oslobađanje gvožđa, inaktivaciju enzima, oksidaciju DNK, lipida, sulfhidrilnih grupa i ketokiselina. Međutim, to se dešava kada je koncentracija vodonič peroksida 4 puta veća od koncentracije prisutne u *in vivo* uslovima (5). Najverovatnije je zbog toga toksičnost vodonič peroksida zapravo posledica njegovog indirektnog delovanja. On se udružuje sa superoksid anjon radikalom u prisustvu metala sa promenljivom valencom (gvožđe, bakar, mangan) u Haber-Weissovoj reakciji i tada nastaje veoma toksičan hidroksilni radikal (1). S obzirom da ima sposobnost da prodire u jedro, H_2O_2 u ćelijama može da izazove oštećenje DNK, sledstveno dovodeći do mutageneze i karcinogeneze. Takođe, dovodi do oštećenja ćelijske

membrane i mobilisanja kalcijuma iz ćelijskih depoa, nakon čega se aktiviraju kalcijum zavisne proteaze i nukleaze (14).

Tretiranje ćelija sa H_2O_2 povećava njihovu proliferaciju, što implicira da H_2O_2 direktno interferira sa ćelijskim putevima koji regulišu proliferaciju. Pokazano je takođe, da prekomerna ekspresija katalaze suprimira vaskularnim endotelnim faktorom rasta (VEGF)-indukovanu ćelijsku migraciju, sugerišući dalje ulogu H_2O_2 u regulaciji ćelijske migracije (3). Neke studije pokazuju da H_2O_2 može izazvati ćelijsku rezistenciju na apoptozu, pojačanu angiogenezu, invazivni karcinom i kada se nalazi izvan ćelije, oštećenja u udaljenim kompartmanima-metastazu karcinoma. Važna uloga H_2O_2 u procesu karcinogeneze zasnovana je na činjenicama da ćelije karcinoma imaju povećan nivo H_2O_2 koji može indukovati maligne transformacije kao i da u uslovima povećane koncentracije enzima koji ga uklanjaju može da dođe do reverzije maligno transformisanih ćelija. Međutim, postoje i podaci koji ukazuju na to da povećana koncentracija H_2O_2 može efikasno ubijati karcinomske ćelije (15).

1.1.3 Hidroksilni radikal (OH^\bullet)

Hidroksilni radikal je hemijski najreaktivniji slobodni radikal. Već je navedeno da se toksičnost $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 najvećim delom zasniva na njihovoj sposobnosti da u fiziološkim uslovima generišu hidroksil radikal (OH^\bullet). Hidroksil radikal nastaje primanjem tri elektrona, tj. nepotpunom redukcijom molekuskog kiseonika. Najodgovorniji je za citotoksične efekte kiseonika. Ima izuzetno kratko poluvreme života, što znači da brzo reaguje sa biomolekulima pored sebe. Oštećuje purinske i pirimidinske baze DNK, kao i sve molekule koji se nađu na udaljenosti od nekoliko nanometara, bilo da su šećeri, lipidi ili aminokiseline. Nakon toga dovodi do stvaranja lančanih reakcija. Hidroksilni radikal najčešće nastaje pod uticajem jonizujućeg zračenja. Voda, koja čini najveći deo ćelije, upija to zračenje, pri čemu se raskidaju kovalentne veze između kiseonika i vodonika i nastaje vodonik radikal i hidroksilni radikal. Vezujući se za molekule masnih kiselina, dovodi do procesa lipidne peroksidacije. U ovom procesu samo jedan hidroksilni radikal može izmeniti nekoliko stotina lanaca masnih kiselina u lipidne hidroperokside, pri čemu nastaju još reaktivniji produkti koji kao sekundarni radikali oštećuju nadalje ćelijske membrane, proteine, receptore i enzime. Hidroksilni radikal se stvara u procesu fagocitoze, kao i kad god postoje uslovi za Haber-Weissov i Fentonovu reakciju. Imajući u vidu da ne postoje specifični mehanizmi kojima se ovaj radikal uklanja iz

organizma, ulogu preuzimaju mehanizmi kojima se sprečava njegov nastanak. Ti mehanizmi obuhvataju sprečavanje dismutacije $O_2^{\cdot-}$, razlaganje H_2O_2 do vode i vezivanje jona gvožđa i bakra (2, 5). U tom smislu njegovo toksično dejstvo inhibiraju katalaza, helatori gvožđa i SOD (16).

1.1.4 Singlet kiseonik (1O_2)

Singlet kiseonik nije u pravom smislu radikal. Apсорbuje zračenje usled čega biva ekscitiran i kao takav, u dve orbitale sadrži po jedan nespareni elektron, te je veoma reaktivan. Singlet kiseonik nastaje u velikom broju enzimskih i neenzimskih reakcija, u kojima se formiraju holesterol, sekosterol aldehyd i ozon. Prekomerna produkcija ovih oksidanasa igra važnu ulogu u patogenezi fizioloških poremećaja kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, fotostarenje kože i pojedine vrste karcinoma. Kao visoko elektrofilni molekul, on reaguje sa nezasićenim masnim kiselinama, aminokiselinskim ostacima bogatim elektronima. Do ekscitacije molekuskog kiseonika dolazi kada se biološki pigmenti (hlorofil, retinol, flavini ili porfirini) izlože svetlosti. S obzirom na to, u *in vivo* uslovima naročito su oči i koža podložni oštećenjima singlet kiseonikom. Tokom akutne infekcije, kao deo procesa za uništenje bakterija, aktivisani neutrofilni produkuju singlet kiseonik (17, 18).

1.2 ANTIOKSIDATIVNI ENZIMI

Antioksidansi su supstance koje sprečavaju ili značajno smanjuju oksidaciju biomolekula. Nalaze se u organizmu u manjoj koncentraciji u odnosu na supstrat koji oksidišu i održavaju integritet genoma i normalnu fiziološku funkciju ćelije. Idealan antioksidans je onaj koji smanjuje nivo ROS, istovremeno dozvoljavajući njihove korisne uloge, kao što su ćelijska signalizacija i redoks regulacija (19).

Prema načinu delovanja, antioksidansi se mogu podeliti na:

- Preventivne koji sprečavaju nastanak slobodnih radikala

Izolovani molekul oksihemoglobina u eritrocitima za koji je kiseonik vezan u toku svog transporta, sprečava da kiseonik dođe u kontakt sa redukujućim supstancama iz krvi, čija bi autooksidacija dovela do stvaranja slobodnih radikala. Isto deluju i proteini feritin, transferin, ceruloplazmin i metalotionein, koji helirajući metalne jone sprečavaju njihovo ulaženje u Fentonovu reakciju (8).

- Skevendžer koji hvataju slobodne radikale i odnose ih.

To su mali molekuli: vitamin C, vitamin E, ubikinon-10, urat i glutation (5).

- Reparacione koji obnavljaju ili uklanjaju već oštećene biomolekule (9).

U reparaciji oštećenih biomolekula važnu ulogu imaju fosfolipid zavisna glutation peroksidaza, fosfolipaza A2, glikozilaze, DNK-ligaze i DNK-polimeraze (20).

Prema prirodi, antioksidansi se dele na:

- Enzimske koji predstavljaju prvu liniju odbrane.

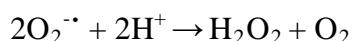
U antioksidativne enzime spadaju: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST). Oni razlažu i uklanjaju slobodne radikale. Konvertuju štetne oksidativne produkte do vodonik peroksida a zatim do vode, u višestepenom procesu u prisustvu kofaktora kao što su bakar, cink, mangan i gvožđe.

- Neenzimske koji predstavljaju sekundarnu liniju odbrane.

Oni prekidaju slobodno radikalske lančane reakcije. Tu spadaju: endogeni produkti ćelije, hranljive egzogene materije i sintetički produkti: vitamin C i E, beta karoten, glutation, albumin, metalotionein, transferin, urati, bilirubin, ceruloplazmin, karnozin, taurin, mokraćna kiselina, estrogeni, dihidrolipoinna kiselina, kreatinin, koenzim Q10, poliamini, flavonoidi, nestreoidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), kalcijumski blokatori, alopurinol, deferoksamin, N-acetilcistein i inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE). Neenzimski se dalje mogu podeliti na liposolubilne i hidrosolubilne, čime je predodređeno mesto njihovog delovanja. Liposolubilni (npr. vitamin E, karotenoidi, lipoinna kiselina) deluju u unutrašnjosti membrane, a hidrosolubilni (npr. vitamin C) u ćelijskim tečnostima kao što je citosol (5, 9).

1.2.1 Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza igra glavnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Ona katalizuje reakciju dismutacije visoko reaktivnog superoksid anjon radikala, uz nastanak manje reaktivnog H_2O_2 i molekularnog kiseonika, pri čemu se jedan molekul $O_2^{\cdot -}$ oksidiše u O_2 a drugi redukuje do H_2O_2 (21).

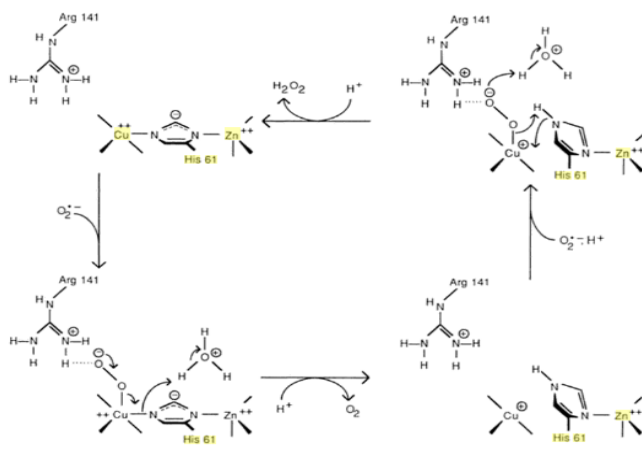


Nastali vodonik peroksid se pod dejstvom katalaze u lizozomima i glutathion peroksidaze u mitohondrijama razlaže do vode i molekularnog kiseonika, čime se konačno sprečavaju oksidativna oštećenja ćelije (21).

SOD je metaloprotein koji postoji u tri izoforme (2). Princip reakcije je isti za sve forme. Prelazni metal se nalazi u aktivnom centru i on je katalizator u reakciji razlaganja superoksid anjona. Zahvaljujući jonima metala monomerne subjedinice su stabilne i pravilno uvijene. Takođe, oni su odgovorni i za hidrofobne interakcije koje su neophodne kako bi se stvorila dimerna struktura enzima. Izoforme SOD se međusobno razlikuju po molekulskoj masi, prelaznom metalu koji sadrže u aktivnom centru, lokalizaciji, mehanizmima regulacije i ulozi koju imaju u specifičnim fiziološkim i patološkim procesima (22). Superoksid dismutaza je primarni enzim u intracelularnom antioksidativnom sistemu zaštite i kompenzatorno povećava svoju aktivnost, kada se prekomerno povećava produkcija superoksidnog anjona. On se veoma često koristi kao parametar antioksidativnog kapaciteta (16).

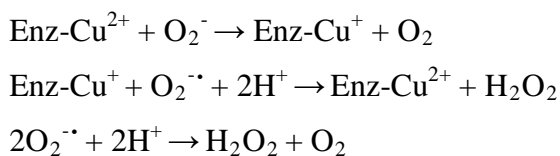
Cu, Zn SOD (SOD1) forma se najvećim delom nalazi u citosolu i manje u jedru, endoplazmatičnom retikulumu, mitohondrijama i lipozomima (23). Ovaj enzim se nalazi u svim tkivima, plazmi, eritrocitima i veliku aktivnost pokazuje u mozgu, jetri, bubrezima, srcu i nadbubrežnoj žlezdi. Predstavlja homodimer, sastavljen iz dve podjedinice, svaka sadrži po jedan atom cinka i bakra. Aktivno mesto ovog enzima je jon bakra i on je odgovoran za katalitičku aktivnost ovog enzima, dok cink stabilizuje njegovu prostornu konformaciju. Ova izoforma ima dvostruku ulogu u antioksidativnoj zaštiti: osim što uklanja $O_2^{\cdot-}$, ćelijski je pufer za jone bakra (8).

Proces dismutacije je omogućen redukcijom i zatim reoksidacijom bakra u aktivnom centru enzima i odvija se u nekoliko koraka: prvo, molekul $O_2^{\cdot-}$ se vezuje za Cu(II) u aktivnom centru oksidovane forme enzima, predaje mu jedan elektron pri čemu se oslobađa O_2 . Sledeći molekul $O_2^{\cdot-}$ koji dospe do katalitičkog centra prima jedan elektron od Cu(I), jedan proton od N atoma imidazolnog prstena His 61 i formira $HO_2^{\cdot-}$.

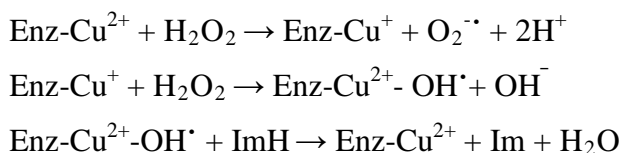


Slika 2. Šematski prikaz oksido-redukcionog puta Cu, ZnSOD (24)

Istovremeno, Cu(I) reoksiduje u Cu(II), a veza između Cu i His 61 se ponovo formira. Adicijom H⁺ iz molekula vode, oslobođeni HO₂⁻ se protonuje do H₂O₂. Ovim je jedan katalitički ciklus završen i enzim se ponovo nalazi u početnoj, oksidovanoj formi (8).



U reakciji sa vodonik peroksidom Cu/Zn SOD biva inaktivisana pri čemu je brzina inaktivacije veća pri višim vrednostima pH. Najpre se dešava redukcija Cu²⁺ u Cu⁺ vodonik peroksidom, potom reakcija Cu⁺ sa H₂O₂ i nastajanje OH[•] koji dovodi do oksidacije i razgradnje rezidua histidina neophodnih za katalitičku aktivnost (8).



Studije pokazuju da su mnoge neurodegenerativne bolesti povezane sa promenama funkcije ovog enzima, od kojih je najbolje je proučena amiotrofična lateralna skleroza (ALS). Uticaj ovog enzima na rast i rezistenciju karcinogenih ćelija dokazan je studijama u kojima je on bio indukovao raznim tipovima stresa, radijacijom i lekovima (23).

Druga izoforma, *Mn SOD*, koja sadrži mangan, mitohondrijalni je protein. Slično kao i prethodno opisana forma, prisutna je u jetri, bubregu, nadbubrežnoj žlezdi i srcu. Nema je u eritrocitima. Važnu ulogu igra u diferencijaciji ćelije i genezi tumora. Brojne studije pokazale su uticaj ovog enzima pri nastanku i razvoju mnogih bolesti kao što su: dijabetes tipa II, hipertenzija, poremećaji raspoloženja, Alchajmerova bolest, hronične inflamacije i starenje (16).

Ekstracelularna izoforma (EC SOD) poslednja je otkrivena, nalazi se u plazmi, limfi, sinovijalnoj, cerebrospinalnoj tečnosti, likvoru i ascitesu. U aktivnom centru enzima su Cu i Zn. Ova izoforma nalazi se u tkivima kao što su krvni sudovi, pluća, uterus i tiroidna žlezda (23). U ovim tkivima aktivnost ekstracelularne forme može prevazilaziti aktivnosti CuZn-SOD i Mn-SOD. Pokazano je da aktivnost ovog enzima zavisi od količine cinka unetog hranom (8). Patofiziološki procesi sa kojima se povezuje ekspresija ove izoforme su inflamacija, ateroskleroza, hipertenzija, dijabetes, infarkt miokarda, reumatoidni artritis, različiti neurološki poremećaji i memorijske funkcije (23).

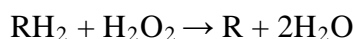
Gvožđe SOD (Fe-SOD) četvrta izoforma superoksid dismutaze. Ova izoforma prisutna je uglavnom kod prokariotskih organizama.

1.2.2 Katalaza (CAT)

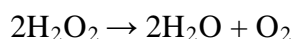
Enzim katalaza katalizuje razgradnju nastalog H_2O_2 do H_2O čime je onemogućeno njegovo prodiranje u druge delove ćelije. Za razliku od enzima glutacion peroksidaze, katalaza razgrađuje vodonik peroksid bez utroška nikotin-amid-adenin dinukleotida (NADPH) što predstavlja energetski efikasniji način uklanjanja datog supstrata (25).

S obzirom da i katalaza i glutacion peroksidaza razgrađuju H_2O_2 efikasniji će biti onaj enzim čija je K_m vrednost (Michaelis-Menten-ova konstanta) za H_2O_2 manja. Naime, pri niskim koncentracijama H_2O_2 i normalnim vrednostima koncentracije redukovano glutationa (GSH), glutacion peroksidaza će biti aktivnija (19).

Enzim katalaza u svom aktivnom centru sadrži gvožđe i po strukturi pripada hemohromoproteidima. Pri niskim vrednostima H_2O_2 , koristeći različite donore vodonika, alkohole i askorbinsku kiselinu, pokazuje peroksidaznu reakciju.



Kada su vrednosti H_2O_2 visoke, uklanja H_2O_2 kroz katalaznu reakciju:



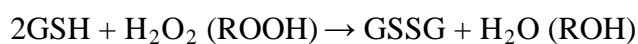
Obe reakcije započinju stvaranjem kompleksa između katalaze i vodonik peroksida. U peroksidaznom tipu reakcije, donori vodonika ili elektrona su razna organska i neorganska jedinjenja, a u katalaznom tipu reakcije donor vodonika je drugi molekul vodonik peroksida. Kao produkt peroksidazne reakcije nastaje nativni enzim, oksidisani kosupstrat i voda, dok u katalaznoj reakciji nastaju voda i molekulski kiseonik, tako da enzimska aktivnost katalaze raste linearno sa porastom koncentracije supstrata, tj. bez obzira na koncentraciju H_2O_2 , katalaza njime ne može da bude saturisana (26).

Ovo je najrasprostranjeniji enzim u prirodi, nalazi se u najvećem broju aerobnih organizama, ali i u anaerobnim bakterijama. Kod sisara se nalazi u svim tkivima. Ipak, najveća aktivnost je u eritrocitima i jetri. Takođe, dokazana je aktivnost ovog enzima u mozgu, srcu, skeletnim mišićima i slezini (27). Unutar ćelija on se nalazi u peroksizomima, gde se javlja u slobodnoj formi i vezan za membranu, i u mitohondrijama. U eritrocitima se skoro celokupna količina ovog enzima nalazi u citosolu (26).

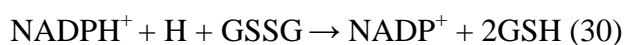
Što se tiče učesća katalaze u nastanku i razvoju bolesti, pokazano je da ovaj enzim ima važnu ulogu u molekulskim mehanizmima inflamacije, mutageneze, apoptoze, i tumorogeneze. Njena izmenjena aktivnost dokazana je i u dijabetesu, regenerišućim tkivima, Down-ovom sindromu, hiponutricionom statusu, hemolitičkim anemijama, oštećenjima jetre, pankreatitisu, distrofiji mišića i neonatalnoj sepsi (16).

1.2.3 Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza je selenocistein-zavisni protein. Selen je aktivni centar enzima. Nalazi se na samoj površini enzima, te je pristupačan za vezivanje sa supstratom, što omogućava veliku brzinu reakcije enzima (28). Enzim se nalazi u mitohondrijama, citosolu, peroksizomima i intermembranskom prostoru, u skoro svim ćelijama. Redukuje H_2O_2 u vodu i hidroperokside masnih kiselina do alkohola uz glutacion kao kofaktor (13, 29).



Regeneraciju redukovanog glutaciona vrši nadalje glutacion reduktaza



Za aktivnost glutathion peroksidaza od ključnog značaja su raspoloživost selena za sintezu enzima, dovoljna koncentracija glutathiona, aktivnost enzima glutathion reduktaze i količina NADPH (31).

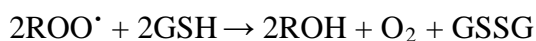
Imajući u vidu da GPx razlaže vodonik peroksid koji može u prisustvu metala da inicira proces lipidne peroksidacije, ovaj enzim ima značajnu ulogu u sprečavanju faze inicijacije lipidne peroksidacije (30).

Fosfolipidni hidroperoksidi ćelijske membrane ne podležu direktnoj redukciji od strane GPx. Oslobođanje masnokiselinskog hidroperoksida sa drugog C-atoma glicerofosfolipida vrši se pod dejstvom fosfolipaze A₂, a oslobođeni hidroperoksid zatim podleže delovanju GPx (32).

Postoje tri izoforme glutathion peroksidaze: selen zavisna, selen nezavisna (ima manji afinitet za H₂O₂ i zahteva više kiseonika) i fosfolipid-zavisna glutathion peroksidaza (za razliku od klasične GPx redukuje membranske fosfolipidne hidroperoksidge bez prethodnog delovanja fosfolipaze A₂ i prekida lipidnu peroksidaciju) (29).

Osnovna fiziološka razlika između ovih izoformi je ta što selen-zavisne mogu da katalizuju redukciju i organskih i neorganskih supstrata, dok selen-nezavisne izoforme redukuju isključivo organske peroksidge do njihovih hidroksi derivata (33).

Fosfolipid-zavisna glutathion peroksidaza učestvuje u procesu dvoelektronske redukcije lipidnih hidroperoksidge do odgovarajućeg alkohola masne kiseline, koja se iseca delovanjem fosfolipaze A₂, a nastali lizofosfolipid se vezivanjem novog acil ostatka prevodi u fosfolipid (34).



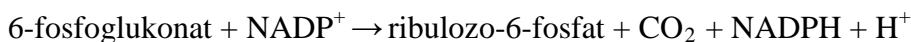
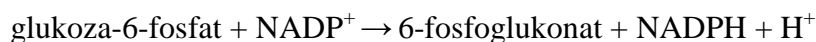
Fosfolipid-zavisna glutathion peroksidaza ima važnu ulogu u testisima, jer učestvuje u zaštiti genetskog materijala, a potencijalno i u diferencijaciji ćelija prilikom sazrevanja spermatozoida. Nedostatak ovog enzima direktno je povezan sa hemolitičkom anemijom (35, 36).

1.2.4 Glutathion reduktaza (GR)

Glutathion reduktaza se nalazi u mitohondrijama i citosolu, pripada familiji NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) zavisnih oksidoreduktaza i prisutna je u mnogim prokariotskim i eukariotskim organizmima. Esencijalna je za stabilnost i integritet ćelije jer prevodi oksidovani glutathion (GSSG) u redukovani (GSH) koji se zatim koristi kao donor

jona vodonika za enzim glutation-peroksidazu tokom procesa eliminacije vodonik peroksida. Visok odnos GSH/GSSG je esencijalan za zaštitu od oksidativnog stresa (37, 38).

NADPH koji je potreban za delovanje GR se u tkivima životinja obezbeđuje oksidativnim pentozofosfatnim putem. GR ubrzava pentozofosfatni put, jer NADPH nastaje u prvoj reakciji ovog metaboličkog puta, delovanjem enzima glukozo-6-fosfat dehidrogenaze i u drugoj reakciji delovanjem 6-fosfoglukonat dehidrogenaze (39):

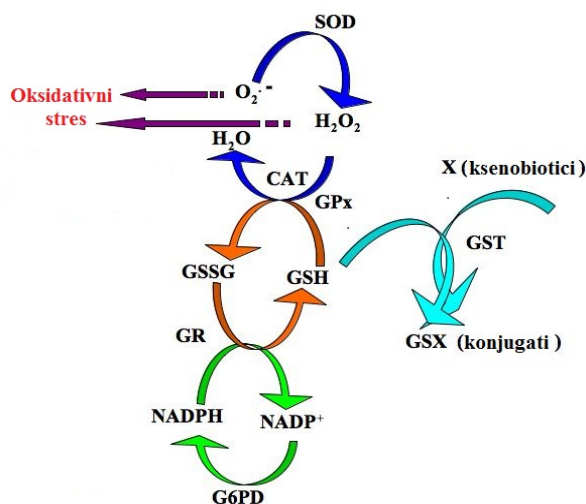


1.2.5 Glutation-S-transferaza (GST)

Glutation transferaza je grupa izoenzima koji se strukturno i funkcionalno razlikuju. Pretežno se nalaze u jetri, plućima, bubrezima, eritrocitima, leukocitima, testisima i placenti. Nalaze se i u citosolu i vezani za membranu (40). Izoenzimi se međusobno razlikuju prema specifičnostima za odgovarajući supstrat, imunološkim svojstvima, molekularnoj masi i izoelektričnim tačkama. Zajedničko im je da pokazuju nisku specifičnost za supstrat sa elektrofilnim grupama, a visoku za nukleofilne kao što je GSH. Katališući konjugaciju redukovano glutationa preko sulfhidrilnih grupa, sa elektrofilnim centrima različitih supstrata, karcinogenima i toksinima (antitumorski lekovi, herbicidi, pesticide, lekovi) ali i endogenim elektrofilnim produktima oksidativnog stresa (DNK, lipidne hidroperokside) ostvaruje svoju osnovnu, detoksikacionu ulogu. Identifikovano je najmanje 100 hemijskih supstanci koje deluju kao induktori GST, što predstavlja adaptivni mehanizam na hemijski stres uzrokovan stvaranjem elektrofila. Nivo ekspresije GST je ključni faktor koji određuje osetljivost ćelije na toksične agense. *In vivo* nivo aktivnosti GST regulisan je i stvaranjem ROS, i jedan od najjačih induktora ovog enzima su upravo slobodni radikali nastali u redoks ciklusu (41).

Formiranjem konjugata nastaju hidrofilni metaboliti koji se mogu izlučiti iz organizma i na taj način ovaj enzim vrši detoksikaciju (42). Povećana aktivnost GST javlja se u slučajevima povećanog oksidativnog stresa jer dati enzim u ćeliji uklanja nastale toksične karbonilne, peroksidne i epoksidne proizvode. Ovo je važna uloga u procesu karcinogeneze jer mogu inhibirati inicijaciju i napredovanje tumora, imati zaštitnu ulogu u toku razvoja tumorskih ćelija i njihova ekspresija može porasti u toku maligne progresije. Koncentracija GST raste i kod različitih oboljenja jetre. Pored detoksikacione imaju ulogu i u transportu i

sintezi određenih jedinjenja. Vezuje steroide, metabolite i lekove, a učestvuje u sintezi leukotrijena i prostaglandina (43).



Slika 3. Mehanizam dejstva antioksidativnih enzima

1.3 OKSIDATIVNA MODIFIKACIJA BIOMOLEKULA

1.3.1 Oksidativna modifikacija lipida

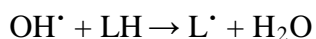
Lipidna peroksidacija (LP) je proces oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina (naročito arahidonske i dokosaheksaenolne) od strane slobodnih radikala. Lipidi su estri viših masnih kiselina i glicerola. Oni u organizmu imaju važne uloge: energetske, ulaze u sastav nervnog tkiva i ćelijske membrane, termički su i električni provodnici. Svi molekuli koji sadrže lipide mogu biti potencijalne mete slobodnih radikala (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol u ćelijskim membranama). ROS prvenstveno napadaju fosfolipide ćelijskih membrana, čime se smanjuje njihova hidrofobnost. To dalje dovodi do alteracije afiniteta i interakcije sa proteinima, a time i do promena u brojnim funkcijama proteina u membrani (endocitoza, fagocitoza, transport materija i prenos signala) (5). Generalno, dolazi do poremećene homeostaze ćelije. Oštećenje plazma membrane ometa jonski gradijent: ulazak Na^+ i vode u ćeliju dovodi do njenog oticanja (što je jedna od najčešćih promena u patologiji tkiva sisara). Takođe, nekroza tkiva je povezana sa ulaskom ekstracelularnog kalcijuma. Poremećaj homeostaze Ca^{2+} dovodi do brze degradacije ćelija kroz: dalji porast produkcije

ROS, abnormalne funkcije citoskeletnih komponenti i abnormalne aktivacije Ca^{2+} -zavisnih proteaza, kao što su kalpaini, kaspaze i proteazomi (6).

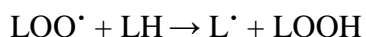
U fiziološkim uslovima ovaj proces reguliše propustljivost ćelijske membrane, metabolizam lipida i proteina, kontroliše sintezu eikozanoida, ćelijsku proliferaciju i apoptozu. Međutim, kada se poremeti ravnoteža između prooksidativnih i antioksidativnih agenasa ovaj proces postaje toksičan. U velikom broju bolesti odvija se proces lipidne peroksidacije, a naročito je intenzivan u aterogenezi i karcinogenezi, gde je on zapravo jedan od osnovnih uzroka bolesti. U toku ovog procesa, nastaju visokoreaktivni intermedijerni produkti, alkil radikali, konjugovani dieni, alkoksi radikali i lipidni hidroperoksidi, a njihovom razgradnjom sekundarni produkti: isparljivi ugljovodonici, aldehidi i krajnji produkt malondialdehid (MDA). Malondialdehid predstavlja biohemijski marker pomoću kog je moguće meriti stepen oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana (44).

Hidroksilni radikal najčešće započinje lipidnu peroksidaciju, a zatim nizom lančanih reakcija dolazi do stvaranja lipidnih hidroperoksida i aldehida (3). Nagomilavanjem hidroperoksida u ćelijskoj membrani i membranama organela, aktivnost enzima, transportera, receptora, biva izmenjena. To dalje dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrednosti membranskog potencijala, promene permeabilnosti membrane prema H^+ i drugim jonima, izmenjenog metabolizma ćelije pa je moguća ruptura ćelije i ispuštanje njenog sadržaja i sledstveno, njene smrti (8).

U fazi *inicijacije* ROS (OH^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} i RO_2^{\cdot}) izdvajaju atom vodonika iz metilenske grupe polinezasićenih masnih kiselina (polyunsaturated fatty acid - PUFA) i nastaje slobodni lipidni radikal.

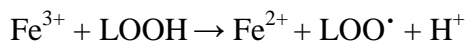
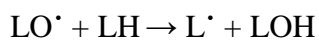
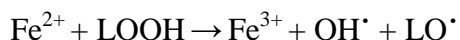


Radi dalje stabilizacije, intramolekulski se raspoređuju dvogube veze i formiraju se konjugovani dieni. Tokom faze *propagacije* u aerobnim uslovima ovi dieni mogu da reaguju sa kiseonikom stvarajući peroksi radikale LOO^{\cdot} koji dalje mogu eliminisati H^{\cdot} iz drugog organskog molekula, uključujući PUFA, pri čemu dolazi do formiranja lipidnih hidroperoksida, LOOH (uključujući i ciklične peroksidi), odnosno reaktivnih ugljenikovih radikala koji nastavljaju reakciju slobodno radikalskim mehanizmom.



LOOH dalje može da reaguje sa redukovanim metalima Fe^{2+} i oksidovanim metalima Fe^{3+} kada nastaju, redom, alkoksi radikal (LO^{\cdot}) koji reaguje sa drugim lipidom i nastaje L^{\cdot} i

lipidni aldehid (LOH) i LOO^\bullet . Sada ti novonastali lipidni radikali dovode do daljih lančanih reakcija.



U fazi *terminacije* dolazi do nakupljanja kratkolančanih konačnih produkata peroksidacije (aldehida, ketona, ugljovodonika i epoksida) kao i aktivnih radikala. Mnogi od ovih aldehida su biološki aktivne materije, koje mogu da difunduju od primarnog mesta oštećenja i prošire oštećenje do ostalih delova ćelije (5, 8, 45).

1.3.2 Oksidativna modifikacija DNK

Oksidativna modifikacija DNK dovodi do promene strukture DNK koje rezultuju genetskim oštećenjima. ROS mogu da reaguju sa svim komponentama DNK molekula (purinske i pirimidinske baze, dezoksiribozna osnova) i tako dovedu do različitih oštećenja DNK (jednolančani ili dvolančani prekidi, unakrsna povezivanja u okviru jednog ili oba lanca DNK, kao i unakrsna povezivanja DNK i proteina, pucanja prstena, modifikacija purinskih i pirimidinskih baza i dezoksiriboze, delecija i translokacija). Kao posledice tih oštećenja dolazi do grešaka u translaciji, inhibiciji sinteze proteina, mutacija i karcinogeneze. Pogotovo je mitohondrijska DNK podložna navedenim promenama jer nije zaštićena histonima, za razliku od DNK u jedru, a pri tom se nalazi u okruženju koje je glavni izvor ROS. Oksidativna modifikacija je najizraženija u prisustvu metala sa promenljivom valencom jer tada kao produkt reakcije oksidacije nastaje najpotentniji OH^\bullet (5). Oksidativnoj modifikaciji (u ovom slučaju 8-hidroksilaciji) najviše podležu baze, a najniži oksidativni potencijal ima guanin, pa je on i najčešća meta ROS napada. Adicija OH^\bullet na guanin odvija se brzo i nastali 8-hidroksideoksiguanozin se smatra indikatorom oksidativnog oštećenja mitohondrijalne i jedarne DNK (8).

Prilikom ove modifikacije dolazi do transverzije nukleinskih baza, GC-TA, koja je česta somatska mutacija humanih karcinoma. Zamena guanozin-citozin par u timin-adenin par dešava se nakon dva replikaciona ciklusa. Ovo dovodi do sprečavanja indukcije transkripcije, grešaka u replikaciji i genomske nestabilnosti i sledstveno, mutageneze, karcinogeneze i starenja. Izmenjeni DNK molekuli mogu da se koriste kao biomarkeri oksidativnog stresa. S obzirom da oksidovane DNK molekule podležu reparaciji, popravljani produkti oksidativnih

DNK lezija, slabo su rastvorni u vodi tako da se ekskretuju urinom bez daljeg metabolisanja. Upravo je zbog toga najčešće korišćen marker oksidativnog stresa, urinarni 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG). Ekskrecija ovog markera u urinu predstavlja prosečan nivo oštećenja u čitavom organizmu, dok je nivo oksidovanih baza u jedarnoj DNK merilo oštećenja samo u specifičnom tkivu ili ćeliji u trenutku uzorkovanja (8).

Povećanje 8-OHdG dokazano je kod mnogih vrsta karcinoma, što govori u prilog tome da učestvuje u njegovoj etiologiji (46). Takođe, njegovo povećanje registrovano je kod pušenja, alkohola i izlaganja zagađivačima iz spoljašnje sredine (47, 48).

Efekti slobodnih radikala na DNK se ispoljavaju trenutno ili odloženo. Može doći do prekida lanca, interakcija DNK azotnih baza unutar jedne spirale ili između dve spirale, oštećenja na proteinskim vezama i modifikacije baze. Postoji preko 100 različitih DNK proizvoda nastalih reakcijom između slobodnih radikala i nukleozida. Neki od njih su: 5,6-dihidrocitozin, 4,6-diamino-5-formamidopirimidin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, 8-hidroksiadenin, 8-hidroksiguanin i 8-hidroksideoksiguanozin (49). Oksidativna modifikacija je najizraženija u prisustvu metala sa promenljivom valencom jer tada kao produkt reakcije oksidacije nastaje najpotentniji OH^{\bullet} . Adicija OH^{\bullet} na guanin odvija se veoma brzo i nastali 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) se smatra indikatorom oksidativnog oštećenja DNK. Trajno oksidativno oštećenje DNK predstavlja prvi korak u mutagenezi, karcinogenezi i starenju (50).

Visoke koncentracije 8-OHdG su utvrđene kod neurodegenerativnih, malignih i hroničnih inflamatornih oboljenja (51, 52). Oštećenje DNK je uključeno u sve stadijume karcinogeneze, te je stoga svaki agens koji ima sposobnost da hemijski modifikuje DNK u ćelijama potencijalni karcinogen. Kao što je na početku ove doktorske disertacije opisano, slobodne kiseonične vrste koje se formiraju u ćeliji mogu da izmene ćelijske komponente uključujući i DNK. Tumorske ćelije imaju sposobnost da proizvode velike količine H_2O_2 . Tretman humanih ćelija sa H_2O_2 dovodi do modifikacije DNK baza. H_2O_2 je prekursor OH^{\bullet} . On jeste manje reaktivan, ali je difuzibilan i verovatnije je da je on uključen u formaciju oksidovanih baza. Hidroksil radikal napada lance DNK kada nastane pored ćelijske ili mitohondrijalne DNK uzrokujući stvaranje novih radikala, što vodi čitavoj generaciji oksidacionih produkata. Interakcija OH^{\bullet} sa nukleinskim bazama u lancu DNK vodi formiranju C8-hidroksiguanina ili njegove nukleozidne forme 8-OH2dG. Viši nivoi indukovanih DNK lezija podržavaju hipotezu da su slobodno radikalske reakcije intenzivnije u malignim ćelijama. Često se postavlja pitanje da li su DNK lezije uzrok ili posledica bolesti.

Nakon tretmana laboratorijskih životinja karcinogenim agensima, dolazi do formiranja lezija pirimidinskih i purinskih baza DNK u ciljnim organima i pre pojave tumora. Neke od lezija imaju mutageni potencijal. Podaci stoga ukazuju na važnu ulogu lezija DNK u karcinogenezi. Sa druge strane, u potpuno razvijenom karcinomu povećan nivo lezije DNK može doprineti genomskoj nestabilnosti i metastatskom potencijalu tumorskih ćelija (53, 54).

Od svih purinskih i pirimidinskih baza, guanin je najpodložniji oksidaciji. Oksidacijom dolazi do adicije hidroksilne grupe na poziciju 8 guaninskog molekula i nastaje oksidativno modifikovani produkt 8-OHdG koji je najčešća forma ROS indukovanih lezija DNK. Postoje dva mehanizma formiranja 8-OHdG u ćelijskom DNK: 1) direktna interakcija ROS sa guaninom u poziciji 8 i 2) oksidacija nukleotida u ćelijskom "pool"-u tokom DNK replikacije. Procenjeno je da se u normalnim ćelijama dnevno formira oko 200 8-OHdG genomskih lezija DNK putem ta dva mehanizma. Te DNK lezije rezultuju mutagenozom specifičnom za mesto i produkuju G→T transverzije koje su široko rasprostranjene u mutiranim onkogenima i tumor supresorskim genima. Oksidovana guaninska rezidua 8-oxoguanin, prema dva modela, može da se upari sa citozinom i sa adeninom. Ovo drugo, dovodi do G:C→T:A transverzija u humanim ćelijama (55, 56, 50).

Deficijencija u popravci nukleotidnih ekscizija dovodi do niskog nivoa popravke 8-OHdG i visoke frekvencije nastanka G:C→T:A transverzija na mestu lezija. Dodatno, ove lezije su česte u humanim karcinomima i posebno preovladavaju u mutacionom spektru tumor supresorskog gena p53. Upravo ovaj podatak ističe značaj 8-OHdG kao endogenog mutagena i njegovu verovatnu ulogu u procesu karcinogeneze. Da bi ćelije preživele, postoje multipli enzimski sistemi popravke da posreduju i uklone/poprave oksidativnu modifikaciju DNK. Oksidativno oštećenje koje izbegne trenutnu popravku i ostane u DNK izgleda da je dovoljno da značajno doprinese stepenu mutacija *in vivo* (56, 57, 58).

Ćelijski odbrambeni sistem protiv 8-OHdG mutageneze uključuje popravku ekscizija baza, popravku nukleotidnih ekscizija, mismatch-ovanja i prevenciju inkorporacije. Popravka ekscizije baze putem DNK glikozilaze (hOGG1) predstavlja glavni mehanizam zaštite integriteta humane DNK u kontekstu 8-OHdG. Aktivnost hOGG1 je odgovorna za eksciziju 8-oksoguanina. Postoje studije koje pokazuju da inaktivacija hOGG1 igra ulogu u multistepenom procesu karcinogeneze. Ovaj gen je lociran na delu hromozoma za koji je često primećeno da nedostaje u raznim tipovima karcinoma. Gubitak hOGG1 predstavlja povećan rizik mutagenosti ćelije zbog poremećene ravnoteže između oksidativnog

opterećenja i akumulacije 8-OHdG u DNK. U zdravim humanim ćelijama stopa oksidacije iznosi 300-1000 guaninskih baza po ćeliji, na dan (20, 59, 60, 61, 62).

Formiranje 8-OHdG u DNK se često meri u serumu, leukocitima i urinu, kako bi se procenio oksidativni stres kod ljudi. Viši nivoi su detektovani kod pušača, kao i kod ljudi koji su sekundarno izloženi dimu. U metaboličkom sindromu, dijabetesu i inflamatornim bolestima oksidativni stres i 8-OHdG u krvi i urinu su povećani (55). Generalno je prihvaćeno da se 8-OHdG, koji nastaje tokom reparacije oksidativno oštećenih ćelijskih DNK, ekskretuje urinom bez daljeg metabolisanja i da je uticaj ishrane na nivo izlučenog 8-OHdG zanemarljiv (63). Iako neke hemijske supstance u urinu, ishrana, vežbanje, hormonski status i drugi fiziološki uslovi kao i visoke koncentracije uree i neorganskih soli (hloridi, natrijum i kalijum) mogu dovesti do supresije jona u masenoj spektrometriji, u poređenju sa drugim biološkim materijalima kao što su plazma, serum i pljuvačka, urin je preferirani dijagnostički biofluid u kliničkoj praksi jer je sterilan, uzorkovanje je neinvazivno i može se dobiti u velikim količinama. Količina modifikovanih nukleotida koja se ekskretuje urinom smatra se da reprezentuje oksidativno oštećenje u čitavom organizmu (64).

1.4 OKSIDATIVNI STRES I KARCINOGENEZA

Kao što je gore navedeno, slobodni radikali oštećuju sve molekule u ćeliji, narušavaju se međumolekulske veze, smanjuje se fluidnost i propustljivost ćelijske membrane, što dovodi do oštećenja same ćelije i njene smrti. Oštećenja proteina, lipida, DNK čine važan osnov mnogih oboljenja kao što su ateroskleroza, neurodegenerativna oboljenja, dijabetes, gojaznost, proces starenja, retinopatija, hronične inflamatorne bolesti i karcinom (6).

Utvrđeno je da se ćelije karcinoma karakterišu višim nivoima ROS u odnosu na zdrave ćelije i dokazano je da su ROS odgovorni za održavanje tumorskog fenotipa (5).

Očuvanje integriteta gena je osnova za njihovu pravilnu ekspresiju i replikaciju. Kada to nije slučaj, ugrožene su fiziološke aktivnosti ćelije i dolazi do apoptoze i karcinogeneze. U uslovima hroničnog oksidativnog stresa, dugotrajna produkcija ROS može indukovati somatske mutacije i neoplastične transformacije ćelije. Sa produkcijom ROS povezani su karcinom pluća, pankreasa, želuca, jetre, prostate, bešike, dojke i jajnika (13, 65).

Hronični oksidativni stres ima štetne efekte tokom čitavog višestepenog procesa karcinogeneze, uključujući oštećenja DNK, izmenjene popravke DNK, mutacije tumor supresor gena, epigenetske promene, izmenjenu apoptozu, poremećaj signalne transdukcije odgovorne za održavanje normalne ćelijske homeostaze, angiogeneze i metastaze (5). Pokazano je da prekomerna produkcija ROS u karcinomima indukuje razne biološke efekte uključujući povećanu ćelijsku proliferaciju, oštećenje DNK i genetsku nestabilnost, adaptaciju, oštećenje i smrt ćelije, autofagiju i rezistenciju na lekove. Ishod zavisi od genetske podloge karcinoma, tipa ROS koji je uključen i nivoa i trajanja izloženosti ROS (13). Oksidativni stres uključen je u sve tri faze složenog procesa karcinogeneze: inicijaciju, promociju i progresiju. U inicijalnoj fazi ROS dovode do promena u strukturi DNK i genskih mutacija. U narednoj fazi oni blokiraju međućelijsku komunikaciju, modifikuju sisteme sekundarnih glasnika i doprinose abnormalnoj genskoj ekspresiji. To dovodi do povećanja ćelijske proliferacije i do smanjenja apoptoze. U fazi progresije karcinoma izazivaju dodatne promene na DNK u već izmenjenim ćelijama, povećavaju migraciju ćelija tj. dovode do invazivnosti i tumorskih metastaza (66).

Imajući u vidu da je lipidna peroksidacija izvor citotoksičnih produkata, direktno je povezana sa karcinogenezom. Sam proces lipidne peroksidacije iniciraju slobodni radikali, nastali intra- ili ekstracelularno, a koncentracija nastalog produkta malondialdehid (MDA) povećana je u mnogim karcinomima (45). Visoki nivoi MDA nađeni su kod pacijenata sa karcinomom pluća, karcinomom dojke, kolorektalnim karcinomom i karcinomom prostate u poređenju za zdravim kontrolama (67, 68). Povećan nivo MDA dokazan je i u studijama kod laringealnog karcinoma, usne duplje, gastrointestinalnog trakta (46, 69). MDA može reagovati sa slobodnim amino grupama deoksiguanozina, deoksiadenozina i deoksicitidina formirajući alkilovane proizvode tih baza. Ove reakcije pokazuju njegovo mutageno dejstvo koje se najviše uočava na parovima baza guanina i citozina brojnim insercijama i delecijama (46).

Uloga antioksidativnih enzima ne ogleda se samo u njihovoj sposobnosti da sprečavaju oksidativni stres uklanjajući slobodne radikale već i u sposobnosti da menjajući oksidoredukcionu ravnotežu modulišu različite puteve ćelijske signalizacije (70). Na taj način, oni mogu regulisati ćelijski ciklus, inflamaciju, proliferaciju, apoptozu, angiogenezu i invazivnost tumora. Aktivnosti ovih enzima izmenjene su u patološki izmenjenom tkivu u odnosu na zdravo tkivo, u čemu se ogleda njihov značaj kao biomarkera u procesu

karcinogeneze. Da li će nivo enzima tj. njihova aktivnost biti povećana ili smanjena zavisi prvenstveno od vrste tkiva i tipa karcinoma (71).

Dodatna terapija antioksidativnim preparatima kod pacijenata na hemioterapiji može povećati osetljivost tumora na terapiju, smanjiti toksičnost terapije i produžiti život pacijenta, ali je potrebno obazrivo primenjivati ovu vrstu terapije. Pokazano je da efekat terapije zavisi od stadijuma karcinoma. S obzirom da povećani nivoi ROS mogu indukovati apoptozu, administracija antioksidativnih molekula može smanjiti koncentraciju ROS i omogućiti preživljavanje oštećene ćelije i proliferaciju, a u progresivnoj fazi čak stimulisati rast tumora. Neophodno je bolje poznavati molekulske mehanizme delovanja antioksidativnih enzima u zdravim i izmenjenim ćelijama (72, 73).

Iz svega navedenog, jasno je da ispitivanje aktivnosti oksidativnih enzima, koncentracije MDA i nivoa 8-OHdG može u perspektivi imati dijagnostički značaj. Polazeći od hipoteze da su ovi biomolekuli različiti u različitim stadijumima bolesti, oni bi mogli predstavljati prognostički marker proširenosti bolesti. Svi ovi biomolekuli mogu poslužiti kao dobar alat prilikom svrstavanja pacijentkinja u određene grupe prema stadijumu bolesti, a sledstveno i bržem odabiru odgovarajućeg lečenja. Znajući da su ROS karcinogeni, da dovode do mutageneze, promocije i progresije tumora, u budućnosti bi fokus ispitivanja trebao biti na utvrđivanju razlika u aktivnosti antioksidativnih enzima, koncentraciji 8-OHdG i MDA između pacijenata koji se nalaze u različitim stadijumima malignih bolesti na čemu je zasnovano i ovo istraživanje.

1.5 KARCINOM GRLIĆA MATERICE

1.5.1 Epidemiologija i faktori rizika

Karcinom grlića materice se nalazi na četvrtom mestu prema učestalosti oboljevanja među ženama i stopi smrtnosti među ženama na svetu. Godišnje se u svetu registruje 569 847 novoobolelih žena od karcinoma grlića materice. Skoro 90% smrti od karcinoma grlića materice se javlja u nerazvijenim zemljama. Od karcinoma grlića materice umre 311 365 žena u svetu (74). Od ukupno obolelih žena u Evropi, 58 000 je novodijagnostikovanih, a registruje se oko 24 000 smrtnih slučajeva svake godine (75). U Vojvodini godišnje oboli oko 300 žena, dok polovina umre (76). Evidentna je tendencija porasta stope mortaliteta. U Centralnoj Srbiji

karcinom grlića materice nalazi se na četvrtom mestu prema broju novoobolelih među ženama, posle karcinoma dojke, kolona i rektuma, pluća i bronha, a na šestom po broju umrlih žena, posle dojke, pluća i bronha, kolona i rektuma, pankreasa i ovarijuma (77).

Faktori rizika za nastanak karcinoma grlića materice pored infekcije HPV virusom kao najznačajnijeg su: rano stupanje u seksualne odnose, velik broj seksualnih partnera, promiskuitetan partner, nezaštićen odnos, imunodeficijencija, pušenje, drugi infektivni agensi, oralna kontraceptivna sredstva, veliki broj porođaja, godine života, ishrana, korišćenje dietilstilbestrola tokom trudnoće, loš socioekonomski status, cirkumcizija, pozitivna porodična anamneza, etnička pripadnost, genetski faktori i izostanak citoloških pregleda (78).

1.5.2 Grlić materice

Na materici se anatomske razlikuju telo i grlić materice. Vrat materice, grlić materice ili cervix uteri je donji deo tela materice, koji je dugačak 2.5 do 3 cm i spaja se sa vaginom. Granica prelaza između pločastoslojevitog epitela grlića i cilindričnog epitela cerviksa se menja pod uticajem endogenih i egzogenih faktora i dovodi do stvaranja polja zone transformacije (ZT) koja čini povoljno mesto za razvoj prekanceroznih i kanceroznih lezija. Ovo polje ZT u kome se odvija proces metaplazije epitela, pod uticajem perzistentne HPV infekcije naročito visokoonkogenim tipovima, može iz procesa metaplazije da pređe u proces displazije odnosno karcinom (79).

1.5.3 Patološke promene grlića materice

Prema najnovijoj Betezda nomenklaturi, premaligne, displastične lezije podeljene su na dve kategorije: niskog i visokog stepena (*eng. high grade i low grade squamous interepithelial lesions*- HSIL i LSIL).

LSIL je najčešće posledica tranzitorne infekcije koja spontano regredira. Samo oko 16% ovih lezija progredira u leziju višeg stepena, HSIL (80).

HSIL su česte promene sa incidencijom 31 na 100 000 žena, uglavnom dobi između 35-39 godina, mada se zbog promena u seksualnim navikama pomera i ka mlađem dobu. Ove promene su asimptomatske i obuhvataju cervikalne intraepitelne lezije drugog i trećeg stepena (CIN II i CIN III lezije). Nakon što se biopsijom potvrdi postojanje HSIL lezija, terapijski protokol je hirurška intervencija u vidu ekscizionih tehnika u zavisnosti od starosti pacientkinje i tipa ZT. Nelečeni HSIL u oko 15-22% može da progredira u karcinom (81).

Invazivni karcinom

Svetska zdravstvena organizacija invazivne karcinome klasifikuje prema histološkom tipu u nekoliko klasa: skvamozni, glandularni (adenokarcinom) i ostali epitelijalni tumori koji obuhvataju adenoskvamozni karcinom, neuroendokrine tumore i nediferencirane karcinome. Planocelularni podtip čini 70-80% invazivnih karcinoma (75).

Do danas, proučavaju se prognostički faktori karcinoma grlića materice. Najvažniji faktori prognoze su veličina tumora koja se definiše dijametrom tumora, izraženim u dve dimenzije, dubina stromalne invazije kao i limfovaskularna invazija. Najznačajniji nezavisni loši prognostički faktori su prisustvo i broj limfonodalnih metastaza i prisustvo infiltracije parametrija (75).

Infekcija humanim papiloma virusima (HPV) je najzastupljenija genitalna infekcija i najvažniji faktor za razvoj karcinoma grlića materice. U perzistentnoj infekciji i hroničnoj inflamaciji stvaraju se reaktivni molekuli koji oštećuju DNK, proteine i ćelijsku membranu. Ponavljana oštećenja ćelijskog ciklusa dovode do ćelijske proliferacije, i to je u suštini osnovni mehanizam infektivne onkogeneze (81).

Određivanje stepena raširenosti karcinoma grlića materice vrši se na osnovu FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) klasifikacije (2015). Ona se zasniva na kliničkom pregledu u odnosu na veličinu tumora i njegovom proširenju ka karličnim strukturama (75).

Tabela 1. FIGO stadiranje karcinoma grlića materice

FIGO sistem stadiranja, 2015.
Stadijum I
Karcinom je striktno ograničen na grlić (širenje na korpus ne treba da bude uzeto u obzir)
Stadijum IA: Invazivni karcinom koji se može dijagnostikovati samo mikroskopski, sa najdubljom invazijom ≤ 5 mm i najvećim širenjem ≤ 7 mm
Stadijum IA1: Izmerena stromalna invazija od ≤ 3 mm u dubinu i širenje ≤ 7 mm
Stadijum IA2: Izmerena stromalna invazija od > 3 mm, a ≤ 5 mm sa širenjem ne većim od 7 mm
Stadijum IB: Klinički vidljive lezije ograničene na grlić materice ili preklinički karcinom veći od stadijuma IA2
Stadijum IB1: Klinički vidljiva lezija ≤ 4 cm u najvećoj dimenziji

Stadijum IB2: Klinički vidljiva lezija > 4 cm u najvećoj dimenziji
Stadijum II
Karcinom grlića koji vrši invaziju izvan uterusa, ali ne na pelvični zid, niti na donju trećinu vagine
Stadijum IIA: Bez invazije u parametrijum
Stadijum IIA1: Klinički vidljiva lezija ≤ 4 cm u najvećoj dimenziji
Stadijum IIA2: Klinički vidljiva lezija > 4 cm u najvećoj dimenziji
Stadijum IIB: Sa jasnom invazijom parametrija
Stadijum III
Tumor se širi do pelvičnog zida i/ili zahvata donju trećinu vagine i/ili dovodi do hidronefroze ili nefunkcionalnog bubrega
Stadijum IIIA: Tumor zahvata donju trećinu vagine, bez širenja na pelvični zid
Stadijum IIIB: Širenje do pelvičnog zida i/ili hidronefroza ili nefunkcionalni bubreg
Stadijum IV
Karcinom se proširio izvan male karlice i zahvatio je (dokazano biopsijom) mukozu bešike ili rektuma. Bulozni edem sam po sebi ne dozvoljava da se slučaj označi stadijumom IV
Stadijum IVA: Tumor vrši invaziju mokraćne bešike ili rektuma
Stadijum IVB: Širenje tumora na izvan karlice

1.5.4 Terapija

Za rane stadijume (IA1-IIA1) karcinoma grlića materice uglavnom je terapijski modalitet hirurški, od konizacije do radikalne histerektomije, sa pelvičnom limfadenektomijom. Posebnu grupu u današnje vreme čini i podgrupa pacijentkinja sa ranim karcinomom grlića materice kojima se može u okviru terapije ponuditi fertiliti poštedna procedura u okviru onkofertiliteta (81). Radioterapija sa hemioterapijom kao radiopotencijacijom je tretman izbora za lokalno uznapredovali karcinom grlića materice kao i za pacijentkinje u okviru adjuvantne terapije sa pozitivnim limfnim čvorovima i takvim komorbiditetima gde je hirurški tretman kontraindikovano (82).

Hemioterapija pored primene kod hemioiradijacije danas sve više zauzima mesto u lečenju diseminovane bolesti, povrata bolesti ali i u sklopu neoadjuvantne hemioterapije.

1.5.5 Uzajamno dejstvo oksidativnog stresa i HPV u procesu karcinogeneze

Iako je HPV glavni uzročnik koji dovodi do nastanka karcinoma grlića materice, većina HPV infekcija daje subkliničku sliku. Samo mali broj dovodi do ranih epitelnih lezija, a još manji broj lezija kasnije progrediraju do lezija visokog stepena i invazivnog karcinoma. Ta činjenica govori da virusna infekcija, sama po sebi nije dovoljna za razvoj karcinoma. Mehanizam progresije malignih lezija još uvek nije do kraja razjašnjen. Do sada je poznato da virusni faktori, osobine domaćina i njihove međusobne interakcije igraju ulogu u procesu karcinogeneze (83).

Deregulacija ekspresije virusnog genoma i nestabilnost ćelije domaćina igraju ključnu ulogu u virusom-posredovanoj karcinogenezi. Kako bi do toga došlo, neophodna je integracija virusa i epigenetska modifikacija. Virus HPV-a u svom životnom ciklusu ne podrazumeva proces integracije. Pa ipak, visoko rizični HPV-DNK je često integrisan u humani genom u uzorcima tkiva karcinoma grlića materice. Virus HPV za razliku od drugih tipova virusa, kod kojih proteinske integrale olakšavaju njihovu integraciju u genom domaćina, ne kodira ovakav tip proteina. Mesta integracije se nalaze duž čitavog genoma, kao hromozomska fragilna mesta gde prekidi dvostrukog lanca DNK nisu popravljani. Ta oštećenja DNK su izazvana oksidativnim molekulima, ROS i RNS. Pretpostavlja se da je gore opisani događaj početni korak koji se povezuje sa progresijom LSIL u HSIL. Reaktivne kiseonične vrste mogu da dovedu do oksidativnog stresa različitim mehanizmima (84).

Još jedan od poznatih faktora rizika u karcinogenezi i mutagenizi je hronična inflamacija, i sledstveno tome, infekcija (19). Hronična inflamacija dovodi do oštećenja DNK povećavajući ćelijske nivoe ROS i RNS i doprinoseći progresiji LSIL u HSIL. U procesu inflamacije, ROS nastaju iz upalnog mesta i epitelijalnih ćelija. Epitelna tkiva, koja su osnovna meta za HPV infekciju, ozbiljno su izložena svim vrstama oksidativnog stresa. Kroz poremećaj redoks ravnoteže u ćelijama, ROS indukuju aktivaciju nekoliko redoks-senzitivnih transkripcionih faktora, modifikuju ekspresiju gena i moduliraju funkciju redoks senzitivnih proteina (83). Inflamacija doprinosi karcinogenezi dovodeći do oksidativnog stresa, ćelijske proliferacije, invazije i metastaza, inhibišući apoptozu i sekretujući imunosupresore (85). Virusni onkoprotini i inflamatorni citokini dovode do perzistentne infekcije, konstantno izbegavajući imuni sistem što izaziva progresiju lezije i na kraju vodi do maligniteta (86, 87).

ROS i RNS dalje oštećuju DNK, formirajući leziju 8-okso-2-dihidro guanozina koji se smatra mutagenom. U studiji Ohnishi i sar. pokazano je da oksidativno i nitratno oštećenje DNK igra ključnu ulogu u karcinogenezi izazvanoj inflamacijom (65). Kod karcinoma grlića

materice produkti oksidativnog i nitratnog oštećenja DNK ispitivani su kao potencijalni biomarkeri procene rizika kod inflamacijom izazvanih karcinoma (88).

Predloženo je da inflamacija i oksidativni stres mogu biti kofaktori u stimulaciji integracije virusa i deregulacije ćelijskih i virusnih onkogenata u toku progresije karcinoma grlića materice (89).

HPV virus mora indukovati visokoproliferativno stanje da bi ušao u replikacioni ciklus slabo replikujućih epitelnih ćelija domaćina. To postiže uz pomoć onkogenih proteina: E6 i E7. Oni degradiraju p53 i pRB, što se smatra osnovnim mehanizmom kojim HPV onkogeni indukuju genomsku nestabilnost, dopuštajući ćelijama nagomilavanje genomskih promena, i konačno-neoplastično stanje (87, 90).

Postoje dve hipoteze o međusobnom uticaju oksidativnog stresa na HPV-izazvanu karcinogenezu:

- Mutageni potencijal oksidativnog stresa udružen je nespecifično sa transformišućom aktivnošću visokorizične HPV infekcije. Takav “aditivni” mehanizam može imati važne praktične posledice, kao što su kraći period latencije ili veću efikasnost u indukciji karcinoma. Ovde se ne pretpostavlja specifični mehanizam, već forma ko-karcinogeneze.
- Oksidativni stres specifično modulise, aktivira ili suprimira, direktno ili indirektno, jedan ili više HPV-specifičnih molekularnih mehanizama orjentišući virusnu ćeliju ka karcinogeno-transformišućem procesu (91).

1.5.6 Oksidativni stres i HPV infekcija

Oksidativni stres može doprineti procesu cervikalne karcinogeneze u nekoliko nivoa. Pretpostavlja se da su uslovi u ćeliji u početnim stadijumima virusne infekcije (adsorpciji virusa, ulasku virusa i virusne ekspresije) ključni za dalji razvoj infekcije (spontano ozdravljenje, perzistentna infekcija ili neoplastična transformacija). Prvi podaci koji predlažu potencijalno učešće oksidativnog stresa u ranoj fazi infekcije, dobijeni su u opservacionoj studiji u kojoj su identifikovani dodatni uslovi za razvoj karcinoma grlića materice. Rezultati studije su pokazali veoma velike razlike u nastaloj količini ROS i LPO tokom seksualnog odnosa, kao i da ta varijabilnost može doprineti različitim ishodima virusne infekcije (89).

Takođe, u studiji u kojoj je ispitivana korelacija između nivoa klirensa HPV infekcije sa nivoom feritina i transferina pokazano je da je organizam žena sa višim nivoom feritina bio

manje sposoban da se spontano očisti od visokorizične HPV infekcije od organizma žena sa nižim nivoom. Predloženo je da povećan nivo gvožđa, imajući u vidu da je on katalizator u reakcijama nastajanja ROS, povećavajući endogeni nivo ROS, dovodi do smanjenog klirensa HPV infekcije (92).

Polimorfizam gena peroksiredoksina 3 (PRDX3- gen koji je uključen u antioksidativnu aktivnost i kontrolu proliferacije) povezan je sa većom otpornošću HPV virusa i višim rizikom za progresiju. Pokazana je molekularna povezanost redoks stanja organizma sa titrom virusa. Nakon HPV16 infekcije čitavo virusno potomstvo zavisi od redoks gradijenta u tkivu. Nativni virioni koriste redoks gradijent da im olakša aktivnosti u njihovom životnom ciklusu. Virusne partikule mogu da podlegnu redoks zavisnim konformacionim promenama. S obzirom da promene u redoks ravnoteži unutar ćelije utiču na sazrevanje i infektivnost virusnih partikula, rezultati ove studije pokazuju molekularnu povezanost oksidativnog stresa i titra virusa, glavnog faktora koji je odgovoran za perzistenciju infekcije, tako da je ovo prva hipoteza koja pretpostavlja povezanost oksidativnog statusa i perzistentnosti ili progresije lezija (93).

1.5.6.1 Oksidativni stres i virusna replikacija

Karcinom grlića materice izolovan je u 99.7% HPV pozitivnih pacijentkinja, zbog čega je interesantna i relacija između HPV virusa i oksidativnog stresa koji je predmet istraživanja ove doktorske disertacije. Nakon infekcije virusom, dalji koraci u karcinogenezi zavise od efikasnosti i preciznosti replikacije DNK. Oksidativni stres može da utiče na oba, stvarajući uslove za efikasnu integraciju virusa. Oksidativni stres, svojom sposobnošću da ošteti DNK dovodi do amplifikacije virusa (94). Tumor supresor gen p53 ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog odgovora na oštećenje DNK. U istraživanju u kom su koristili sintetički DNK sa oštećenim lezijama 8-okso-7,8-dihidro-2-deoksiguanozina, pokazan je značajan pad u nivou p53 kao i u enzimima koji vrše reparaciju oštećene DNK. P53 poboljšava uklanjanje oksidovanih DNK baza, tako što poboljšava sekvencijalne aktivnosti proteina koji vrše isecanje oštećene lezije, 8-oxoguanin, iz DNK (30). U prisustvu E6 proteina kompromitovane su aktivnosti kojima se vrši popravka DNK i pokazana je akumulacija 8-okso-guanina. Aktivacija oštećenja DNK izazvana oksidativnim stresom u prisustvu HPV potencira aktivnost E1 i E2, virusnih elemenata koji igraju važnu ulogu u DNK replikacionom ciklusu. U prisustvu oštećene DNK, nastavlja se virusna replikacija koja rezultuje u virusnoj ekspanziji i povećanoj produkciji preuređenih i prekinutih duplih lanaca DNK. Uz supresiju

p53, replikuje se oštećena DNK. Tako preuređene virusne kopije udružene sa prekinutim lancima u genomu domaćina, stvaraju uslove za multiple integracije virusa (87).

1.5.6.2 Oksidativni stres i supresija apoptoze u HPV ekspimirajućim ćelijama

Supresija apoptoze je osnovni mehanizam za razvoj karcinoma, jer se na taj način omogućava preživljavanje transformisanih ćelija. HPV-transformisane ćelije ovo postižu zahvaljujući E6 proteinu koji dovodi do proteolitičke degradacije tumor supresora p53. Oksidativni stres dovodi do supresije apoptoze u HPV ekspimirajućim ćelijama, delovanjem azot monoksida (NO^{*}). Azot monoksid je hemijski glasnik koji može imati efekat i na preživljavanje i na indukciju apoptoze. U visokim koncentracijama (u kojima se stvara prilikom npr. aktivacije makrofaga ili neutrofila) on indukuje apoptozu, međutim pri niskim koncentracijama NO^{*} je mutagen i indukuje otpuštanje vaskularnog endotelnog faktora rasta, VEGF, koji doprinosi razvoju angiogeneze što dodatno potpomaže rast tumora. NO^{*} u većini karcinoma ne uspe da dostigne koncentraciju u kojoj bi izazvao apoptozu. Povećan protok krvi dodatno smanjuje koncentraciju NO uklanjajući ga uz pomoć cirkulišućih eritrocita, time potpuno onemogućavajući apoptozu. Kod karcinoma grlića materice i displastičnih lezija, razlog neadekvatnog nivoa NO je nedovoljna ekspresija iNOS (inducibilna NO sintaza) koja se progresivno smanjuje sa histološkom težinom lezija (89).

Još jedna veza između oksidativnog stresa i karcinogeneze je E7 protein. Ovaj onkogen povećava rezistenciju ćelija na H₂O₂- indukovanu ćelijsku smrt. To između ostalog postiže, povećanjem aktivnosti enzima katalaze. Dodatno, sprečava oksidaciju glutation S tranferaze, P1-1 proteina, povećava glutationom posredovanu detoksikaciju od oksidativnog stresa i modifikuje ravnotežu između oksidovane i redukovane forme GSTP1 proteina, sledstveno, inhibiše fosforilaciju i njegovu sposobnost da indukuje apoptozu. Tako da i E6 i E7 proteini, pored svojih onkogenih uloga, obezbeđuju takvo stanje da transformisane ćelije mogu da prežive povećan nivo oksidativnog stresa (89).

1.5.6.3 Ćelijska signalizacija putem oksidativnog stresa i metabolička modulacija HPV transformisanih ćelija

Oksidativni stres ima ulogu i u procesu aktivacije transkripcije virusnih onkogenata. Rana faza transkripcije gena kontrolisana je virusnim proteinom E2 i nizom ćelijskih transkripcionih faktora. Među njima značajnu ulogu ima aktivator protein-1 (AP-1). On pravi komplekse sa transkripcionim faktorima c-Jun, JunB, JunD, FosB, Fra-1 i Fra-2. U maligno transformisanim ćelijama sa visokim nivoom transkripcije E6/E7 proteina, AP-1 kompleks se

sastoji od heterodimera cJun/cFos. Kombinacija u AP-1 kompleksu strogo je zavisna od endogenog nivoa ROS. Kada je nivo ROS nizak, stvara se kompleks cJun/Fra1. Ova kombinacija ima veći afinitet prema virusnoj regulatornoj regiji i sprečava inicijaciju transkripcije te se zbog toga povezuje sa supresijom virusne transkripcije i sniženjem onkogenog potencijala. CJun/Fra1 kompleks se eksprimira u zdravim ćelijskim linijama, a cJun/cFos u onkogenim ćelijskim linijama (89).

Direktna povezanost povećane glikolize u HPV izmenjenim karcinomskim ćelijama i redoks ravnoteže ogleda se u interakciji E7 proteina sa glikolitičkim enzimom M2 piruvat kinazom. To je regulatorni protein koji postoji u dve forme, tetramernoj koja ima visok afinitet i dimernoj koja ima nizak afinitet prema E7 proteinu. Ravnoteža između ove dve forme je regulisana nivoom fruktoza-1,6-bifosfata koja je ključni intermedijer u procesu glikolize. Fizička interakcija sa E7 pomera ravnotežu u korist dimerne forme, dovodeći do supresije oksidativne fosforilacije, uprkos povećanom nivou fruktoza-1,6-bifosfata. Ova supresija rezultuje u smanjenju rezervi glikogena i promeni redoks ravnoteže između NADH i FAD (52). Time se dalje modifikuje aktivnost enzima osetljivih na redoks stanje organizma i sledstveno na ćelijsku proliferaciju, stepen rasta tumora (95).

1.5.6.4 Adaptacija karcinomskih ćelija u uznapredovaloj fazi na oksidativni stres

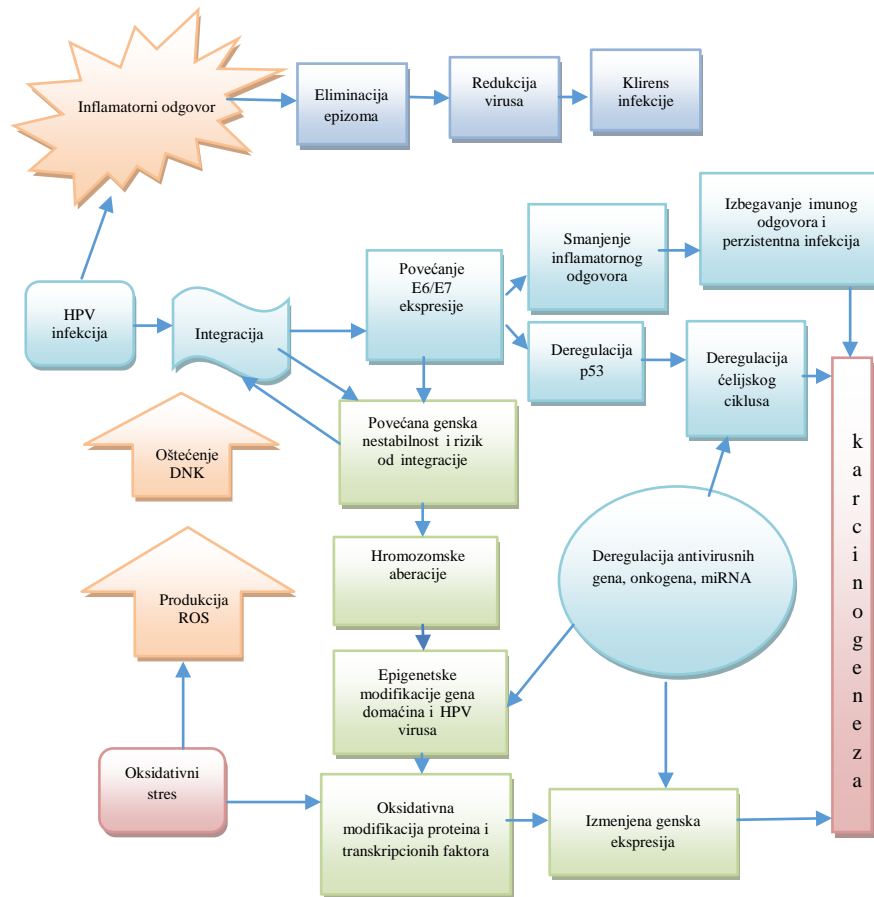
Povećan nivo oksidovanih tiolnih grupa proteina nađen je u uzorcima tkiva sa karcinomom grlića materice u poređenju sa normalnim ili displastičnim tkivom, što govori u prilog tome da su uslovi visokog oksidativnog stresa bili prisutni u karcinomskim ćelijama. Da HPV tumori doživljavaju uslove povećane oksidativne sredine govore u prilog i studije koje su pokazale povećanu koncentraciju DNK lezija u histološkim uzorcima sa karcinomom grlića materice u poređenju sa displastičnim ili normalnim tkivom (96, 97), kao i veliki broj studija koje povezuju aktivaciju ili povećanu ekspresiju antioksidativnih enzima u displastičnim/neoplastičnim ćelijskim linijama ili histološkim lezijama (98, 99, 100). Generalno, oksidativni status pacijenata je predlagan i kao potencijalni indeks efikasnosti lečenja tumora i kao prediktor odgovora na hemio- ili radioterapiju (101, 102).

Postoje i dokazi da oksidativni stres ima ulogu i u progresiji lezija. Rezultati velike kohortne studije na ženama sa HPV-16 cervikalnom infekcijom, pokazali su povezanost pušenja sa povećanim rizikom od progresije lezija do CIN III ili invazivnog karcinoma (83).

Rezultati jedne studije pokazali su obrnuto srazmernu vezu između nivoa antioksidansa alfa tokoferola u plazmi sa rizikom od razvoja CIN (103).

Generalno, veliki broj do sada dobijenih podataka na temu uznapredovalog karcinoma i oksidativnog stresa saglasan je da postoji direktna veza između povećanog oksidativnog stresa i progresije bolesti od blagih displazija do invazivnog karcinoma. Međutim, iako je izuzetno oksidantna tumorska mikrosredina povezana sa progresijom tumora, tumorske ćelije se i same karakterišu veoma dobrom kontrolom ROS i RNS i oksidativnog oštećenja, koju postižu povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima i detoksifikacijom proteina koji potpomažu preživljavanje. Tako da, ovako izmenjen ćelijski metabolizam, veoma oksidativnu tumorsku sredinu pretvara zapravo u pozitivan faktor za adaptaciju tumorskih ćelija (104, 105).

Oksidativni stres i visoko rizični HPV, dva snažna karcinogena, imaju sinergističko delovanje na inicijaciju i promociju karcinogeneze. Indirektni klinički epidemiološki dokazi i biohemijski podaci govore u prilog da virusna infekcija, perzistentna hronična infekcija i virusna integracija jesu zapravo potencirani oksidativnim stresom. I efekti na indukciju apoptoze i na preživljavanje opisuju se u kontekstu zavisnosti od oksidativnog stresa. Ipak, u virusnim displastičnim lezijama, oksidativni stres deluje kao faktor preživljavanja, promovirajući AP-1 posredovanu ekspresiju E6 i E7 proteina, osnažujući njihov apoptotički mehanizam. Antioksidativni enzimi i detoksikujući putevi su konzistentno povezani sa HPV transformisanim ćelijama koje su veoma dobro opremljene da se uklope u visoko oksidantno okruženje (89).



Slika 4. HPV-om izazvana karcinogeneza: molekularni mehanizam interakcije domaćin-virus.

Inicijalni ishod karcinogeneze moduliran je i virusnim i faktorima domaćina (inflamatorni odgovor, oksidativni stres). Inflamatorni odgovor nakon inicijalne infekcije (IFN odgovor) smanjuje epizomalni HPV, što rezultuje klirensom infekcije. Integracija HPV-a inicirana je oštećenjem DNK. IFN-om indukovani klirens HPV-a i sniženje E2 proteina dovodi do selekcije ćelija sa integrisanim HPV genomom koji ekspimiraju viši nivo E6 i E7. Jednom kada su E6 i E7 ekspimirani, IFN odgovor izmenjen, stvara se pogodna sredina za izbegavanje imunog odgovora i perzistentne infekcije. Povećanje E6/E7 povećava gensku nestabilnost i hromozomske preuređivanja koja povećavaju rizik od integracije. Prekomerna ekspresija E6/E7 vodi do deregulacije ćelijskog ciklusa kroz degradaciju p53, deregulaciju onkogeni i ekspresije miRNA. Epigenetske i genetske modifikacije u genomu i virusa i domaćina dovodi do deregulacije E6 i E7 onkogeni i tumor supresorskih gena domaćina što dovodi do karcinogeneze. Oksidativna modifikacija TF (tumor faktora) dovodi do izmenjene genske ekspresije i karcinogeneze (82).

2 CILJEVI RADA

Mehanizam nastanka karcinoma grlića materice je višestepeni proces. Smatra se da benigne i premaligne promene na grliću materice prethodne njegovoj malignoj transformaciji. S obzirom da slobodni radikali i antioksidativni enzimi imaju važnu ulogu kako u fiziološkim procesima reproduktivnih organa, tako i u patogenezi ovog tkiva, poznavanje mehanizama u različitim stadijumima transformacije tkiva cerviksa može doprineti boljem razumevanju molekulskih osnova ove bolesti i pružiti osnov za kreiranje novih strategija u prevenciji, dijagnostici i tretmanu. Na osnovu prethodno izloženih činjenica pretpostavljamo da postoje razlike u vrednostima: 8-OHdG, proizvoda lipidne peroksidacije (TBARS) i aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT, GPx, GR, SOD, GST) između kontrolne grupe (zdravih žena), pacijentkinja sa prekanceroznim lezijama na grliću materice (HSIL), pacijentkinja sa lokalno ograničenim karcinomom grlića materice (FIGO Ia-Ib) i pacijentkinja sa lokalno uznapredovalim karcinomom grlića materice (IIa-IV).

U tom smislu postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati da li postoje razlike između kontrolne grupe (zdravih žena), pacijentkinja sa prekanceroznim lezijama na grliću materice (HSIL), pacijentkinja sa lokalno ograničenim (FIGO Ia-Ib) i pacijentkinja sa lokalno uznapredovalim karcinomom grlića materice (IIa-IV) u sledećem:
 - 1.1. pokazatelji oštećenja DNK
 - određivanje vrednosti 8-OHdG
 - 1.2. pokazatelji oksidativnog stresa
 - određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (TBARS)
 - 1.3. pokazatelji antioksidativne odbrane
 - određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima
 - superoksid dismutaze (SOD)
 - katalaze (CAT)
 - glutation peroksidaze (GPx)
 - glutation reduktaze (GR)
 - glutation-S-transferaze (GST)

2. Uporediti vrednosti 8-OHdG, proizvoda lipidne peroksidacije (TBARS) i aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT, GPx, GR, SOD, GST) unutar grupe pacijentkinja sa lokalno ograničenim karcinomom grlića materice podeljenih u dve podgrupe sa niskim i visokim rizikom u odnosu na relaps bolesti.
3. Ispitati korelaciju nivoa 8-OHdG, MDA i antioksidativnih enzima i relapsa bolesti. U svrhu procene njihovog potencijala u budućim istraživanjima i kliničkoj upotrebi.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se o mogućem korišćenju navedenih biomarkera kao dijagnostičkih markera kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice. Nivoi 8-OHdG i proizvoda lipidne peroksidacije (TBARS) kao i aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT, GPx, GR, SOD, GST) mogli bi pomoći tačnijem svrstavanju pacijentkinja u određene grupe, a sledstveno i bržem odabiru odgovarajućeg lečenja. Takođe, ukoliko su ispitivani parametri različiti u različitim grupama pacijentkinja, mogli bi predstavljati prognozni marker proširenosti bolesti. Pomoću analiziranih markera pre operacije pacijentkinje bi mogle biti svrstane u grupu niskog ili visokog rizika.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Konstrukcija i način izbora uzorka

Tokom istraživanja u periodu od 2013. do 2016. godine na Klinici za operativnu onkologiju, odeljenje za ginekologiju na Institutu za onkologiju Vojvodine, sprovedena je prospektivna analitička studija sa praćenjem nivoa 8-OHdG u uzorcima urina i određivanjem parametara oksidativnog stresa (TBARS), kao i antioksidativne zaštite (CAT, GPx, GR, SOD, GST) iz krvi.

Kompletno istraživanje je izvedeno na Odeljenju za ginekologiju Instituta za onkologiju Vojvodine, Laboratoriji Instituta za onkologiju Vojvodine, Zavodu za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika Novi Sad u vremenskom periodu od 2013. do 2017. godine.

U istraživanje su bile uključene 153 žene, podeljene u četiri grupe. Prva, kontrolna grupa, obuhvatala je 32 zdrave žene, što je potvrđeno urednim PAPA nalazom, koje su dale krv i urin na analizu. Druga grupa je obuhvatala 37 pacijentkinja sa displazijom grlića materice, HSIL, sa dokazanim postojanjem CIN 2 i CIN 3. Treća grupa je obuhvatala 39 pacijentkinja sa patohistološki verifikovanim karcinomom grlića materice FIGO stadijuma Ia- Ib, kod kojih je odlukom Onkološke komisije za ginekološke tumore Instituta za onkologiju Vojvodine indicirano operativno lečenje. Ova grupa pacijentkinja bila je podeljena u dve podgrupe na osnovu definitivnog postoperativnog patohistološkog (ph) nalaza: pacijentkinje sa niskim rizikom u odnosu na ph i pacijentkinje sa visokim rizikom. U podgrupi niskog rizika su pacijentkinje sa malim volumenom tumora, negativnim parametrijima, negativnim marginama, negativnom limfovaskularnom invazijom, negativnim limfnim čvorovima na metastaziranje tj. pacijentkinje koje se nakon operacije dalje samo prate. U visokorizičnoj grupi su pacijentkinje sa velikim volumenom tumora, pozitivnim parametrijima, marginama, limfovaskularnom invazijom i pozitivnim limfnim čvorovima na metastaziranje. To su pacijentkinje kojima je indicirana adjuvantna terapija u nastavku lečenja. U četvrtu grupu su svrstane pacijentkinje sa uznapredovalim karcinomom grlića materice, u stadijumima IIa- IV kod kojih je odlukom onkološke komisije za ginekološke tumore Instituta za onkologiju Vojvodine indicirana kompletna hemoiridijacija sa endokavitarnim zračenjem. Grupa je

obuhvatala 45 pacijentkinja. Pacijentkinje iz svih grupa su davale krv i urin na analizu pre započinjanja odgovarajućeg tretmana.

Kriterijumi za uključivanje u kontrolnu grupu su: uredan PAPA nalaz prethodna tri meseca, prethodno nelečene od malignih oboljenja, bez prethodnih intervencija na grliću materice, starije od 18 godina, potpisan informacioni pristanak, negativan test na trudnoću, bez promena u stilu života (navike u ishrani, pušenje, fizička aktivnost, suplementi, medikamentozna terapija itd.)

Kriterijumi za uključivanje pacijentkinja su: histološki potvrđena pripadnost prethodno definisanim grupama pacijentkinja, starije od 18 godina, potpisan informacioni pristanak, ECOG 0-1, negativan test na trudnoću, negativne na hepatitis C i B, HIV virus.

Kriterijumi za isključivanje su: prethodno prisutan neki drugi karcinom, recidivi, prethodne intervencije na grliću materice, zračenja, hemioterapija, bolesti tireoidne žlezde, akutni inflamatorni procesi u organizmu.

Klinički podaci o pacijentkinjama prikupljali su se iz Bolničkog informacionog sistema (Birpis) koji se koriste u svakodnevnom radu na Institutu za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Ispitanice su potpisale informisani pristanak i dale saglasnost za istraživanje. Istraživanje je odobreno na Etičkom odboru Instituta za onkologiju Vojvodine.

U svrhu ispitivanja korelacije nivoa 8-OHdG, MDA i antioksidativnih enzima i relapsa bolesti, pacijentkinje su grupisane na sledeći način: Grupa 0- pacijentkinje su preživele i bez relapsa bolesti u trenutku praćenja; Grupa 1- Pacijentkinje koje su umrle ili sa relapsom bolesti do 6 meseci od tretmana. Grupa 2- Umrle ili sa relapsom bolesti od 6 meseci do trenutka praćenja. Period praćenja je bio 29 meseci.

3.2 Metod rada

Priprema uzorka krvi:

1. Od ispitanika je uzorkovano 5 ml pune krvi u epruvetu sa heparinom. 400 μ L pune krvi je korišćeno za analizu enzima glutation peroksidaze (GPx).
2. 1 ml heparinizirane krvi je centrifugiran 10 min na 3000 o/min. Plazma je izdvojena za dalju analizu. Eritrociti su ispirani 3 puta sa 6 ml fiziološkog rastvora, uz blago mešanje i centrifugiranje 10 min na 3000 o/min. Isprani eritrociti dopunjeni su do 4 ml

hladnom redestilovanom vodom. Dobijeni hemolizat je podeljen u 4 ependorfa, za analizu enzima SOD, CAT, GST i GR.

3. Ostatak heparinizirane krvi centrifugiran je 10 min na 3000 o/min i odvojena je plazma za određivanje malonildialdehida (MDA).

Svi uzorci su čuvani na temperaturi od -80° do analize.

Priprema uzorka urina:

Uzorak urina radi određivanja vrednosti 8-OHdG pripreman je tehnikom čvrsto- tečne ekstrakcije (*eng. solid phase extraction-SPE*). Za ekstrakciju su korišćene kolone Chromabond C18 ec 6ml/500 mg, proizvođača MACHEREY- NAGEL prema sledećem postupku:

1. Centrifugiranje uzorka

3 mL urina centrifugirano je na 3500 o/min, od čega je 1 mL supernatanta uziman za analizu

2. Kondicioniranje kolone

Kolona je kondicionirana propuštanjem prvo metanola, a potom dva puta dejonizovane vode.

3. Nanošenje uzorka

1 mL urina je propuštan kroz kolonu, a potom kolona isprana sa 2 mL dejonizovane vode. Kolona je nakon toga centrifugirana na 3500 o/min.

4. Eluiranje kolone

Analit (8-OHdG) je eluiran sa kolone pomoću 2 mL metanola.

Dobijeni eluat je kvantitativno prenesen u silirane GC-inserte odgovarajuće zapremine i uparen do suva i nakon ponovnog rastvaranja derivatizovan. Derivatizacija je izvođena rastvaranjem rezidua u 20 µL acetonitrila (HPLC grade) i dodatkom 20 µL BSTFA (bis-trimetilsililtrifluoroacetamid) i stajanjem najmanje 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je analiziran metodom gasne hromatografije uz masenu detekciju.

3.3 Aparati i pribor

Sve korišćene hemikalije su analitičke čistoće, proizvođača Sigma Aldrich. Kompletna krvna slika rađena je na hematološkom analizatoru HrMX, proizvođača Beckman Coulter, proizvođača Roche, u Hematološkoj Laboratoriji Instituta za onkologiju Vojvodine.

Koncentracija malonildialdehida (MDA) merena je na spektrofotometru, Agilent 8453 UV-visible spectrophotometar, Biochem Analysis UV/Vis SW.

Aktivnost enzima antioksidativne zaštite određivana je spektrofotometrijskim metodama uz korišćenje softvera za određivanje kinetike enzimskih reakcija (Agilent 8453 UV-visible spectrophotometar, Biochem Analysis UV/Vis SW).

Koncentracija 8-OHdG određivana je gasnom hromatografijom uz masenu detekciju (GC-MS) korišćenjem Agilent GC 7890A, 5975C VL MSD uređaja. Identifikacija 8-OHdG bila je izvršena pomoću komercijalnih biblioteka masenih spektara (Fiehn.L i NIST8.L) a potvrđivana upotrebom AMDIS softverskog paketa i karakterističnim jonima m/z 383 (T); 368 (Q1) i 311 (Q2). (T-target; Q1 i Q2-qualifier ions).

Kreatinin je određivan na aparatu Cobas Integra.

3.4 Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa

3.4.1 Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Reagensi:

1. 15 % w/v TCA- trihlorsirćetna kiselina (Sigma Aldrich)
2. 0,375 % w/v TBA- tiobarbiturne kiselina (Sigma Aldrich)
3. 0,25 M HCL- hlorovodonične kiseline (Sigma Aldrich)

Princip metode:

Intenzitet lipidne peroksidacije je određivan spektrofotometrijski preko koncentracije TBARS (reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline) u kiseloj sredini na 535 nm (106).

Reakciona smeša:

0,5 ml uzorka se pomeša sa 1 ml 0,6 % tiobarbiturne kiseline, izmeša na vortexu i zagreva na vodenom kupatilu 15 minuta na 90°C. Nakon isteka vremena, epruvete se hlade na ledu 5 minuta i zatim centrifugiraju na 1000 o/min u toku 10 minuta. Koncentracija TBARS

- | | |
|-----------------------------|--------|
| 2. 30 mmol NaN ₃ | 100 µl |
| 3. 5mM ksantin | 1 ml |
| 4. 5 mmol cit C | 400 µl |

Smeša se dopuni do 100 ml fosfatnim puferom pH=7.8

Rastvor B:

- | | |
|--------------------------------|---------|
| 1. 1mmol EDTA | 1.2 ml |
| 2. 0.1 M fosfatni pufer pH=7.8 | 10.8 ml |
| 3. XOD (50 unit/2ml) | 60 µl |

Reakciona smeša:

0.65 ml rastvora A, 10 µl uzorka, 50 µl fosfatnog pufera, 50 µl rastvora B (XOD). Reakcija započinje dodavanjem rastvora B. Prati se apsorbancija na 550 nm, u toku 3 minuta na temperaturi od 25⁰C. Promene apsorbancije slepe probe treba da iznose oko 0.025/minuti, a u uzorcima za oko 50% manje.

Izračunavanje:

Aktivnost SOD se izražava u jedinicama aktivnosti po g hemoglobina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{\Delta A_{\text{sp}} * 4 * 100}{\Delta A_{\text{uz}} * C_{\text{pr}}} \text{ (U/g Hgb)}$$

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{Hgb} - koncentracija hemoglobina u uzorku [g/L]

3.5.2 Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Princip metode:

Vodonik peroksid pokazuje maksimum apsorpcije na 240 nm. Aktivnost katalaze se određuje praćenjem razlaganja H₂O₂ na datoj talasnoj dužini, pri čemu je pad apsorbancije proporcionalan aktivnosti katalaze (108).

Reagensi:

1. 0.05 M fosfatni pufer pH=7.0

2. 30 % H₂O₂

Pufer se podesi sa H₂O₂ tako da apsorbancija slepe probe na 240 nm bude 0.525-0.550.

Reakciona smeša:

U 1.5 ml podešenog rastvora H₂O₂ u fosfatnom puferu doda se uzorak (10-20 µl). Reakcija započinje dodavanjem uzorka. Pad apsorbancije se prati na 240 nm, u toku tri minuta na temperaturi od 25⁰C.

Izračunavanje:

Aktivnost CAT se izražava u jedinicama aktivnosti po g hemoglobina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{\Delta A_{uz} * 1000 * 80 * V_{rs}}{43.6 * C_{Hgb} * V_{uz}} \quad (\text{U/g Hgb})$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{Hgb} - koncentracija hemoglobina u uzorku [g/L]

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml]

V_{uz} - zapremina uzorka [ml]

3.5.3 Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx)

Princip metode:

Glutacion peroksidaza katališe redukciju organskog peroksida uz nastajanje oksidovanog glutationa, GSSG. GSSG se ponovo redukuje do GSH uz NADPH (kao donora redukcionih ekvivalenata), a reakciju katališe enzim glutacion reduktaza (GR). Aktivnost GPx se prati spektrofotometrijski, posredno, praćenjem pada apsorbance na 340 nm koja potiče od NADPH (109).

Reagensi:

1. 1M TRIS-HCl, 5mM EDTA; pH=8
2. 0.1M GSH
3. 2 mM NADPH
4. 250 IU/mL GR

5. 7mM t-butilhidroperoksid

Reakciona smeša:

	Slepa proba	Sistem
TRIS-HCl, EDTA	100 µL	100 µL
GSH, 0.1M	20 µL	20 µL
GR 10 U/mL	100 µL	100 µL
NADPH, 2 mM	100 µL	100 µL
Uzorak	10 µL	10 µL
Dest. H₂O	670 µL	660 µL
Inkubirati na 37 ⁰ C 10 minuta		
7mM t-Butilhidroperoksid	/	10 µL

Izračunavanje:

Aktivnost GPx se može izraziti kao broj µmol NADPH oksidovanih po minuti po g hemoglobina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{\Delta A_{\text{uz}} * 1000 * 20 * V_{\text{rs}}}{6.22 * C_{\text{Hgb}} * V_{\text{uz}}} \quad (\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g Hgb})$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{Hgb} - koncentracija hemoglobina u uzorku [g/L]

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml]

V_{uz} – zapremina uzorka [ml]

3.5.4 Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Princip metode:

Glutation reduktaza katališe redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) uz NADPH kao donora redukcionih ekvivalenata. Aktivnost GR se određuje spektrofotometrijski, posredno, preko brzine oksidacije NADPH, čiji je maksimum apsorbancije meri na 340 nm (109).

Reagensi:

1. 1M TRIS-HCl, 5mM EDTA; pH=8
2. 0.033 M GSSG
3. 2 mM NADPH

Reakciona smeša:

	Slepa proba	Uzorak
TRIS-HCl, EDTA	50 µL	50 µL
Uzorak	10 µL	10 µL
Dest. H₂O	890 µL	690 µL
GSSG	/	200 µL
Inkubacija 10 minuta na 37 ⁰ C		
NADPH	50 µL	50 µL

Izračunavanje:

Aktivnost GR se može izraziti kao broj µmol NADPH oksidovanih po minuti po g hemoglobina.

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) * 1000 * 4 * V_{\text{rs}}}{6.22 * C_{\text{Hgb}} * V_{\text{uz}}} \quad (\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g Hgb})$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{Hgb} - koncentracija hemoglobina u uzorku [g/L]

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml]

V_{uz} - zapremina uzorka [ml]

3.5.5 Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)

Princip metode:

Glutation-S-transferaza katalizuje reakciju 1-hlorodinitrobenzena (CDNB) sa -SH grupom glutationa. Konjugat CDNB-glutation, apsorbuje na 340 nm, pa se aktivnost enzima meri promenom optičke gustine na datoj talasnoj dužini (109).

Reagensi:

1. 0.5M fosfatni pufer pH=6.5
2. 25mM CDNB u 95% etanolu
3. 20mM GSH

Reakciona smeša:

	Slepa proba	Uzorak
Fosfatni pufer	200 µL	200 µL
CDNB	20 µL	20 µL
Dest. H₂O	730 µL	680 µL
Inkubirati 10 min. na 37 ⁰ C		
GSH	50 µL	50 µL
Promešati		
Uzorak	/	50 µL

Izračunavanje:

Aktivnost GST se izražava u specifičnim jedinicama aktivnosti na g Hgb [nmol/min/g Hgb].

$$\text{specifična aktivnost} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) * V_{\text{rs}} * 80 * 1000}{9.6 * V_{\text{uz}} * C_{\text{Hgb}}} \quad (\text{nmol konjugata /min /g Hgb})$$

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{Hgb} - koncentracija hemoglobina u uzorku [g/L]

V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml]

V_{uz} - zapremina uzorka [ml]

3.6 Statistička analiza

Deskriptivna statistička analiza dobijenih podataka podrazumevala je određivanje frekvencije, prosečne vrednosti, medijane, standardne devijacije, minimuma i maksimuma distribucije podataka. Podaci su predstavljeni tabelarno i grafički pomoću stubičastih dijagrama, kružnih dijagrama, histograma i boks dijagrama. Slaganje raspodela promenljivih sa normalnom raspodelom je testirano Kolmogorov Smirnovim testom.

Univarijantne parametrijske i neparametrijske metode su podrazumevale primenu Studentovog t-testa, analizu varijanse, Man-Vitnij testa, Kruskal-Valis testa i hi-kvadrat testa. Razlike za koje je p vrednost bila manja od 0,05 smatrane su kao statistički značajne.

Za statističku obradu dobijenih rezultata ispitivanja je korišćen Microsoft Excel 2007, statistički program Statistica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), univerzitetska licenca za Univerzitet u Novom Sadu.

Multivrijantna statistička analiza podrazumevala je primenu kanonijske diskriminantne analize (CDA) i hijerarhijske klaster analize (CA) na set podataka koji opisuje parametre oksidativnog stresa kod ispitanih pacijenata.

4 REZULTATI

4.1 Karakteristike ispitanica

Kliničke i patološke karakteristike ispitanica prikazane su u Tabelama 2, 3 i 4. U istraživanje je bilo uključeno 153 žene. U kontrolnoj grupi (grupa I) bilo je 32 zdrave žene. U grupu II je bilo uključeno 37 pacijentkinja sa HSIL promenama, dok je bilo 39 pacijentkinja sa lokalno ograničenim karcinomom grlića materice (grupa III) i 45 pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom grlića materice (grupa IV). Distribucija po godinama bila je slična između kontrolne grupe žena i grupa pacijentkinja. Srednja vrednost godina ispitanica je 43.80 ± 8.41 (21-77 god). Srednja vrednost godina u grupi zdravih žena je bila 33.56 godina, u grupi II 40.54 godine, u III grupi 48.95 i u IV grupi 52.18 (Tabela 2).

U grupi pacijentkinja sa karcinomom grlića materice raspodela prema FIGO stadijumu bila je sledeća: 2 pacijentkinje u FIGO stadijumu Ia1, 1 pacijentkinja u Ia2, 19 pacijentkinja u Ib1, 11 pacijentkinja u Ib2, 3 pacijentkinje u IIa, 3 pacijentkinje u IIa2, 31 pacijentkinja u IIb, 9 pacijentkinja u IIIb, 3 pacijentkinje u IVa i 2 pacijentkinje u stadijumu IV (Tabela 3).

Limfovaskularna invazija bila je prisutna kod 23 pacijentkinje (28.97%), a nije bilo limfovaskularne invazije kod 16 pacijentkinja (41.02%) u grupi III. 78 pacijentkinja (66.04%) iz grupa III i IV su imale planocelularni karcinom, dok je kod 6 pacijentkinja (5.08%) dijagnostikovao adenoskvamozni karcinom (Tabela 4).

Kod 37 pacijentkinja (30.58%) je kao odgovarajući terapijski tretman urađena konizacija, radikalna histerektomija kod 39 (32.23%), a zračenje je dobilo 45 pacijentkinja (37.19%).

Što se tiče diferencijacije tumora 28 pacijentkinja imalo je tumor gradusa 2 (G2) dok je 5 pacijentkinja imalo tumor gradusa 3, a 6 pacijentkinja tumor gradusa 1.

Tabela 2. Starost pacijentkinja po grupama

Grupa	Broj pacijentkinja	Srednja vrednost godina
Ukupno	153	44.65
I	32	33.56
II	37	40.54
III	39	48.95
IV	45	52.18

Tabela 3. Raspodela pacijentkinja prema FIGO stadijumu

FIGO Stadijum	Broj pacijentkinja	Procenat
Ia1	2	1.65
Ia2	1	0.83
Ib1	19	15.70
Ib2	11	9.09
IIa	3	2.48
IIa2	3	2.48
IIb	31	25.62
IIIb	9	7.44
IVa	3	2.48
IV	2	1.65

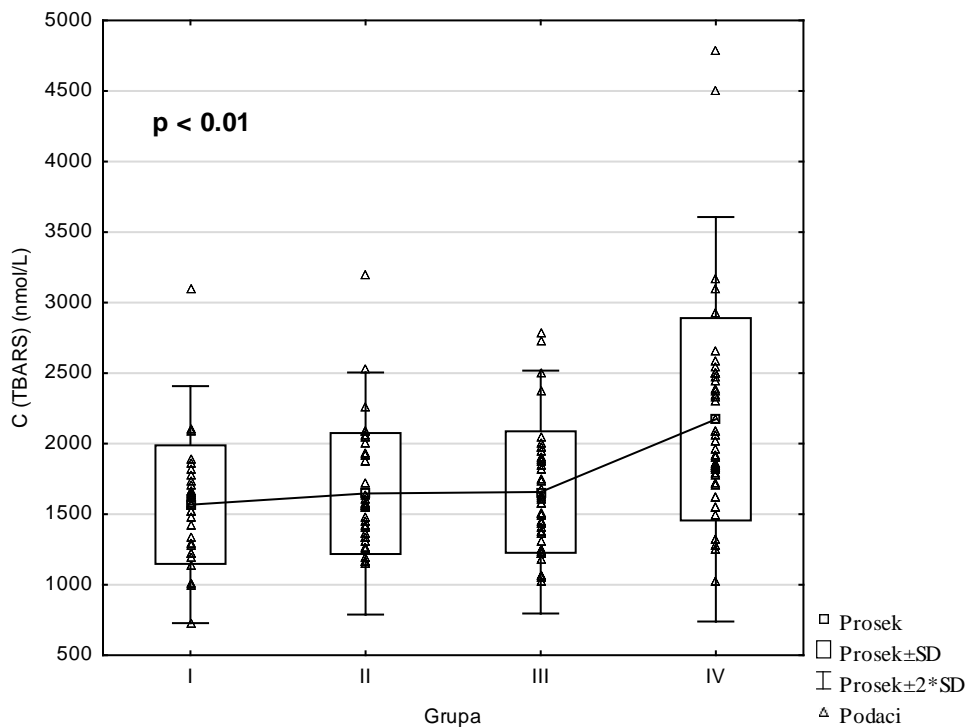
Tabela 4. Histopatološke karakteristike

Tip karcinoma	Broj pacijentkinja	Procenat
Planocelularni	78	66.04
Adenoskvamozni	6	5.08
Limfovaskularna invazija		
Nema	16	41.02
Prisutna	23	28.97

4.2 Ispitivanje intenziteta lipidne peroksidacije i aktivnosti enzima antioksidative zaštite

4.2.1 Intenzitet lipidne peroksidacije

Rezultati ispitivanja intenziteta lipidne peroksidacije kod 4 grupe ispitanica prikazani su Box Plot dijagramom (Grafikon 1).



Grafikon 1. Lipidna peroksidacija kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. I- kontrolna grupa, II- HSIL, III- FIGO Ia-Ib, IV- FIGO IIa-IV

Kruskal Valisov test je pokazao statistički značajan porast koncentracije MDA u plazmi kod lokalno uznapredovalog karcinoma grlića materice (grupa IV). Stepenn lipidne peroksidacije u kontrolnoj grupi bio je 1567 ± 420 nmol/L, u grupi II 1646 ± 429 nmol/L, u grupi III 1657 ± 430 nmol/L i u grupi IV 2173 ± 716 nmol/L. Dobijeni rezultati su pokazali umeren porast lipidne peroksidacije u grupama II i III, sa tendencijom porasta sa porastom oštećenja lezije, ali statistički značajan porast je uočen samo u grupi pacijentkinja sa lokalno uznapredovalom bolešću. Primećene su statistički značajne razlike između kontrolne grupe i grupe sa uznapredovalom bolešću ($p < 0.001$), kao i između II i IV ($p < 0.001$) i III i IV ($p < 0.001$) (Tabela 5).

Tabela 5. Statističke značajnosti razlika koncentracija MDA u plazmi pacijentkinja u 4 ispitivane grupe. $p < 0.001$.

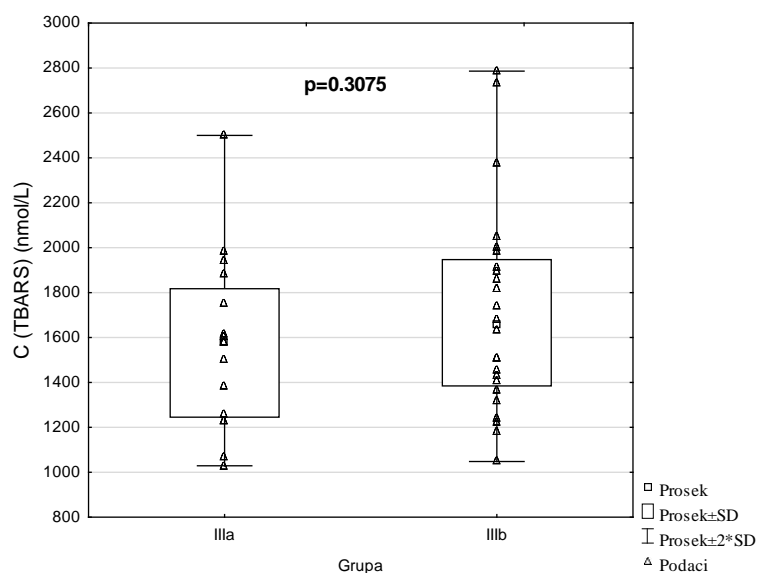
Test višestrukog poređenja za koncentraciju MDA u plazmi pacijentkinja				
	I R:61.125	II R:66.203	III R:68.563	IV R:107.43
I		1.0	1.0	0.000044
II	1.0		1.0	0.000191
III	1.0	1.0		0.000371
IV	0.000044	0.000191	0.000371	

* Crveno su označene p-vrednosti prema testu višestrukog poređenja koje su statistički značajne.

Nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji MDA između dve podgrupe unutar treće grupe pacijentkinja: sa niskim (IIIa) i visokim (IIIb) rizikom od relapsa bolesti (Tabela 6.; Grafikon 2.).

Tabela 6. Statističke značajnosti razlika koncentracija MDA u plazmi pacijentkinja u podgrupama IIIa i IIIb.

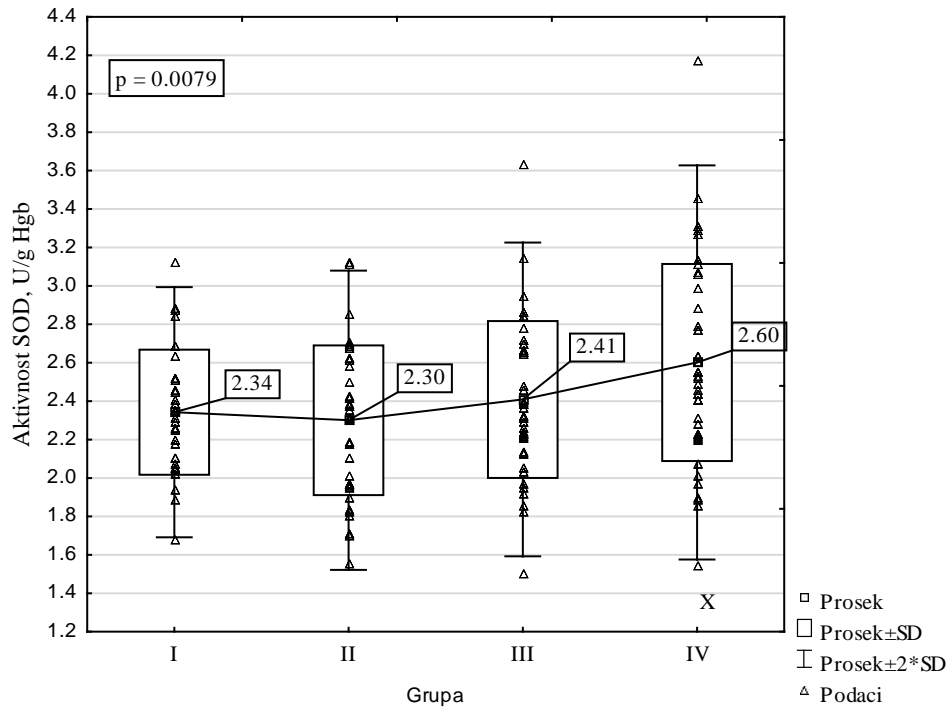
Men Vitnijev test	Zbir rangova grupe IIIa	Zbir rangova grupe IIIb	U	Z	p-value	Z adjusted
c (TBARS) (nmol/L)	294.5000	525.5000	158.5000	-0.91106	0.3075	-0.91119



Grafikon 2. Lipidna peroksidacija kod pacijentkinja u grupama IIIa i IIIb

4.2.2 Aktivnost enzima superoksid dismutaze

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti enzima superoksid dismutaze kod 4 grupe ispitanica prikazani su na Grafikonu 3 i u tabeli 7.



Grafikon 3. Aktivnost enzima SOD kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. I- kontrolna grupa, II- HSIL, III- FIGO Ia-Ib, IV- FIGO IIa-IV

Uočeno je da je progresija tumora praćena porastom aktivnosti enzima SOD, sa statistički značajnim porastom u grupi IV u poređenju sa ostale 3 grupe.

Aktivnost SOD u kontrolnoj grupi bila je 2.34 ± 0.32 U/g Hgb, u grupi II 2.30 ± 0.39 U/g Hgb, u grupi III 2.41 ± 0.41 U/g Hgb i u grupi IV 2.60 ± 0.51 U/g Hgb. Primećene su statistički značajne razlike između kontrolne grupe i grupe sa uznapredovalom bolešću ($p < 0.01$), kao i između druge i četvrte grupe ($p < 0.01$), i treće i četvrte grupe ($p < 0.05$).

Tabela 8. Statističke značajnosti razlika aktivnosti SOD u krvi pacijentkinja u 4 ispitivane grupe.

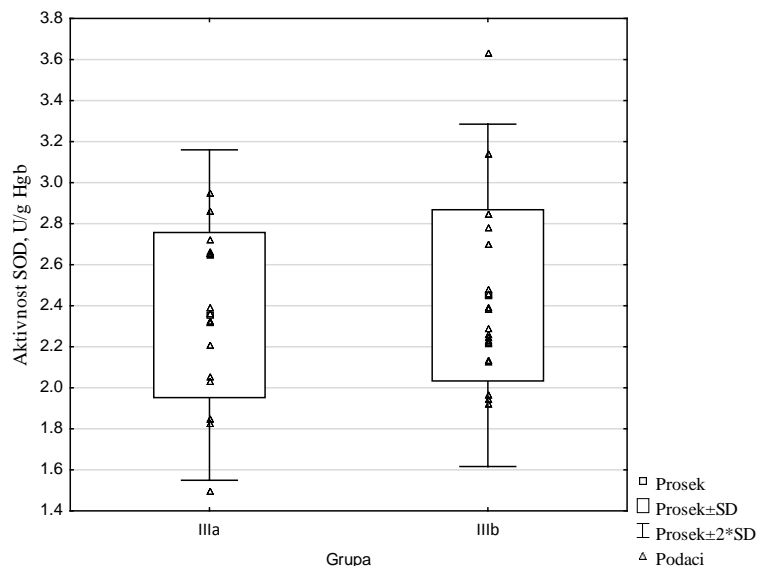
Grupa	I	II	III	IV
	2.3425	2.3007	2.4088	2.6015
I		0.668093	0.496190	0.010799
II	0.668093		0.298794	0.003651
III	0.496190	0.298794		0.048036
IV	0.010799	0.003651	0.048036	

*Crveno su označene p-vrednosti u Dankanovom testu višestrukog poređenja koje su statistički značajne.

Nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnosti SOD između dve podgrupe unutar treće grupe pacijentkinja: sa niskim (IIIa) i visokim (IIIb) rizikom od relapsa bolesti (Tabela 9.; Grafikon 4.).

Tabela 9. Statističke značajnosti razlika aktivnost SOD u plazmi pacijentkinja u podgrupama IIIa i IIIb.

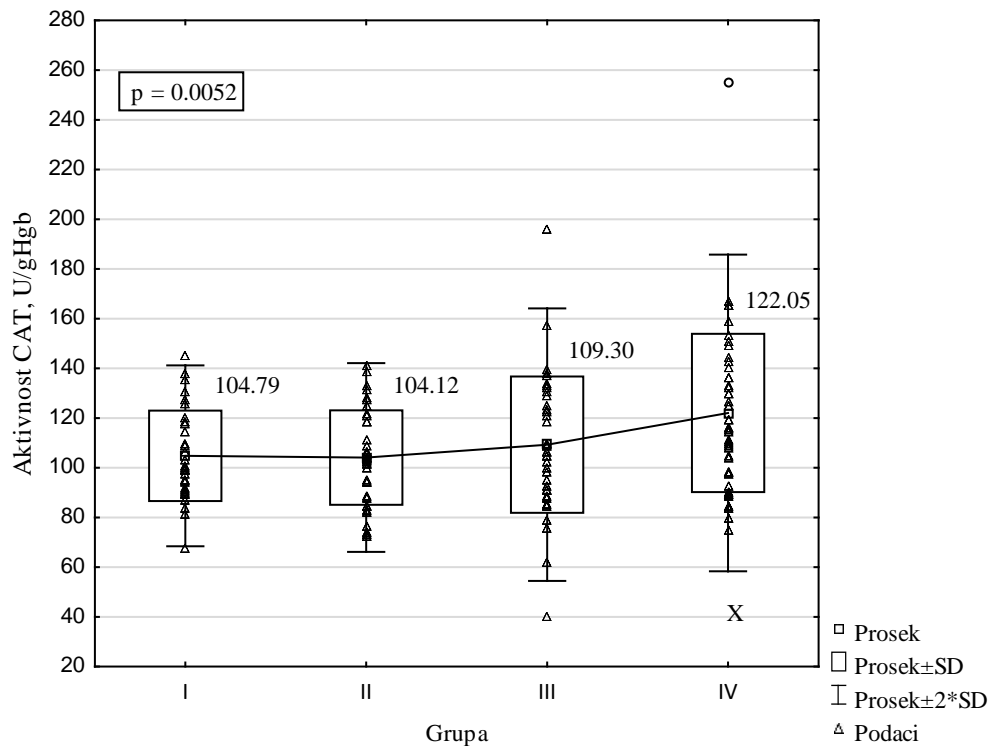
t-test	prosek IIIa	prosek IIIb	t-vrednost	df	p-vrednost	std.dev. IIIa	std.dev. IIIb
AKT (SOD) (%inh)	2.354617	2.450653	-0.723680	37	0.473813	0.402545	0.41725



Grafikon 4. Aktivnost SOD kod pacijentkinja u grupama IIIa i IIIb

4.2.3 Aktivnost enzima katalaze

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti enzima katalaze kod 4 grupe ispitanica date su na Grafikonu 5.



Grafikon 5. Aktivnost enzima CAT kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. I- kontrolna grupa, II- HSIL, III- FIGO Ia-Ib, IV- FIGO IIa-IV

Aktivnost enzima CAT je statistički značajno povišena kod pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom grlića materice u odnosu na ostale tri grupe. Progresija bolesti je praćena povećanjem aktivnosti CAT.

Aktivnost CAT u kontrolnoj grupi bila je 104.79 ± 18.20 U/g Hgb, u grupi II 104.12 ± 18.99 U/g Hgb, u grupi III 109.30 ± 27.41 U/g Hgb i u grupi IV 122.05 ± 31.85 U/g Hgb. Ustanovljene su statistički značajne razlike između kontrolne grupe i grupe sa uznapredovalom bolešću ($p < 0.005$), kao i između druge i četvrte ($p < 0.005$) i treće i četvrte grupe ($p < 0.05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Statističke značajnosti razlika aktivnosti CAT u krvi pacijentkinja u 4 ispitivane grupe.

Dankanov test višestrukog poređenja za aktivnosti CAT u krvi pacijentkinja				
Grupa	I	II	III	IV
	104.79	104.12	109.30	122.05
I		0.909254	0.441343	0.004541
II	0.909254		0.408791	0.003986
III	0.441343	0.408791		0.029623
IV	0.004541	0.003986	0.029623	

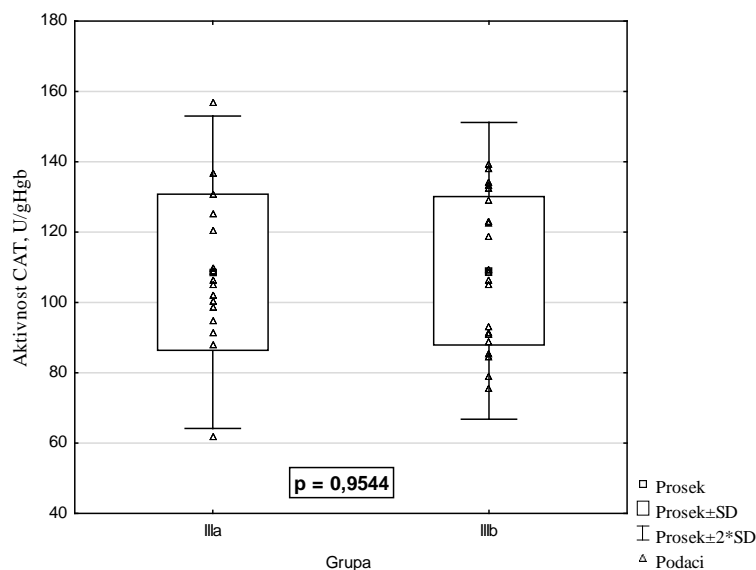
*Crveno su označene p-vrednosti prema Dankanovom testu višestrukog poređenja koje su statistički značajne.

Nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnosti CAT između dve podgrupe unutar treće grupe pacijentkinja: sa niskim (IIIa) i visokim (IIIb) rizikom od relapsa bolesti (Tabela 11.; Grafikon 6.).

Tabela 11. Statističke značajnosti razlika aktivnost CAT u plazmi pacijentkinja u podgrupama IIIa i IIIb.

t-test	Prosek IIIa	Prosek IIIb	t-vrednost	df	p-vrednost	Std.Dev. IIIa	Std.Dev. IIIb
AKT (CAT)(U/g Hgb)	108.588	109.000	-0.057587	35	0.95440	22.2061	31.005

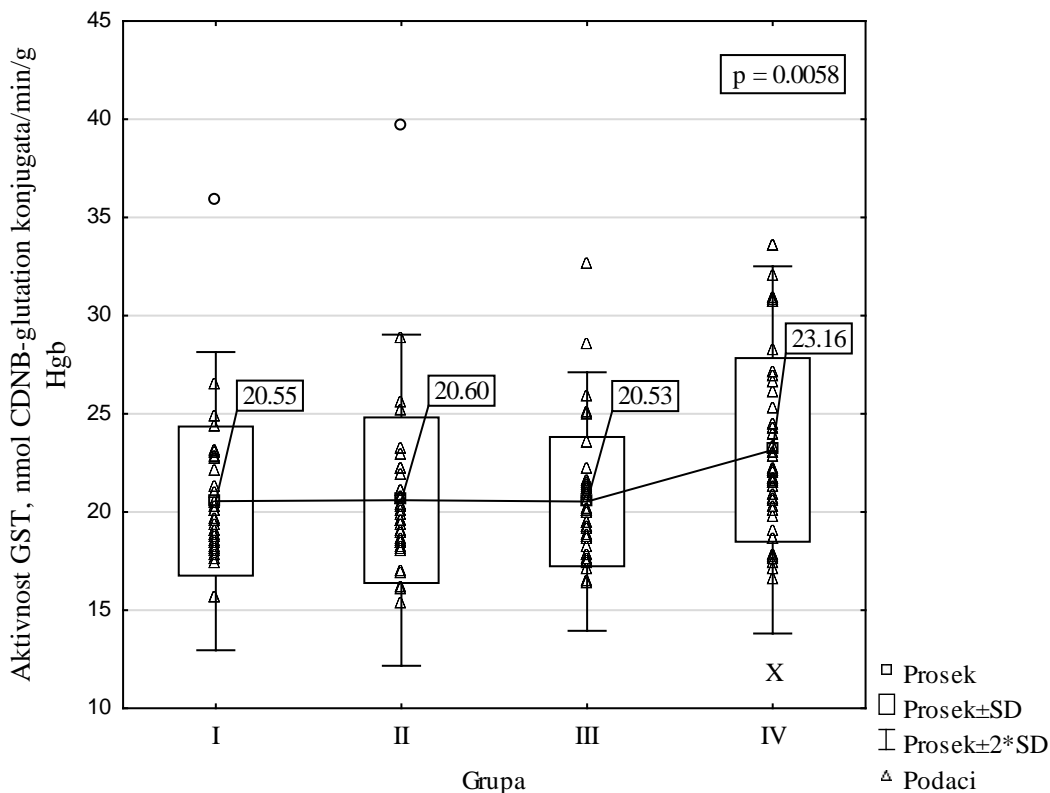
Studentovim t-testom se dobija da ne postoje statistički značajne razlike u prosečnim vrednostima aktivnosti katalaze između IIIa i IIIb grupe (p=0.9544).



Grafikon 6. Aktivnost CAT kod pacijentkinja u grupama IIIa i IIIb

4.2.4 Aktivnost enzima glutation-S-transferaze

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti enzima glutation-S-transferaze kod 4 grupe ispitanica date su na Grafikonu 7.



Grafikon 7. Aktivnost enzima GST kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. I- kontrolna grupa, II- HSIL, III- FIGO Ia-Ib, IV- FIGO IIa-IV

Aktivnost GST u kontrolnoj grupi bila je 20.55 ± 3.80 nmol/min/g, u grupi II 20.60 ± 4.22 nmol/min/g, u grupi III 20.53 ± 3.29 nmol/min/g i u grupi IV 23.16 ± 4.67 nmol/min/g. Pokazane su statistički značajne razlike između kontrolne grupe i grupe sa uznapredovalom bolešću ($p < 0.05$), kao i između druge i četvrte ($p < 0.05$) i treće i četvrte ($p < 0.05$).

Evidentno je sa grafikona da postoji visoko statistički značajna razlika između aktivnosti GST između grupe pacijenata sa uznapredovalom bolešću i ostale tri grupe ispitanica.

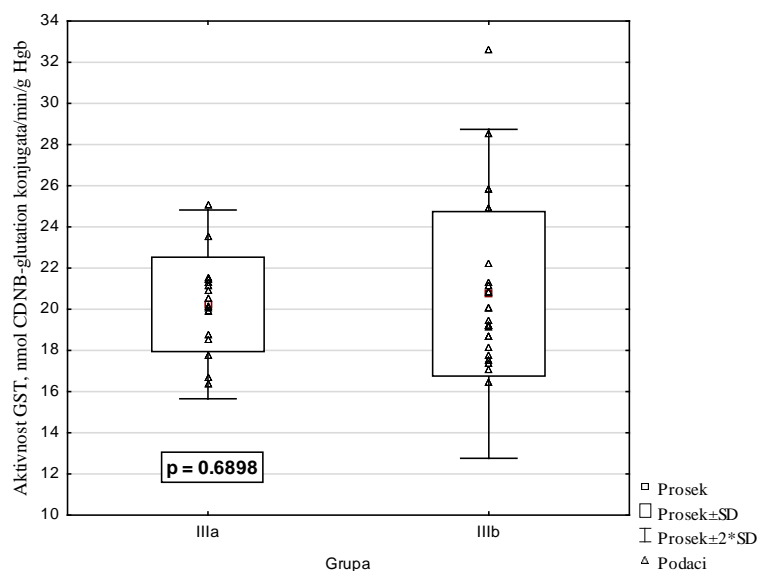
Tabela 12. Statističke značajnosti razlika aktivnosti GST u krvi pacijentkinja u 4 ispitivane grupe. Crveno označene su p-vrednost koje su prema Dankanovom testu višestrukog poređenja statistički značajne.

Dankanov test višestrukog poređenja za aktivnosti GST u krvi pacijentkinja				
Grupa	I Prosek 20.551	II Prosek 20.600	III Prosek 20.529	IV Prosek 23.161
I		0.958862	0.980662	0.007378
II	0.958862		0.943746	0.006234
III	0.980662	0.943746		0.008540
IV	0.007378	0.006234	0.008540	

Nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnosti GST između dve podgrupe unutar treće grupe pacijentkinja: sa niskim (IIIa) i visokim (IIIb) rizikom od relapsa bolesti (Tabela 13.; Grafikon 8.).

Tabela 13. Statističke značajnosti razlika aktivnosti GST u plazmi pacijentkinja u podgrupama IIIa i IIIb.

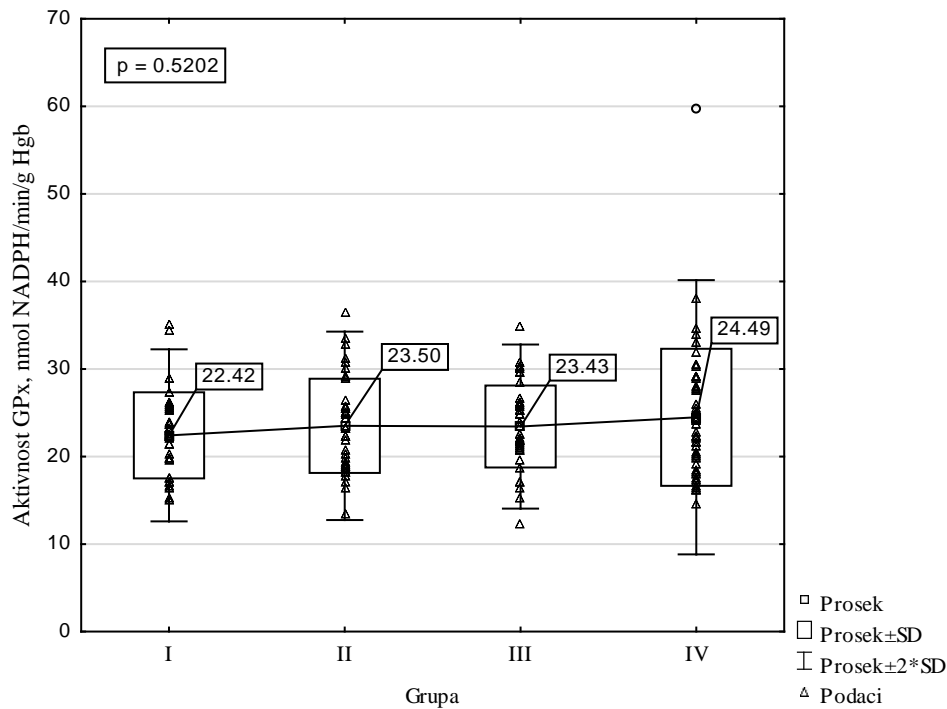
Men Vitnijev test	Zbir rangova grupe IIIa	Zbir rangova grupe IIIb	U	Z	p-value	Z adjusted
AKT (GST) (μmol/min/g Hgb)	325.5000	415.5000	162.5000	0.384353	0.700717	0.384374



Grafikon 8. Aktivnost GST kod pacijentkinja u grupama IIIa i IIIb

4.2.5 Aktivnost enzima GPx

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti enzima glutation peroksidaze kod 4 grupe ispitanica prikazani su na Grafikonu 9.



Grafikon 9. Aktivnost enzima GPx kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. I- kontrolna grupa, II- HSIL, III- FIGO Ia-Ib, IV- FIGO IIa-IV

Nije bilo statistički značajnih razlika u aktivnosti GPx između ispitivanih grupa, prema Dankanovom testu višestukog poređenja (tabela 14), iako je primećen trend porasta između grupe pacijentkinja sa uznapredovalom bolešću i ostalih ispitivanih grupa. Aktivnost GPx u kontrolnoj grupi bila je 22.42 ± 4.91 nmol/min/g Hgb, u grupi II 23.50 ± 5.38 nmol/min/g Hgb, u grupi III 23.42 ± 4.68 nmol/min/g Hgb i u grupi IV 24.49 ± 7.83 nmol/min/g Hgb.

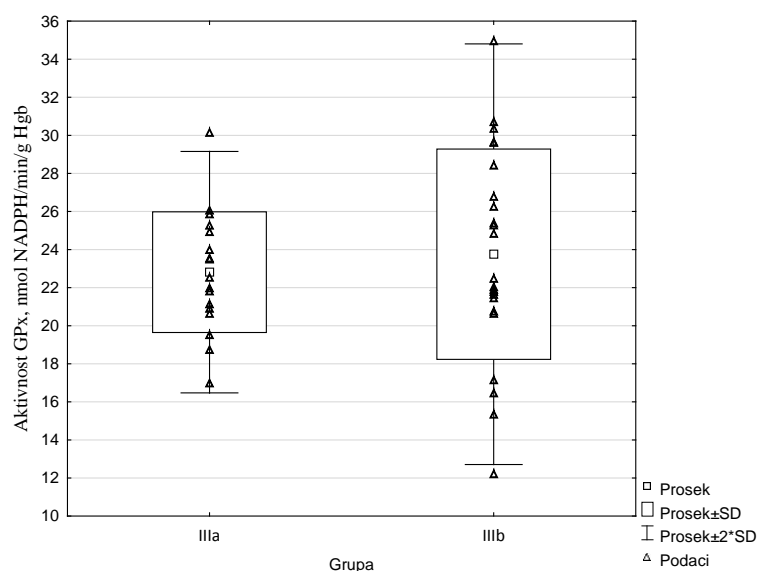
Tabela 14. Statističke značajnosti razlika aktivnosti GPx u krvi pacijentkinja u 4 ispitivane grupe.

Dankanov test višestrukog poređenja za GPx u krvi pacijentkinja				
Grupa	I Prosek 22.420	II Prosek 23.501	III Prosek 23.426	IV Prosek 24.487
I		0.463393	0.465087	0.174084
II	0.463393		0.956264	0.473976
III	0.465087	0.956264		0.471725
IV	0.174084	0.473976	0.471725	

Nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnosti GST između dve podgrupe unutar treće grupe pacijentkinja: sa niskim (IIIa) i visokim (IIIb) rizikom od relapsa bolesti (Tabela 15.; Grafikon 10.).

Tabela 15. Statističke značajnosti razlika aktivnosti GPx u plazmi pacijentkinja u podgrupama IIIa i IIIb.

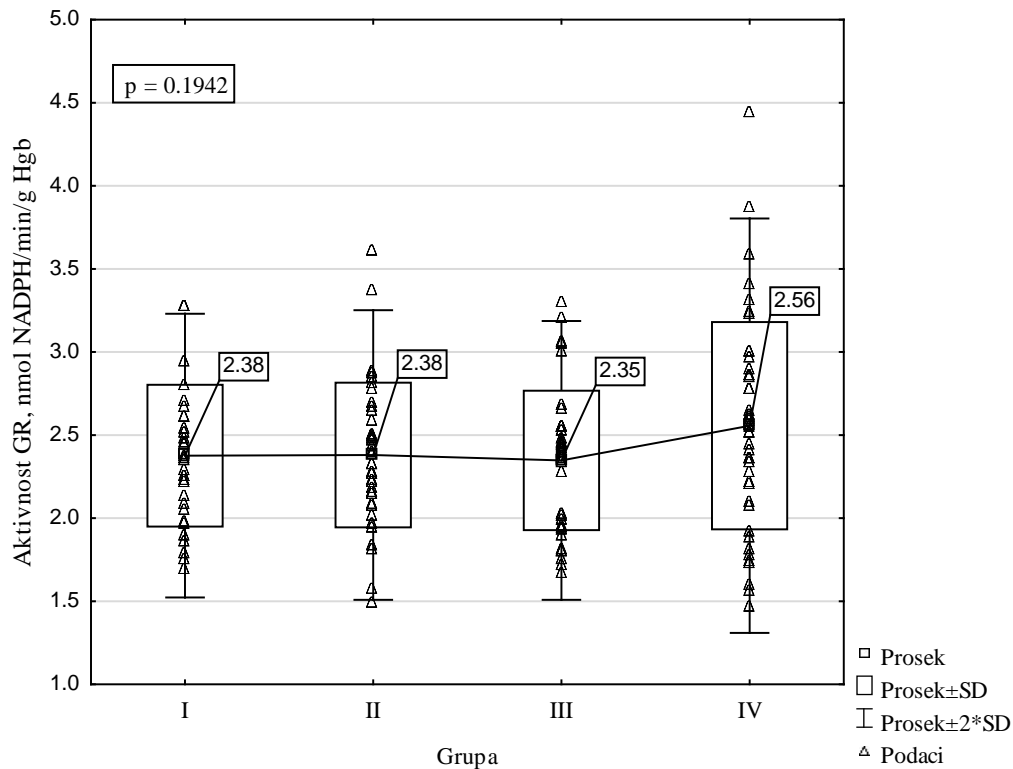
t-test	Prosek IIIa	Prosek IIIb	t-vrednost	df	p-vrednost	Std.Dev. IIIa	Std.Dev. IIIb
AKT (GPx) (μmol/min/g Hgb)	23.7578	22.8133	0.631055	38	0.53178	3.23593	5.51667



Grafikon 10. Aktivnost GST kod pacijentkinja u grupama IIIa i IIIb

4.2.6 Aktivnost enzima GR

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti enzima glutation reduktaze kod 4 grupe ispitanica date su na Grafikonu 11.



Grafikon 11. Aktivnost enzima GR kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. I- kontrolna grupa, II- HSIL, III- FIGO Ia-Ib, IV- FIGO IIa-IV

Nije bilo statistički značajnih razlika u aktivnosti GR između ispitivanih grupa, prema Dankanovom testu višestrukog poređenja (tabela 16), iako je primećen trend porasta između grupe pacijentkinja sa uznapredovalom bolešću i ostalih ispitivanih grupa. Aktivnost GR u kontrolnoj grupi bila je 2.38 ± 0.43 nmol/min/g Hgb, u grupi II 2.38 ± 0.43 nmol/min/g Hgb, u grupi III 2.35 ± 0.42 nmol/min/g Hgb i u grupi IV 2.56 ± 0.62 nmol/min/g Hgb.

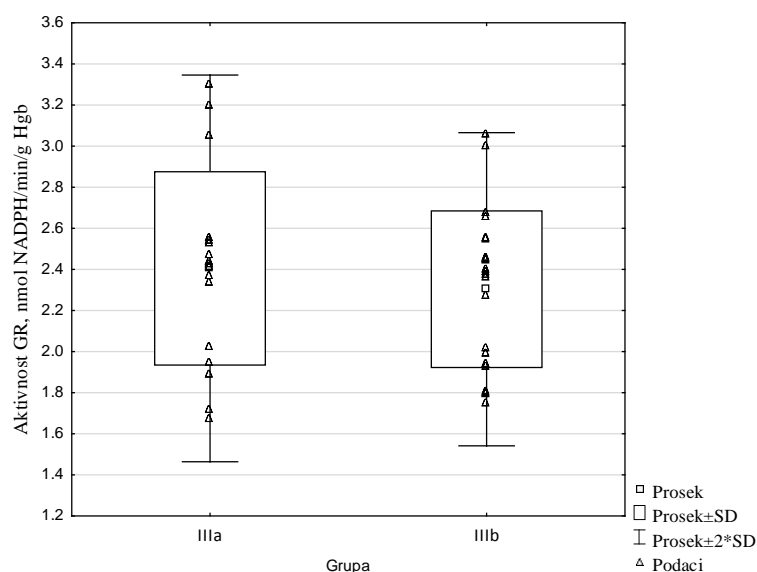
Tabela 16. Statističke značajnosti razlika aktivnosti GR u krvi pacijentkinja u 4 ispitivane grupe.

Dankanov test višestrukog poređenja za aktivnosti GR u krvi pacijentkinja				
Grupa	1 Prosek 2.3765	2 Prosek 2.3803	3 Prosek 2.3477	4 Prosek 2.5567
I		0.973062	0.800284	0.135170
II	0.973062		0.789477	0.120840
III	0.800284	0.789477		0.093633
IV	0.135170	0.120840	0.093633	

Nisu uočene statistički značajne razlike u aktivnosti GR između dve podgrupe unutar treće grupe pacijentkinja: sa niskim (IIIa) i visokim (IIIb) rizikom od relapsa bolesti (Tabela 17.; Grafikon 12.).

Tabela 17. Statističke značajnosti razlika aktivnosti GR u plazmi pacijentkinja u podgrupama IIIa i IIIb.

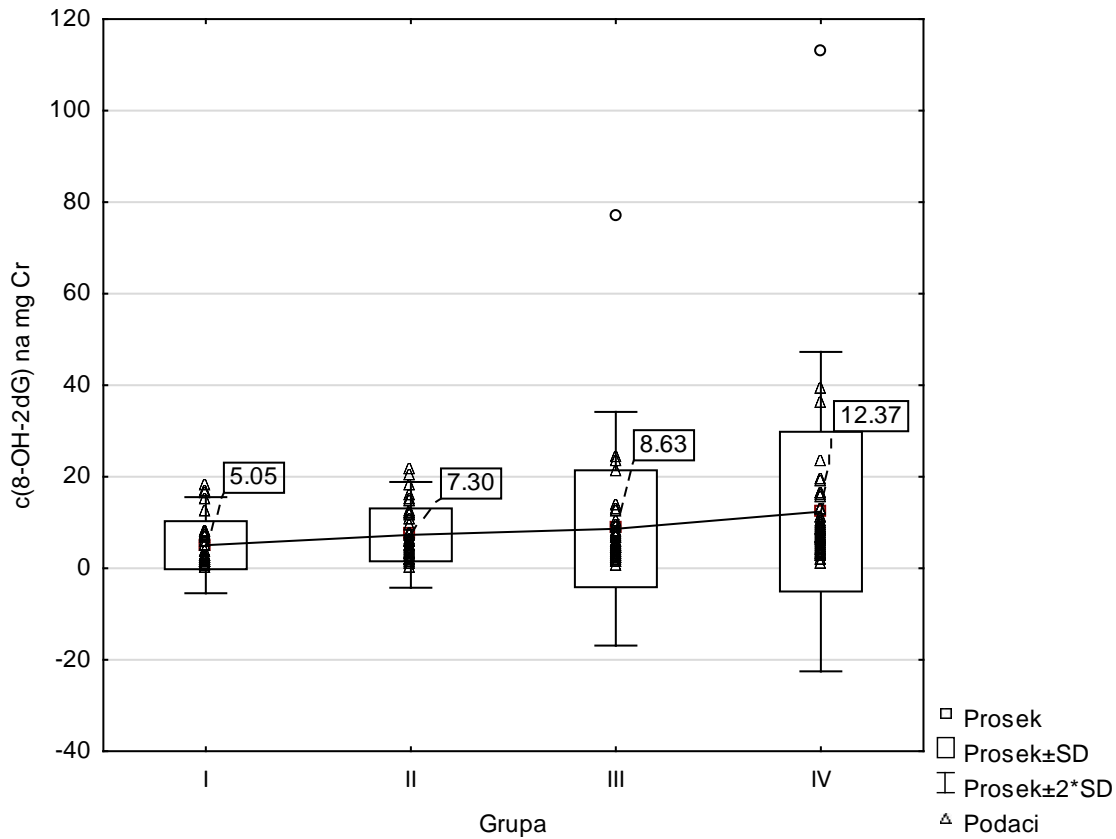
t-test	Prosek IIIa	Prosek IIIb	t-value	df	p	Std.Dev IIIa	Std.Dev IIIb
AKT (GR) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hgb}$)	2.404922	2.303545	0.743820	37	0.461683	0.48587	0.37332



Grafikon 12. Aktivnost enzima GR kod pacijentkinja u grupama IIIa i IIIb

4.2.7 Koncentracija 8-hidroksi-2-deoksiguanozina

Rezultati ispitivanja koncentracije 8-hidroksi-2-deoksiguanozina kod 4 grupe ispitanica date su na Grafikonu 13.



Grafikon 13. Koncentracija 8-hidroksi-2-deoksiguanozina kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. I-kontrolna grupa, II- HSIL, III- FIGO Ia-Ib, IV- FIGO IIa-IV

Koncentracija 8-hidroksi-2-deoksiguanozina u kontrolnoj grupi bila je 5.05 ± 5.25 , u grupi II 7.29 ± 5.78 , u grupi III 8.62 ± 12.76 i u grupi IV 12.37 ± 17.44 . Pokazane su statistički značajne razlike između kontrolne grupe i grupe sa uznapredovalom bolešću ($p < 0.05$).

Evidentno je sa slike da postoji visoko statistički značajna razlika između koncentracije 8-hidroksi-2-deoksiguanozina između kontrolne grupe i grupe pacijentkinja sa uznapredovalom bolešću (tabela 18). Progresija bolesti praćena je porastom koncentracije 8-hidroksi-2-deoksiguanozina, ali bez statistički značajnih razlika između te tri grupe.

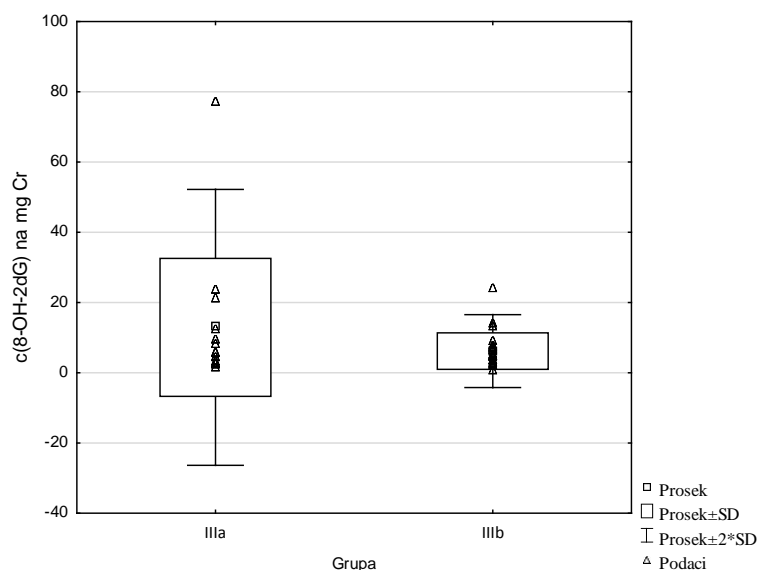
Tabela 18. Statističke značajnosti razlika koncentracija 8-hidroksi-2-deoksiguanozina u urinu pacijentkinja u 4 ispitivane grupe.

Grupa	I	II	III	IV
I	5.0509	7.2959	8.6289	12.372
II	0.422167	0.229872	0.633667	0.086026
III	0.229872	0.633667	0.180784	0.014852
IV	0.014852	0.086026	0.180784	

Nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji 8-hidroksi-2-deoksiguanozina između dve podgrupe unutar treće grupe pacijentkinja: sa niskim (IIIa) i visokim (IIIb) rizikom od relapsa bolesti (Tabela 19.; Grafikon 14.).

Tabela 19. Statističke značajnosti razlika koncentracija 8-hidroksi-2-deoksiguanozina u urinu pacijentkinja u podgrupama IIIa i IIIb.

t-test	Prosek IIIa	Prosek IIIb	t-vrednost	df	p-vrednost	Std.Dev. IIIa	Std.Dev. IIIb
c(8-OH-2dG) (ng/mg Cr)	12.9156	6.16652	1.541044	34	0.13256	19.6393	5.18866



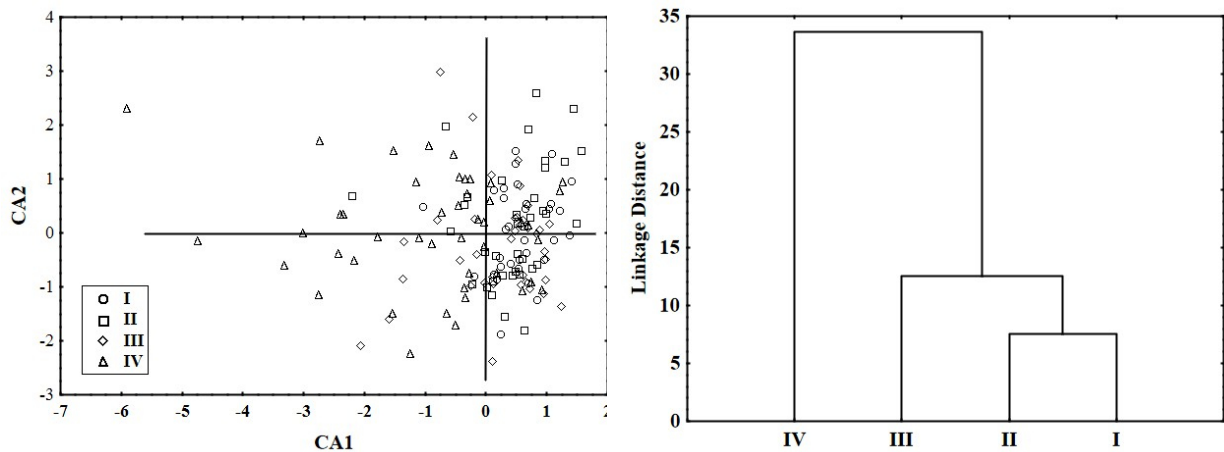
Grafikon 14. Koncentracija 8-hidroksi-2-deoksiguanozina kod pacijentkinja u grupama IIIa i IIIb

4.3 Kanonijska diskriminantna analiza

Primenom CDA na set podataka koji opisuju parametre oksidativnog stresa kod ispitanica uočeno je da prve dve diskriminantne funkcije opisuju preko 98% diskriminacija između grupa. Takođe, u kontekstu prve diskriminantne funkcije, razdvajanje različitih grupa javlja se kao rezultat određenog nivoa lipidne peroksidacije, dok se u slučaju druge diskriminantne funkcije, razdvajanje grupa javlja kao rezultat određenog nivoa superoksid dismutaze (Tabela 20). Položaj evaluiranih pacijenata u prostoru definisanom prvim dvema kanonijskim diskriminantnim osama pokazuje da nema mogućnosti razdvajanja grupa (Grafikon 15A). Hijerarhijska klaster analiza primenjena na određene Mahalanobisove distance (Grafikon 15B) otkriva sličnosti između prve tri grupe, uz odvajanje grupe IV kao posebnog klastera.

Tabela 20. Koeficijenti opterećenja kvantitativnih varijabli u odnosu na prve dve kanonijske diskriminantne ose.

Varijabla	CA1	CA2
LP	-0.842325	0.138900
SOD	-0.207943	-0.759528
CAT	-0.182681	-0.435075
GST	-0.153091	0.640474
GPX	0.162314	0.062417
GR	-0.041366	0.375422
Eigenval	0.368662	0.024604
Cum.Prop	0.921399	0.982892

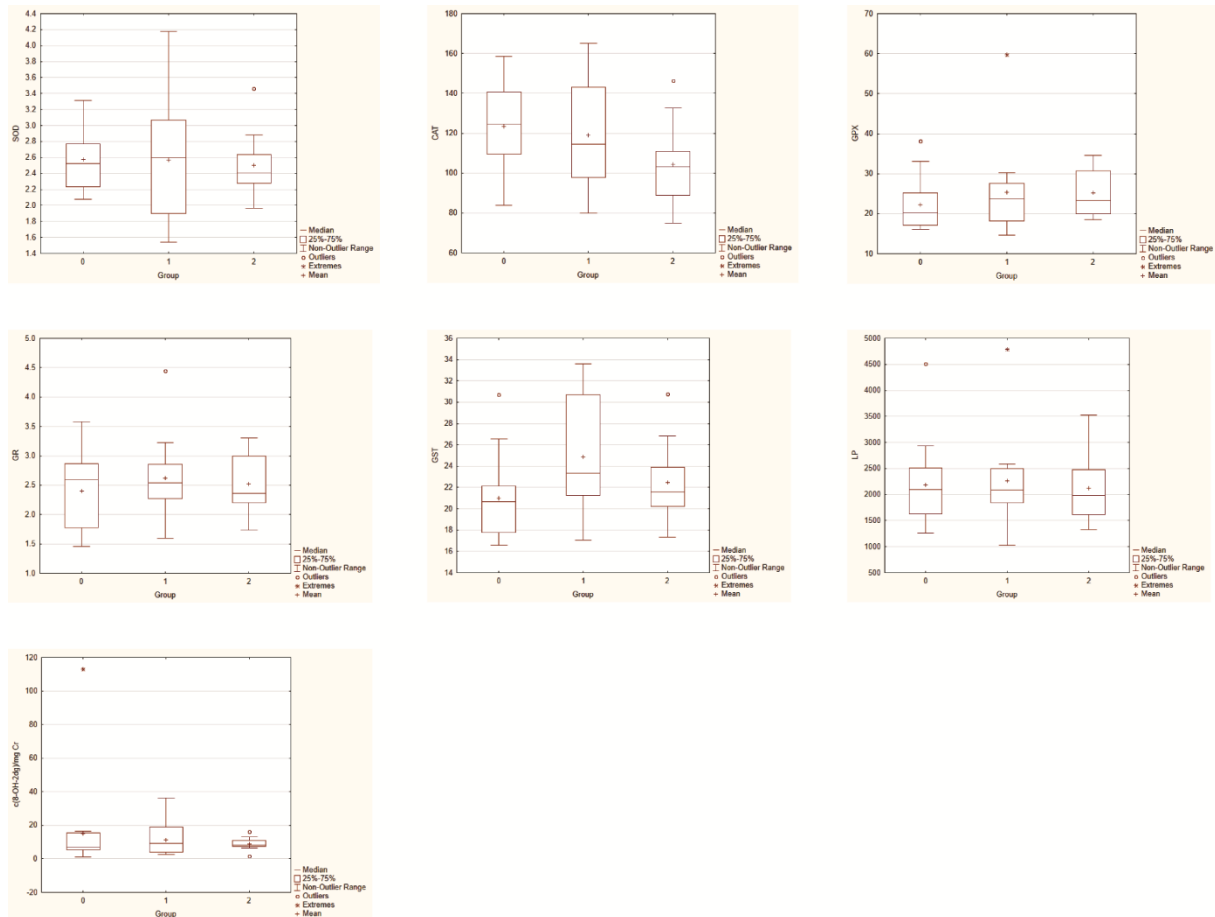


Grafikon 15 A) Pozicija evaluiranih pacijenata u prostoru definisanom sa prve dve kanonijske diskriminantne ose i B) rezultati klaster analize

Korelacija između nivoa 8-OHdG, MDA i antioksidativnih enzima i relapsa bolesti

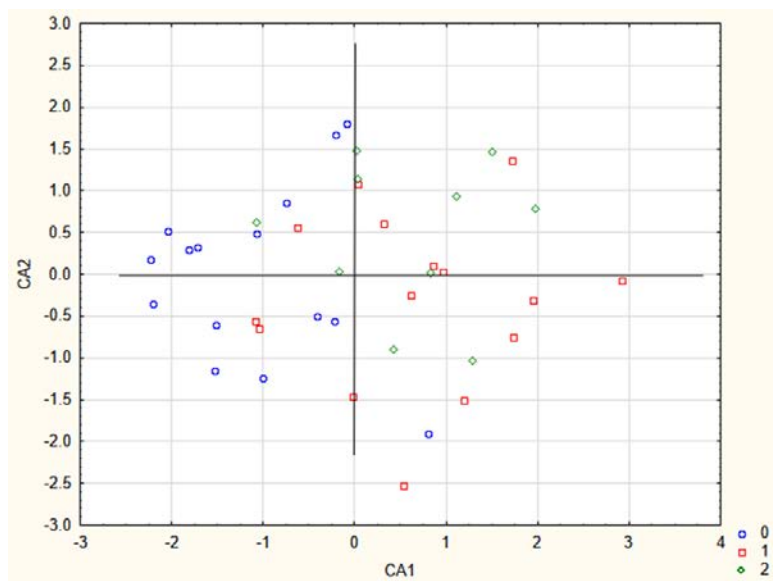
Predloženo je da biomarkeri oksidativnog stresa mogu biti iskorišćeni kao prediktori odgovora na terapiju, relaps bolesti i preživljavanje pacijenata sa karcinomom grlića materice (101, 110, 111).

Poređenjem grupe 0- pacijentkinje su preživele i bez relapsa bolesti u trenutku praćenja, grupe 1- pacijentkinje koje su umrle ili sa relapsom bolesti do 6 meseci od tretmana, grupe 2- umrle ili sa relapsom bolesti od 6 meseci do trenutka praćenja, tokom perioda praćenja od 29 meseci, pokazano je da nije bilo statistički značajnih razlika između ispitivane tri grupe što se tiče aktivnosti SOD, CAT, GPx, GR, GST i vrednosti TBARS i 8-OHdG. Rezultati za svaki od ovih parametara su prikazani na Grafikonu 16.



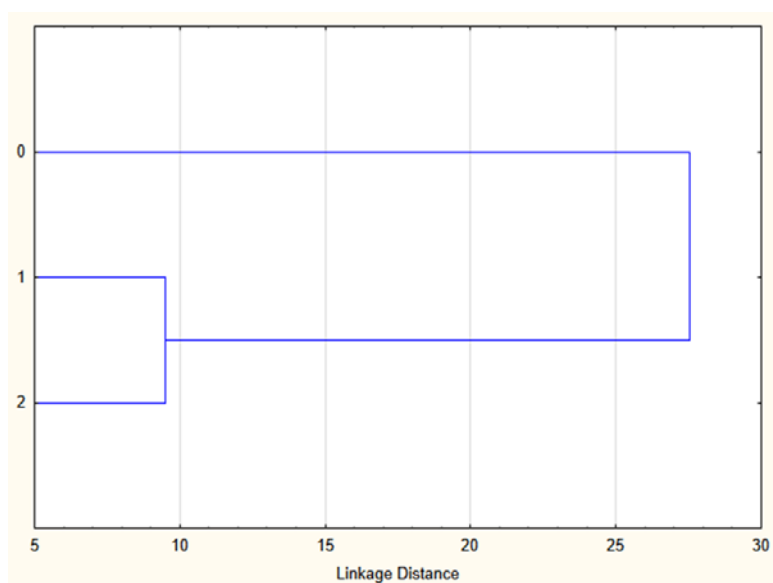
Grafikon 16. Razlike u aktivnosti SOD, CAT, GPx, GR, GST i vrednosti TBARS i 8-OHdG između Grupe 0- pacijentkinje su preživele i bez relapsa bolesti u trenutku praćenja; Grupe 1- Pacijentkinje koje su umrle ili sa relapsom bolesti do 6 meseci od tretmana. Grupe 2- Umrle ili sa relapsom bolesti od 6 meseci do trenutka praćenja.

Sa druge strane, primenom CDA uočeno je da diskriminacijama među ispitanim pacijentima statistički značajno doprinose vrednosti dobijene za aktivnosti katalaze i glutation-S-transferaze (NAPOMENA: testirane varijable su bile: CAT, GST, LP, GPX, GR, SOD i C(8-OH-2dG) / mg Cr). Kanonijska analiza je pokazala da prva kanonijska osa opisuje 89,18% diskriminacija među ispitanim slučajevima, dok druga kanonijska osa opisuje 10% diskriminacija među ispitanim slučajevima. Položaj ispitanih pacijenata u prostoru definisanom sa prve dve kanonijske ose pokazuje grupisanje pacijenata bez recidiva (oznaka 0) u negativnom delu, odnosno grupisanje pacijenata sa recidivima (oznaka 1 i 2) u pozitivnom delu (Grafikon 17).



Grafikon 17. Položaj ispitanih pacijenata u prostoru definisanom sa prve dve kanonijske ose

Primenom klaster analize na Mahalanobijusove distance dobijene diskriminantnom analizom, uočava se odvajanje pacijenata bez recidiva od grupe pacijenata kod kojih se recidiv javio u roku od 6 meseci, odnosno kasnije (Grafikon 18).



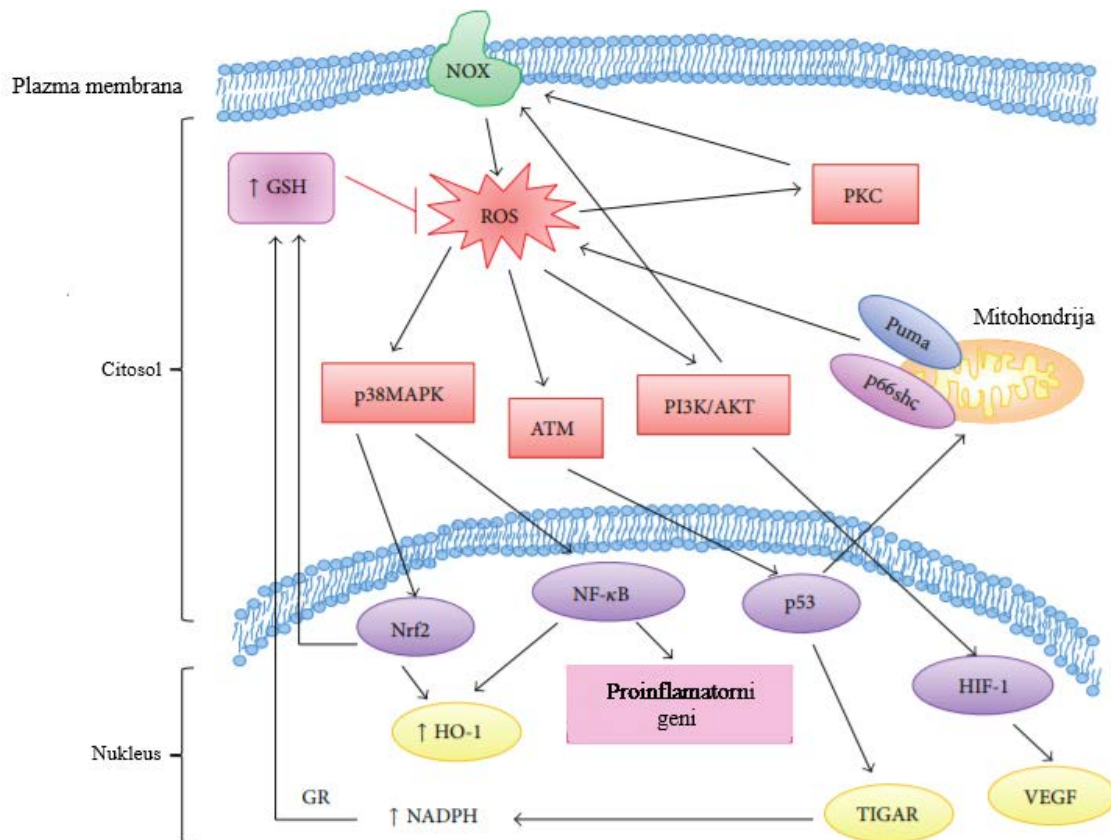
Grafikon 18. Rezultati hijerarhijske klaster analize

5 DISKUSIJA

Tokom procesa razvoja karcinoma, veliki broj gena, molekula i signalnih puteva doprinose prvo transformaciji i promociji, a onda i manifestaciji malignog fenotipa. Većina ovih molekula i puteva interaguje sa ROS u citosolu, nukleoplazmi i intraorganelarnom prostoru. Transformisana ćelija je prepoznatljiva po gubitku kontrole nad proliferacijom i deregulacijom apoptoze. Poremećaj ćelijskog ciklusa i regulacije apoptoze dešava se zahvaljujući mutaciji onkogeni i tumor supresor gena, koja oba vode prekomernom proliferativnom signalu. Deregulacija apoptoze je posledica mutacije gena uključenih u signalne puteve programirane ćelijske smrti, gde onkogeni štite od apoptoze, a tumor supresor geni promovišu apoptozu. Izmene u mehanizmima popravke DNK mogu često olakšati akumulaciju ključnih mutacija u jednoj matičnoj ćeliji koja dovodi do transformisane matične ćelije odgovorne za rast tumora (6).

Inicijalni rast tumora javlja se sa odsustvom, nedovoljnom ili abnormalnom angiogenezom. Ovo produkuje hipoksična mesta u kojima nivo ROS raste, favorizujući opstanak tumora, adaptaciju i progresiju. Iako je precizan mehanizam kojim hipoksija povećava nivo ROS i dalje predmet rasprave, izgleda da je to posledica efekta hipoksije na respiratorni lanac mitohondrija (6).

Najnoviji stav je da je povećana proizvodnja ROS adaptivni proces koji tumorske ćelije koriste da indukuju promene u signalnim putevima korisne za njihovo normalno funkcionisanje. Npr. aktivacija PI3K/AKT signalnog puta, jedna je od glavnih meta ROS, i može promovisati proliferaciju, metaboličku adaptaciju i pokretljivost ćelije. ROS stabilizuju HIF1 α i aktiviraju NRF2, i njihova prekomerna aktivacija može da olakša adaptaciju na hipoksiju, stimuliše angiogenezu i ubrza ćelijsku proliferaciju. Ćelije karcinoma izbegavaju smrt i oštećenje indukovano visokim nivoima ROS povećavajući antioksidativnu zaštitu kao što je GSH koji doprinosi smanjenju ROS. ROS proizvodi NOX (u plazma membrani) kao i mitohondrije i u manjim količinama ponašaju se kao sekundarni glasnici aktivirajući mnoge protein kinaze (PI3/Akt, p38 MAPK i ATM) i transkripcione faktore (Nrf2, NF-kB, p53 i HIF-1) sposobne da doprinose preživljavanju karcinomskih ćelija stimulišući ćelijsku proliferaciju, inflamaciju i angiogenezu (Slika 5). Nadalje, nekoliko onkogeni kao što su KRAS i MYC se povezuju sa povećanom mitohondrijalnom ROS produkcijom (23, 93).



Slika 5. Redoks-signalni putevi uključeni u rast i progresiju karcinoma (112).

Savremena medicina poklanja sve više pažnje oksidativnom stresu kao biohemijskom mehanizmu potencijalno uključenom u patogenetska zbivanja u velikom broju sistemskih bolesti. Predloženo je nekoliko mehanizama koji dovode do oksidativnog stresa kod pacijenata obolelih od karcinoma. Prvi je izmenjen energetski metabolizam, za koji se pretpostavlja da doprinosi simptomima kao što su anoreksija/kaheksija, mučnina i povraćanje. Ovo sprečava normalnu ishranu i snabdevanje nutrijentima kao što su glukoza, proteini, vitamini, što sve dovodi do akumulacije ROS. U uznapredovaloj fazi karcinoma, izmenjen odgovor na insulin sa konkomitantnom hiperglikemijom povezuje se sa produkcijom slobodnih radikala. Drugi mehanizam je nespecifična hronična aktivacija imunog sistema sa povećanom produkcijom proinflammatornih citokina, koji mogu povećati produkciju ROS. Treći mehanizam je upotreba antineoplastičnih lekova, posebno alkilirajućih agenasa i cisplatina. Ovi agensi u velikoj meri proizvode ROS i dovode do oksidativnog stresa (113).

Postoje hipoteze da je regulacija redoks sistema u organizmu, koji uključuje antioksidativne enzime i antioksidanse male molekulske mase, poremećena kod pacijenata sa

karcinomom i da je ovaj poremećaj još izraženiji u fazi uznapredovalog karcinoma. U malignim ćelijama raste nivo ROS što posledično izaziva povećanu ekspresiju antioksidativnih enzima. Oksidativna sredina u novo ustanovljenom malignom fenotipu može provocirati oksidanse da aktiviraju gensku ekspresiju kroz odgovor antioksidanata (15, 23).

Mitohondrije i NADPH oksidaze su dva osnovna izvora endogenih ROS u karcinomima. Najskorije studije pokazuju da postoji komunikacija između ova dva izvora ROS (13).

Inflamatorne ćelije su posebno efikasne u produkciji većine ROS. Aktivacija redoks metabolizma inflamatornih ćelija generiše visoko oksidativnu sredinu unutar organa aerobnih organizama. Većina biohemijskih reakcija koji se odvijaju u makrofazima i neutrofilima, a uključuju aktivaciju plazma membranske NADPH oksidaze, usmerene su ka oslobađanju superoksidnog anjona, vodonik peroksida i hidroksil radikala. Inflamacija deluje kroz formaciju ROS i RNS koji izazivaju oštećenje ćelijskih komponenata. Mnogi proinflamatorni medijatori, posebno citokini, hemokini i prostaglandini, pokreću proces angiogeneze pretežno kontrolisan od strane vaskularnih endotelijalnih faktora rasta. Inflamacija povezana sa tumorom je takođe u korelaciji sa imuno supresijom što omogućava tumorskim ćelijama da ostanu neprimećene od strane imunog sistema. Inflamacija je kritična komponenta u procesu tumorske progresije. Mnogi tumori nastaju sa mesta infekcije, hronične iritacije i inflamacije. Postaje jasno da je tumorsko mikrokruženje, koje je određeno inflamatornim ćelijama neophodan učesnik u neoplastičnom procesu, podstičući proliferaciju, preživljavanje i migraciju. Dodatno, tumorske ćelije preuzimaju neke od signalnih molekula urođenog imunog sistema kao što su selektini, hemokini i njihovi receptori za invaziju, migraciju i metastaziranje (19).

Hronična inflamacija je povezana sa angiogenezom, procesom koji omogućava rast tumora. Angiogeneza je neohodna za povećanje tumorske mase, a makrofazi, trombociti, fibroblasti i tumorske ćelije su najveći izvor angiogenih faktora. Inflamacija u tumorskom mikrokruženju se karakteriše infiltracijom leukocita, različitih u veličini, distribuciji i sastavu, kao što su: tumor-asocirani makrofazi (TAM), mast ćelije, dendritičke ćelije, ćelije prirodne ubice (NK ćelije), neutrofil, eozinofili i limfociti. Ove ćelije proizvode čitav niz citotoksičnih medijatora kao što su ROS i RNS, serin, cistein proteaze, membranske perforišuće agense, matriksmetaloproteinaze (MMP), faktor nekroze tumora α (TNF α), interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) interferone i enzime (19).

Otkriveno je da su tumor-asocirani makrofazi ključni faktori u povezanosti inflamacije i karcinogeneze, a ROS se povezuju sa aktivacijom mitogen-aktivirajuće protein kinaze (MAPK) i aktivacijom transkripcijskih faktora kao što su NF- κ B i AP-1 (13). Ovi signalni putevi su uključeni u proces inflamacije, apoptoze, proliferacije, transformacije i diferencijacije. Aktivacija AP-1 proteina doprinosi bazalnoj genskoj ekspresiji u biološkim sistemima. ROS mogu da aktiviraju AP-1 kroz nekoliko mehanizama, a efekat aktivacije AP-1 je povećana proliferacija ćelija zahvaljujući povećanoj ekspresiji gena stimulacije rasta kao što su ciklin D1 i supresija proteina p21waf. Predlaže se da dok god oksidativni događaji regulišu AP-1 i NF- κ B transaktivaciju, ovi oksidativni događaji mogu biti meta za prevenciju nastanka karcinoma. NF- κ B je eksprimiran i učestvuje u nizu bioloških procesa kao što su ćelijsko preživljavanje, diferencijacija, inflamacija i rast (19).

Hronična inflamacija izazvana traumom cerviksa, bakterijama, virusima, pogotovo HPV virusom je najvažniji faktor u etiopatogenezi karcinoma grlića materice. Ona dovodi do aktivacije monocitno-makrofagnog sistema koji proizvodi veliku količinu ROS. Konstantno visoki nivoi ROS dovode do genetskih oštećenja cervikalnog epitelijuma, vodeći ka transformaciji ćelije i inicijaciji karcinoma grlića materice. Verovatno je da raskidanje DNK lanca omogućavaju učestaliju integraciju HPV-DNK i na taj način doprinose karcinogenezi. Prema tome, moguće je da HPV infekcija indukuje oksidativni stres kod karcinoma grlića materice. Dalji koraci, promocija i progresija iniciranih ćelija, takođe se povezuju sa redoks stanjem kod ljudi (90).

Iako su potencijalni mehanizmi, genomska nestabilnost, aktivacija onkogeni i angiogeneza, kojima oksidativni stres vrši regulatornu ulogu u tumorskom rastu i progresiji, poznati, nekoliko važnih pitanja ostaje otvoreno. Nejasno je da li oksidativni stres i tumor nastaju zbog povećane produkcije oksidansa ili zbog nemogućnosti antioksidativnog sistema odbrane da vrši svoju funkciju. Biohemijski putevi koji regulišu ćelijsku redoks ravnotežu su veoma kompleksni i zato je potrebno sagledati celokupnu sliku (15).

5.1 Lipidna peroksidacija

Brojni podaci ukazuju da nivo MDA u fiziološkim tečnostima može da bude pouzdan indikator stepena tkivnih lančanih reakcija i obima oksidativnog oštećenja ćelija u organizmu. Lipidna peroksidacija je uključena u patogenezu mnogih bolesti uključujući i karcinom. Zna se da produkti lipidne peroksidacije mogu uzrokovati oštećenje DNK. Lipidni hidroperoksidi mogu direktno indukovati kidanje lanaca DNK, a lipidni peroksi i alkoksi radikali mogu

izazvati oksidaciju baza u DNK. Takođe, peroksidi i hidroperoksidi su pokazali tumor-promovišuću aktivnost *in vivo*. Lipidna peroksidacija može imati indirektnu ulogu u konverziji prokarcinogena u konačne karcinogene (8).

U studiji Oltra i sar. nivo MDA je bio povećan u limfocitima pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom (8). Kada su ispitali nivo MDA u plazmi pacijenata sa karcinomom pluća, autori su i u ovom tipu karcinoma dokazali povećan nivo MDA (114). Brojne studije na ginekološkim karcinomima pokazale su viši nivo MDA u tkivu karcinoma u odnosu na zdravo tkivo (115). Povećan nivo TBARS u plazmi i eritrocitima pacijentkinja sa karcinomom grlića materice dokazan je u odnosu na kontrolnu grupu (115, 116, 117). Dokazan je, ne samo povećan nivo MDA u plazmi i tkivu pacijenata sa lokalizovanim karcinomom prostate, već je taj nivo pozitivno koreliran sa već dobro poznatim prognostičkim faktorima za ovu vrstu tumora. Ovi autori su zaključili da indikatori oksidativnog stresa (MDA između ostalih) mogu biti korišćeni za prognostičku procenu lokalizovanog karcinoma prostate (118). MDA je i u serumu pacijenta sa ovarijalnim karcinomom veći u odnosu na zdrave kontrole, ali se ispostavilo da nema razlika u nivou MDA u zavisnosti od stadijuma bolesti (119). Takođe, merenjem nivoa MDA u serumu pacijenata sa tumorom bešike i bubrega dobijene su značajno više vrednosti u uzorcima pacijenata nego kontrola, ali bez razlike u različitim stadijumima bolesti (120, 121). MDA je povećan i u uzorcima seruma, plazme i krvi pacijenata sa karcinomom dojke (8, 122, 123). Ekstremno visok tkivni nivo MDA pokazan je u tkivu karcinoma dojke u odnosu na zdravo tkivo. Ovi autori su povezali povećan nivo MDA sa prisustvom nekroze u invazivnom duktalnom karcinomu, što rezultira nedovoljnom vaskularizacijom tkiva (124). Predlaže se da MDA deluje kao tumor promoter i ko-karcinogeni agens zbog svoje visoke citotoksičnosti. S tim u vezi, u studiji koja je upoređivala nivo MDA i aktivnosti antioksidativnih enzima u plazmi i eritrocitima kod pacijenata sa benignim tumorom dojke (BTD), malignim tumorom dojke (MTD) i grupe zdravih žena, pokazan je veći nivo MDA i u grupi BTD i MTD u odnosu na kontrolnu grupu (125). Slično, ispitujući nivo MDA i aktivnost antioksidativnih enzima u različitim stadijumima karcinoma larinksa, autori su dobili sledeće rezultate: u sva tri stadijuma karcinoma larinksa, nivo MDA bio je značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu. Nije bilo razlika u nivou MDA između prve dve grupe (u ranoj fazi karcinoma) i treće grupe (sa uznapredovalim karcinomom) (69). U različitim stadijumima kolorektalnog karcinoma, evidentan je porast lipidne peroksidacije koji prati progresiju bolesti. Pa ipak, nije bilo statistički značajnih razlika u nivou lipidne peroksidacije poređenjem kroz stadijume bolesti.

Postojeće razlike ovi autori objašnjavaju individualnim razlikama u veličini tumora i konstitutivnom statusu svakog pacijenta (126). Beevi SS i sar. su pokazali da nema razlike u nivoima MDA u različitim stadijumima skvamoznog karcinoma grlića materice (127). Neki autori ipak, prijavljuju više vrednosti MDA kod pacijenata sa CIN promenama, kao i sa cervicitisom, govoreći u prilog tome da je oksidativno oštećenje važan faktor čak i u ranim stadijumima karcinogeneze (97). Veće vrednosti lipidne peroksidacije u odnosu na zdrave kontrole nađeni su u studiji Marinescu i sar. (116). U našoj studiji pokazano je da je nivo lipidne peroksidacije, kao markera oksidativnog stresa, bio viši u svim ispitivanim grupama u odnosu na kontrolnu grupu. Statistički značajno je bio povišen kod pacijentkinja sa lokalno uznapredovalim karcinomom grlića materice u odnosu na ostale tri grupe pacijentkinja. Imajući u vidu da produkcija ROS, koja povećava stepen lipidne peroksidacije, raste sa progresijom bolesti može se pretpostaviti da pacijenti sa uznapredovalim karcinomom grlića materice imaju veći stepen oštećenja ćelijske membrane od pacijenata u nižim stadijumima bolesti (128). Zbog toga, lipidna peroksidacija može biti jedan od mogućih uzroka progresije karcinoma grlića materice (129). Lipidna peroksidacija, nastala na primarnom žarištu, putem cirkulacije može doći do udaljenih tkiva i izazvati oštećenje, dodatno propagirajući čitav proces (101). U našem istraživanju otišli smo korak dalje. Pokušali smo da ustanovimo da li unutar grupe pacijentkinja sa lokalno ograničenim karcinomom grlića materice postoje razlike u odnosu na parametre niskog ili visokog rizika od relapsa bolesti. Kako statistička analiza podataka nije pokazala statistički značajne razlike između ove dve podgrupe pacijentkinja, može se zaključiti da ovaj parameter nije toliko specifičan da bi napravio distinkciju između ove dve podgrupe pacijentkinja.

5.2 Antioksidativni enzimi

Kao odgovor jedinke na oksidativno oštećenje ćelija uspostavljen je specifičan odbrambeni sistem od štetnog delovanja slobodnih radikala, koji je označen kao antioksidativni sistem. Antioksidativna enzimska aktivnost je pokazala različite promene u različitim tipovima karcinoma, što može biti posledica toga što su se za ispitivanja koristili različiti uzorci - krv, plazma ili uzorci tumorskog tkiva (130, 131, 132).

Prekomerna ekspresija antioksidativnih enzima dokazana je u mnogim studijama u raznim tipovima karcinoma. Studije u kojima je dokazan niži nivo antioksidativnih enzima pretpostavljaju istrošenost sistema u prisustvu bolesti. Niže aktivnosti antioksidativnih enzima mogu biti odgovor na povećanu produkciju ROS koja, kako vreme prolazi može biti

neadekvatna da izvrši detoksikaciju povećanog nivoa ROS. Poremećen nivo antioksidativnog sistema odbrane može favorizovati akumulaciju slobodnih radikala, što može indukovati proces metastaziranja. Alternativno, moguće je da je antioksidativni sistem oštećen kao posledica abnormalnosti antioksidativnog metabolizma zbog tumorskog procesa (133). Sa druge strane, autori koji su pokazivali višu aktivnost enzima, objašnjavaju da su enzimi bili aktivniji, kako je bolest progredirala, s obzirom da je postojala veća lezija (verovatno nastala većom produkcijom ROS) koju je trebalo popraviti. Rezultati našeg ispitivanja takođe su u skladu sa literaturnim podacima. Ovi rezultati podržavaju hipotezu da je nivo ROS povećan u malignim ćelijama i zbog toga mogu izazvati prekomernu ekspresiju gena za antioksidativne enzime (8).

Tumorske ćelije su sposobne da se adaptiraju na izmenjenu redoks homeostazu, mogu da razviju alternativne metaboličke puteve, što ih nadalje čini manje osetljivim na induktore stresa kao što su radijacija i hemoterapija (9).

5.2.1 Superoksid dismutaza (SOD)

Značaj i aktivnost superoksid dismutaza intenzivno se istražuju u poslednjih nekoliko decenija. Uglavnom su istraživanja dizajnirana tako da se upoređuju ekspresija gena za SOD i aktivnost SOD između maligno transformisanih i normalnih ćelija. Rezultati pokazuju da se promene u aktivnostima enzima detektuju i u tkivima i u krvi pacijenata sa različitim vrstama karcinoma. Rezultati su kontraverzni jer vrednosti dosta variraju u zavisnosti od vrste organizma i tkiva koje se ispituje. Povišene ili snižene vrednosti SOD se u različitim istraživanjima različito, pa čak i potpuno suprotno tumače. Ovo i nije neverovatno imajući u vidu da su studije proučavale različite vrste tumora, uzorke u različitim stadijumima bolesti i različitim metodama detekcije. Nije potpuno razjašnjeno kako SOD doprinosi protumorigenoj signalizaciji. Jedno objašnjenje je da se aktivnost SOD može promeniti sa transformacijom ćelija i malignom progresijom u skladu sa različitim potrebama tumorskih ćelija u različitim stadijumima za održavanjem njihove pokretljivosti i rasta. To znači da je u početnoj/proliferativnoj fazi tumorske inicijacije, nivo SOD nizak, što može pomoći promovisanju maligne transformacije, a kada tumor progredira u agresivniji fenotip, nivo SOD/aktivnost je povećana, doprinoseći tako povećanju H_2O_2 koji kroz aktivaciju onkogenih i angiogenih puteva, pomaže ćelijama da poprime invazivne osobine (23).

Pojedini autori visoke vrednosti ovog enzima vide kao znak dobre antioksidativne odbrane, dok nizak SOD smatraju znakom smanjenog antioksidativnog kapaciteta. Naime,

niže vrednosti aktivnosti SOD znače i manju sposobnost neutralizacije superoksidnog anjona pa se pokreće lanac stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta sa svim neželjenim reakcijama koje oni nose. Prema ovom viđenju, veća aktivnost SOD značila bi i bolju antioksidativnu zaštitu (134). Visoka aktivnost SOD se, međutim, od strane drugih autora tumači suprotno, odnosno kao znak povećanog oksidativnog stresa. Povećana produkcija ROS u karcinomima vodi do povećane ekspresije SOD proteina (13). U takvim studijama pored visokih vrednosti SOD nađene su i visoke vrednosti drugih antioksidativnih enzima, kao i visoke vrednosti markera 8-OHdG i MDA što se tumači kao znak povećanog oksidativnog oštećenja (114). Međutim, neophodno je posmatrati celokupni redoks status u organizmu, s obzirom da se on smatra glavnim regulatornim faktorom za funkcionisanje i normalne i maligne ćelije. Regulacija ukupnog redoks stanja ćelije je multifaktorijalni i veoma kompleksan proces, a samo tumorsko okruženje individualno i različito, zbog čega se i ne može uspostaviti jedinstven trend u ekspresiji SOD u različitim karcinomima, pa čak ni unutar istih vrsta.

Do sada objavljene studije na temu veze između SOD i malignih ćelija pokazuju veliku varijabilnost u rezultatima. Promene u nivoima ili funkciji SOD2 koje nastaju posttranslacionim modifikacijama imaju direktan uticaj na produkciju, akumulaciju i klirens mitohondrijalne H_2O_2 . Zapravo, neke posttranslacione modifikacije koje se pojavljuju u karcinomima mogu dalje promovisati akumulaciju mitohondrijalne H_2O_2 u tim tkivima. Zato, aktivnost SOD2 može predstavljati primarni generator H_2O_2 ostavljajući mitohondrije da stimulišu signalne puteve što verovatno promoviše agresivniji tumorski fenotip. Zato, SOD2 se ne može smatrati intrinzičkim antioksidansom jer bi njegova sposobnost da detoksifikuje njegov katalitički produkt H_2O_2 zapravo doveo do oksidativnog stresa. Izazov je razumeti pod kojim okolnostima SOD2 ispoljava protektivnu (antioksidativnu), a pod kojim prooksidativnu ulogu. Veliki broj humanih karcinoma pokazuje visok nivo ekspresije SOD, što se povezuje sa agresivnošću tumora. Druge studije nalaze niži nivo ekspresije SOD u različitim ili čak istim vrstama tumora. *In vitro* studije nalaze da povećana aktivnost SOD dovodi do supresije malignog fenotipa (23, 135).

Indukcija MnSOD pokazana je u malignim ćelijama. U eksperimentalnim uslovima faktor nekroze tumora alfa ($TNF\alpha$) dovodi do indukcije MnSOD na nivou mesindžer ribonukleinske kiseline (mRNA) i specifične aktivnosti na ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća, pleuralnog mezotelioma i karcinoma dojke 48 h nakon izlaganja. U humanim ćelijama karcinoma dojke MnSOD na nivou mRNA povećan je 9 do 10 puta od strane $TNF\alpha$, što moguće dovodi do rezistencije na doksorubicin.

Povećanje CuZnSOD na nivou mRNA uočeno je na ćelijskim linijama koje su izlagane zračenju ili ksenobioticima što ukazuje na potencijalni efekat ovog enzima na rast i rezistenciju tumorskih ćelija. Do sada uloga ekstracelularne SOD nije mnogo ispitivana u kontekstu karcinogeneze iako njegova lokacija ukazuje na važnu ulogu ovog enzima u regulaciji angiogeneze i remodeliranja ekstracelularnog matriksa. Utvrđeno je da promene u ekspresiji gena za MnSOD utiču na apoptozu karcinomskih ćelija tako što visok nivo MnSOD korelira sa niskim apoptotskim potencijalom, dok nizak nivo MnSOD povećava apoptozu karcinomskih ćelija (136).

Povećanje MnSOD dokazano je u eritrocitima pacijenata sa nesitnoćelijskim i sitnoćelijskim karcinomom pluća (114, 137). Enzim CuZnSOD nije toliko često ispitivan kod karcinoma pluća. Rezultati pokazuju različite vrednosti, ali generalno ove studije pokazuju da se nivo CuZnSOD ne menja drastično kod karcinoma pluća (114). U gastričnom karcinomu MnSOD značajno je povećan u karcinomskom tkivu u odnosu na zdravo. Povećana je ekspresija MnSOD i u gastričnom karcinomu sa metastazama u limfnim čvorovima, a jedna studija predlaže da se visok nivo MnSOD u gastričnom karcinomu povezuje sa kraćim ukupnim preživljavanjem. U studiji u kojoj je koreliran nivo MnSOD sa venskom invazijom gastričnog karcinoma, prekomerna ekspresija MnSOD povezana je sa povećanom agresivnošću tumora (138). Prilikom ispitivanja ekspresije MnSOD u kolorektalnom karcinomu, takođe, rezultati većine studija pokazali su povećan nivo MnSOD i povezali su ga sa lošom prognozom bolesti i kraćim preživljavanjem. Kod kolorektalnog karcinoma pokazan je i porast aktivnosti SOD sa stepenom progresije karcinoma i dubinom invazije (13, 139). Porast aktivnosti SOD u najvišem stadijumu razvoja bolesti najverovatnije je rezultat povećane mobilizacije SOD zbog najvišeg intenziteta oksidativnog stresa u ovom stadijumu bolesti (126). Kod ezofagealnog karcinoma povećan je nivo MnSOD u tumorskim ćelijama u odnosu na normalne ćelije (13, 140). MnSOD ispitivana je kod različitih vrsta tumora centralnog nervnog sistema: neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma i pokazalo se da je povećana ekspresija kod svih i povezana sa lošom prognozom. Ekspresija je ispitivana u uzorcima seruma, moždanog tkiva i cerebrospinalne tečnosti (141). Aktivnost SOD u tkivu karcinoma dojke, ali i u uzorcima plazme pokazuje interindividualne razlike ali generalno aktivnost i MnSOD i CuZnSOD u ćelijama karcinoma dojke su veće u odnosu na zdravo tkivo. Veća aktivnost povezana je sa dobrom diferentovanošću tumora (122, 142). Studije u kojima je pokazana niža ekspresija MnSOD u uzorcima tkiva in situ tumora dojke u poređenju sa invazivnim karcinomom, ali i sa okolnom tkivom bez tumora, autori

objašnjavaju na sledeći način: MnSOD može delovati kao tumor supresor pod normalnim uslovima, tako da može zaštititi normalno tkivo od napada ROS. Konačno, ekspresija MnSOD je povećana u invazivnom karcinomu kako bi dodatno pomogli tumoru da ošteti okolne ćelije. Stoga, ekspresija MnSOD je veća kod invazivnog karcinoma nego kod karcinoma in situ. Na osnovu dobijenih rezultata, autori ove studije smatraju da je H_2O_2 ključni faktor za objašnjenje zašto je u invazivnom karcinomu veća ekspresija MnSOD. H_2O_2 nastaje uz pomoć MnSOD, i ima sposobnost da prodire slobodno kroz ćelijske membrane i napada okolne normalne ćelije i time pomogne invaziju karcinomskih ćelija. Uzimajući sve navedeno u obzir, ovi autori predlažu da ekspresija proteina za MnSOD u tumorskim tkivima, nezavisno od gradusa tumora ili stadijuma bolesti igra ključnu ulogu u biologiji tumora dojke (143). U uzorcima seruma kod pacijenata sa melanomom, veće su aktivnosti MnSOD u odnosu na kontrole i pokazana je pozitivna korelacija sa progresijom bolesti (144). U studiji karcinoma grlića materice u kojoj je ekspresija MnSOD korelirana sa senzitivnošću na radioterapiju i prognozu nakon radioterapije kod karcinoma grlića materice dobijeni su rezultati koji pokazuju da je 5-godišnje preživljavanje pacijentkinja sa pozitivnom ekspresijom MnSOD statistički značajno lošije od pacijentkinja sa MnSOD negativnom ekspresijom. Takođe, pacijentkinje sa pozitivnom ekspresijom MnSOD imale su značajno veću incidencu rekurencije bolesti od pacijentkinja bez ekspresije, što ukazuje da MnSOD ima protektivno dejstvo na tumorske ćelije od oštećenja radijacijom. Ova studija je predložila MnSOD kao prognostički faktor kod radioterapijskog modaliteta lečenja pacijentkinja sa karcinomom grlića materice (145). Mereći ekspresiju gena za SOD u različitim stadijumima karcinoma grlića materice (LSIL, HSIL, skvamozni cervikalni i adenokarcinom) u uzorcima tkiva autori su dobili značajno veće vrednosti kako je bolest progredirala. Ovi autori su pretpostavili da bi ekspresija SOD mogla biti korišćena kao biomarker za karakterizaciju različitih stadijuma karcinoma grlića materice (146). Značajno povećanje aktivnosti pokazano je u karcinomu bešike (147), nego u zdravom tkivu, dok kod karcinoma bubrega rezultati variraju u odnosu na vrstu karcinoma bubrega (121). Kod karcinoma prostate, većina studija pokazuje niži nivo oba izoenzima kod malignih u odnosu na zdrave ćelije (67). Studija Miar i sar. pokazuje povećan nivo SOD2 izoenzima kod karcinoma prostate, pluća i kolona (148). U saglasnosti sa ovim rezultatima su i studije na uzorcima limfnih čvorova malignog limfoma. Nivo MnSOD je bio viši i povezan je sa prisustvom metastaza i lošom prognozom. Čak je nizak nivo MnSOD povezan sa regresijom bolesti (149). Serumski nivo MnSOD kod pacijenata sa leukemijom je povećan (150). Veoma malo, ili nimalo, se zna o ekspresiji

antioksidativnih enzima u različitim patološkim stadijumima karcinoma. Skoro sve procene rađene su na već potpuno razvijenim karcinomima, zato su potrebna istraživanja u tom smislu. Ukoliko bi se napravile razlike među pacijentima u različitim stadijumima iste vrste karcinoma, određivanje terapijskog modaliteta lečenja bilo bi olakšano.

Napred je već navedeno da je ekspresija gena za MnSOD regulisana citokinima. IFN- γ i TNF- α deluju sinergistički na indukciju ekspresije gena za MnSOD u različitim ćelijskim linijama. Pored citokina, tumor supresorski gen p53 takođe reguliše ekspresiju gena za MnSOD u ćelijama. Naime, prisustvo nefunkcionalnog p53 i proinflamatornih antitumorskih citokina može sinergistički uticati na visoke nivoe ekspresije gena za MnSOD (151).

Mnogo manje podataka u literaturi se nalazi o promenama nivoa i aktivnosti CuZnSOD. U tkivu karcinoma dojke CuZnSOD ispoljava veću aktivnost u odnosu na zdravo tkivo (152). U studiji koja je upoređivala nivo MDA i aktivnosti antioksidativnih enzima u plazmi i eritrocitima kod pacijenata sa benignim tumorom dojke (BTD), malignim tumorom dojke (MTD) i grupe zdravih žena, pokazan je veći nivo GPx i CuZnSOD u grupi BTD u odnosu na kontrolnu grupu, a aktivnost u grupi MTD je bila viša u odnosu na BTD i kontrolnu grupu (101). S druge strane, aktivnost CAT pokazala se statistički značajno većom kod pacijentkinja sa MTD u odnosu i na BTD i na kontrolnu grupu, dok nije bilo razlike u grupi BTD u odnosu na kontrolnu grupu (125).

Ispitujući nivo MDA i aktivnost antioksidativnih enzima u karcinomu larinksa, autori su dobili rezultat da su aktivnosti SOD, CAT i GPx snižene u uzorcima krvi pacijenata sa karcinomom larinksa u odnosu na kontrolnu grupu (69). Ima studija i koje su pokazale suprotne rezultate, tj. povećanje aktivnosti enzima SOD i GPx (153).

Rezultati naše studije pokazuju trend porasta aktivnosti SOD u krvi svih grupa pacijentkinja u poređenju sa kontrolnom grupom, sa statistički značajnim povećanjem u grupi pacijentkinja sa uznapređovalom bolešću. Inflamacija cerviksa može doprineti visokim nivoima SOD, što dalje dovodi do povećanja intracelularnog vodonik peroksida stvarajući okruženje pogodno za oštećenje DNK i promociju karcinoma (146). S obzirom da SOD štiti ćelije od ROS koji igraju ključnu ulogu u patogenezi tokom procesa neoplastične transformacije, očekuje se povećanje aktivnosti SOD kod pacijenata sa karcinomom grlića materice. Demirci i sar. su takođe pokazali povećanje aktivnosti SOD kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice, u poređenju sa kontrolnom grupom (154). Pa ipak, prijavljene su i smanjene aktivnosti SOD u cervikalnom tkivu i u krvi (155, 156). Ovi autori predlažu da je smanjenje nivoa SOD rezultat smanjene ekspresije ovog enzima ili hroničnog izlaganja

oksidativnom stresu u kom se organizam nalazi tokom procesa karcinogeneze i posledično proteozomalne razgradnje SOD. Balasubramaniyan prijavljuje značajno smanjenje aktivnosti SOD u neoplastičnim tkivima u stadijumima II, III i IV (94). Chiou i Hu, Bhuvaraharamurthy i Manoharan povezuju smanjenu aktivnost sa oštećenjem enzima od strane ROS ili deficijencije elemenata cinka ili mangana koji su kofaktori za SOD (110, 156, 157). Na osnovu svega navedenog zaključuje se da se aktivnost menja u toku karcinogeneze grlića materice. Brojne posttranslacione modifikacije proteina mogu uticati na izmenjenu aktivnost SOD. U literaturi se pronalaze podaci o postojanju, kao i o posledicama posttranslacionih modifikacija SOD. Pored poznatih reakcija, glikacije i oksidativne modifikacije, raznim drugim reakcijama kao što je npr. nitracija, fosforilacija, S-glutationilacija, može doći do izmenjene aktivnosti SOD (158, 159). Posledice ovakvih modifikacija u kontekstu karcinogeneze i dalje su nedovoljno poznate.

Elevacija MnSOD bez simultanog povećanja CAT ili GPx dovodi do akumulacije peroksida i oksidativnog stresa i može da ubrza progresiju karcinoma. Različiti podaci mogu biti posledica različitog mehanizma kojim se odvija karcinogeneza u različitim tipovima karcinoma, ali i različitim mehanizmima antioksidativne odbrane koje organizam aktivira kao reakcija na te promene (146).

5.2.2 Katalaza (CAT)

Povećana koncentracija ROS, naročito O_2 i H_2O_2 pored indukcije SOD indukuje i CAT. Promene u aktivnosti CAT su blisko povezane sa promenama aktivnosti SOD.

Promene aktivnosti CAT u samom procesu karcinogeneze nedovoljno su jasni, samim tim i njihov značaj za dijagnozu i tok bolesti. Povećanje CAT javlja se kao kompenzatorni odgovor na povećan nivo H_2O_2 . Znajući da ćelije tumora proizvode veće količine H_2O_2 logično proizilazi objašnjenje da je povećana aktivnost katalaze neophodna kako bi se neutralisala ta povećana koncentracija H_2O_2 (148, 160). Povećane aktivnosti CAT prijavljene su na tumorskim ćelijskim linijama pluća i grlića materice (161). Povećanje aktivnosti CAT dokazano je u krvi pacijenata sa sitnoćelijskim i nesitnoćelijskim karcinomom pluća (162). Nasuprot tome, u tumorskom tkivu sitnoćelijskog karcinoma pluća i adenokarcinoma dobijena je smanjena aktivnost CAT (163). Povećana ekspresija gena za CAT dokazana je u gastričnom karcinomu, melanomu, hroničnoj mijeloidnoj leukemiji, mezoteliomu i kolorektalnom karcinomu (30). Takođe, povećana ekspresija CAT pokazana je na humanim karcinomskim ćelijskim linijama (gastričnim, oralnim, pankreasnim, bešike) izloženim

cisplatinu, bleomicinu, gemcitabinu, mitomicinu, hormonskoj terapiji i jonizujućem zračenju (27). Ekspresija gena za CAT može biti regulisana na više različitih nivoa: transkripcionim, post-transkripcionim, genetskim i epigenetskim. U tkivu karcinoma dojke povećana je aktivnost katalaze (30). Povećana aktivnost CAT u cirkulaciji objašnjava se posttranslacionom aktivacijom CAT. Chiou i sar. su prijavili da promene u aktivnosti antioksidativnih enzima zavise od vrste tumora i stepena oštećenja tkiva (157). Generalno, dobijani su različiti rezultati što se tiče aktivnosti CAT i GPx. Nalaze se studije u kojima je pokazan povećan nivo aktivnosti CAT u limfocitima pacijenata sa leukemijom (150). Smanjen nivo aktivnosti CAT prijavljen je i u uzorcima krvi i tkiva u karcinomu dojke, oralnom i karcinomu pankreasa (30). Smanjena aktivnost CAT je prijavljena u studiji Kolanjiappan i sar. i Manoharan i sar. u cervikalnom tkivu i nekoliko drugih studija u eritrocitima, u tim slučajevima praćena i padom aktivnosti SOD (94). Objašnjava se da je smanjena aktivnost posledica hipermetilacije promotora u genu za CAT ili aktivnosti transkripcionih faktora (164). Wozniak i sar. prijavili su višu aktivnost CAT u eritrocitima kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice u odnosu na kontrole (94). Jedna studija na procenu oksidativnog stresa u ovarijalnom karcinomu pokazala je povećanje vrednosti TBARS, ali i značajan pad enzima SOD i CAT. Ova pojava objašnjena je njihovom istrošenošću zbog neutralizacije lipidnih peroksida kao i sekvencijom od strane tumorskih ćelija. Povećanje lipidne peroksidacije objasnili su neprekidnom ovulacijom i epitelijalnom inflamacijom (165).

Studija sprovedena na ćelijskoj liniji keratinocita pokazala je da su ćelije koje ekspresiraju E7 bile rezistentnije na H₂O₂- indukovanu toksičnost od roditeljskih ćelija, pokazujući značajno smanjenu ćelijsku smrt. Takva povećana rezistencija je udružena sa smanjenim intracelularnim nivoom ROS i paralelnim povećanjem nivoa katalaze. Štaviše, ekspresija katalaze u ćelijama koje ekspresiraju E7 tretirane sa H₂O₂ povećavala se u dozno-zavisnom maniru, podržavajući stav da se povećana rezistencija ćelija koje ekspresiraju E7 pojavljuje kroz hvatanje intracelularnih ROS. Povećana aktivnost katalaze je bila rezultat dvostruke E7 ekspresije, koja je pojačala i aktivnost katalaze i NF-κB, jednog od glavnih transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju gena za katalazu (89). Rezultati naše studije pokazali su povećanje aktivnosti CAT. Aktivnost je imala tendenciju porasta kroz sve 4 grupe, a statistički značajno povećanje pokazalo se u grupi pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom grlića materice. S obzirom da je u našoj studiji i aktivnost SOD rasla, a aktivnosti ovih enzima se, dokazano, menjaju na isti način, ovakav rezultat je bilo logično i

očekivati. Povećana aktivnost SOD ubrzano neutrališe povećanu koncentraciju superoksidnog anjona u uslovima povećanog stresa, pa kao proizvod nastaju veće količine vodonik peroksida kog će nadalje katalisati CAT. Sa porastom nivoa oksidacije, stepen oštećenja ćelije postaje sve veći. Stoga bi potencijalno objašnjenje bilo da sa porastom opterećenja tumorom, raste i aktivnost CAT u cilju odbrane od povećanog oksidativnog stresa izazvanog tumorskim okruženjem.

5.2.3 Sistem glutationa

Sistem glutationa uključuje: GSH, GPx, GR i GST. Enzimi koji pripadaju grupi GST su velika familija široko rasprostranjenih katalitičkih i vezujućih enzima koji pomažu konjugaciju glutationa sa elektrofilnim centrom niza hidrofobnih molekula. Oni su sekundarni antioksidativni enzimi i igraju ključnu ulogu u zaštiti ćelija od mnogih citotoksičnih i karcinogenih hemikalija, ali učestvuju i u mnogim metaboličkim procesima kao što su sinteza proteina i nukleinskih kiselina. Brojne toksične hemikalije, uključujući supstance koje su karcinogeni i mutageni, su supstrati za GST (30). Određene forme GST se pojačano eksprimiraju u malignim tumorima i njihove genetske varijacije (polimorfizam) se povezuju sa malignom transformacijom. Polimorfizam nekih članova familije GST (GSTM1 i GSTT1) povezuje se sa rizikom od razvoja skvamoznog karcinoma grlića materice. Aktivnost GST je povećana u većini humanih karcinoma i može predstavljati marker neoplazmi. Njihova povećana ekspresija povezuje se sa rezistencijom na lekove i lošijom kliničkom prognozom (89).

Povećana aktivnost GST pokazana je kod tumora dojke (166). Postoje objašnjenja da je povećanje aktivnosti GSH neophodno kako bi se obnovile dovoljne koncentracije antioksidanata i da bi se stimulisali skevendžer enzimi neophodni da se suprotstave štetnim efektima slobodnih radikala. GSH je sam po sebi snažan antioksidans i njegov metabolizam je efikasno uključen u zaštitu tumorskih ćelija od apoptoze, ali i u rezistenciju na lekove i zračenje. Tumorske ćelije su sposobne da povećaju sopstvene nivoe GSH i ovo dovodi do rezistencije na derivate platine (167). Na primer, povećano preuzimanje cisteina za sintezu GSH čini ćelije karcinoma dojke rezistentne na tamoksifen. Iz svega navedenog se logično zaključuje da je aktivnost GST, kao njegovog glavnog katalizatora, takođe povećana (9). GST je bio povećan u karcinomu prostate (67), a smanjen u uzorcima tkiva kolorektalnog karcinoma (139).

Na HPV-16 pozitivnim tkivima sakupljenim od pacijentkinja sa invazivnim skvamoznim karcinomom grlića materice ili visokodisplastičnim lezijama pokazan je porast nivoa GST ekspresije u displastičnom tkivu i još veće u uzorcima karcinoma u poređenju sa kontrolama (89). Beevi i sar. su takođe dokazali povećan nivo GST (127). Rezultati našeg rada govore u prilog povećanju aktivnosti GST. Statistički značajne razlike pokazane su u grupi pacijentkinja sa uznapređovalom bolešću u odnosu na ostale tri grupe. Povećana aktivnost GST se može smatrati adaptivnim odgovorom organizma na oksidativni stres, na šta i ukazuje visok nivo lipidne peroksidacije.

Glutation peroksidaza je seleno-zavisan enzim koji katalizuje reakciju glutaciona i H_2O_2 ili organskih hidroperoksida. Njegov nivo je povećan uglavnom kao odgovor na povećanu produkciju slobodnih radikala. Nekada su se hidroperoksidi smatrali toksičnim jedinjenjima, dok se danas zna da učestvuju u procesima ćelijske signalizacije. U svrhu održavanja ćelijske homeostaze, potreban je optimalan nivo hidroperoksida, iz čega proizilazi različita uloga glutacion peroksidaza i postojanje različitih izoformi. Sve izoforme imaju funkciju da inhibiraju inicijaciju i metastazu karcinoma, ali različito utiču na rast karcinoma (29, 32). Studije koje su ispitivale aktivnost enzima kod pacijenata sa karcinomom dojke pokazale su veću GPx aktivnost u tkivu pacijenata sa karcinomom dojke nego u zdravom tkivu (168). Supstitucija dve aminokiseline u strukturi GPx enzima povezuje se sa povećanim rizikom od karcinoma dojke, pluća i bešike (30, 32). Različiti rezultati istraživanja još jedan su pokazatelj da se karcinogeneza u različitim tipovima karcinoma odvija različitim mehanizmima. U velikom broju karcinoma dokazana je smanjena ekspresija ovog enzima (132). Smanjenje je pokazano u plazmi pacijenata sa kolorektalnim karcinomom i to: statistički značajne razlike u uzorcima svih stadijuma bolesti u odnosu na kontrolu, ali bez značajnih razlika kada se porede stadijumi međusobno. Pad aktivnosti je pokazan i kod enzima GR, s tom razlikom što su značajne razlike evidentne i kroz stadijume bolesti. Progresija bolesti praćena je padom aktivnosti GR i to značajan pad između TNM II i TNM IV kao i TNM III i TNM IV. Nije sasvim jasno da li je smanjenje aktivnosti GR posledica redukcije u snabdevanju glutacionom i/ili dostupnosti NADPH ili je rezultat inhibicije na nekom drugom regulacionom nivou (126). Više vrednosti u aktivnostima GPx dokazane su u karcinomu prostate (148). Studije na bubrezima, prostati i tiroidnoj žlezdi pokazale su nižu aktivnost i GPx i GR kod pacijenata u odnosu na kontrole (67, 121, 169). Manju i sar. su izmerili smanjene nivoe GSH, GPx i GST u cirkulaciji pacijenata sa karcinomom grlića materice (94). Takođe postoje i konflikti rezultati. Ekspresija gena za GR je povećana, kao i

aktivnost GR enzima u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na marginalno tkivo kao i na zdravo tkivo kolorektalnog karcinoma. Povećana aktivnost GR u tumorskim ćelijama može stvoriti specijalne uslove koji pogoduju tumoru. GR je uključen u ćelijsku odbranu produkujući glutation. Sadržaj GSH u tumorskim ćelijama kontroliše potencijalne promene povezane sa rastom kao što su mutageni mehanizmi, invazivne tumorske ćelije, preživljavanje i smrt i osetljivost na terapiju. Povećana aktivnost objašnjava se povećanom ekspresijom ovog enzima aktivacijom brojnih transkripcionih faktora, kao što je npr. Nrf2 koji se smatra prvom linijom odbrane od oksidativnog stresa (41, 68). U uslovima blagog oksidativnog stresa, snižena aktivnost GPx može biti kompenzovana aktivnošću katalaze, što nije slučaj u uslovima jakog oksidativnog stresa. Nivoi ovog enzima u krvi malobrojni su i različiti. U krvi pacijenata sa leukemijom, Hočkinovim limfomom, limfosarkomom aktivnosti su u nivou normalnih vrednosti. Sa druge strane, nalaze se studije u kojima je pokazan povećan nivo GPx u limfocitima pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom. Povećana aktivnost GPx je dalje predložena kao marker proširenja populacije monoklonalnih B ćelija. Ona predstavlja karakteristiku ovih ćelija i može reflektovati stadijum maturacije ćelija hronične limfocitne leukemije (170). Ali, ima i studija u kojima je vrednost ovog enzima nepromenjena u karcinomu kolona i pluća (148).

Rezultati naše studije, nisu pokazali promene u aktivnosti GPx i GR sa pogoršanjem bolesti. Slični rezultati su uočeni i u studiji koja je pratila pacijente sa nesitnoćelijskim i sitnoćelijskim karcinomom pluća, gde su aktivnosti GPx i GST bile neizmenjene (132). Blunt i Fridovich su otkrili da GPx može biti inaktiviran u stanju povećanog oksidativnog stresa od strane superoksidnog anjona. Takođe, i toksični ligandi kao što je MDA mogu delimično inhibirati GPx (171). U našem radu aktivnost SOD je bila povećana, što ukazuje da su nivoi superoksidnih anjona bili povišeni i potencijalno inaktivisali GPx. Na osnovu dobijenih rezultata za GR i GPx možemo zaključiti da sistem glutationa, u našoj studiji, ne igra glavnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa kod pacijentkinja sa karcinomom grlića materice.

Na osnovu gore izloženih rezultata naše i ostalih studija uočavaju se razlike u nivoima aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima i objašnjenja bi mogla da se traže u različitim eksperimentalnim protokolima u smislu različitih metoda, načina i vremena uzorkovanja, vrste samih uzoraka, kao i stadijuma bolesti u kojima se uzorkovanje vršilo.

Kada govorimo o razlikama u aktivnosti svakog ispitivanog enzima između podgrupa unutar grupe sa lokalno ograničenom bolešću, nije bilo statistički značajnih razlika. Aktivnost

nijednog od ispitivanih enzima nije se pokazao kao dovoljno specifičan parametar da bismo odredili razlike između pacijentkinja sa niskim i visokim rizikom od relapsa bolesti.

5.3 Razdvajanje grupa pacijentkinja kao posebnih klastera

Razdvajanje različitih grupa javilo se kao rezultat određenog nivoa lipidne peroksidacije i kao rezultat određenog nivoa superoksid dismutaze. Zbog visoke varijabilnosti dobijenih rezultata položaj evaluiranih pacijenata u prostoru definisanom prvim dvema kanonijskim diskriminantnim osama pokazuje da nema mogućnosti razdvajanja grupa zasnovanom na utvrđenim nivoima oksidativnog stresa kod pacijenata. Međutim, može se zaključiti da su pacijenti koji pripadaju prvim trima grupama pozicionirani pretežno u pozitivnom delu prve kanonijske diskriminantne ose (CA1) kao rezultat niskog nivoa lipidne peroksidacije. Sa druge strane, veliki broj pacijenata iz grupe IV lokalizovan je u negativnom delu CA1 što je rezultat viših nivoa lipidne peroksidacije. Otkrivene su sličnosti između prve tri grupe koje se zasnivaju na određenim nivoima oksidativnog stresa, uz odvajanje grupe IV kao posebnog klastera.

5.4 8-OHdG

Oksidativna modifikacija DNK dovodi do promene strukture DNK koje dalje vode do genetskih oštećenja. Posledice ovakvih modifikacija mogu biti aktivacija protoonkogeni i/ili inhibicija tumor supresorskih gena (172).

Na određivanje koncentracije 8-OHdG u urinu pacijentkinja sa karcinomom grlića materice u našem eksperimentu smo se odlučili jer ovaj parametar predstavlja jedan od najpouzdanijih i najčešće određivanih biomarkera oksidativnog oštećenja DNK, jer se čak i pri vrlo niskom stepenu oksidativnog oštećenja 8-OHdG izlučuje urinom.

Istraživanje na pacijentima sa karcinomom tiroidne žlezde pokazalo je povećan nivo 8-OHdG u serumu pre operativnog tretmana. Koncentracija 8-OHdG posle operacije bila je približno ista kao kod zdravih kontrola. Takođe, poređenjem koncentracije 8-OHdG u različitim stadijumima ove bolesti, pokazan je viši nivo 8-OHdG kod pacijenata u 4 fazi bolesti nego u ranijim fazama (173).

Da je oksidativno oštećenje i disfunkcija popravke DNK povezana sa karcinogenezom, dokazano je i u studiji koja je upoređivala ekspresiju 8-OHdG u DNK iz uzorka tkiva ovarijalnog karcinoma, okolnog tkiva i zdravog tkiva, u nekoliko stadijuma

ovarijalnog karcinoma. U ovoj studiji poređeno je preživljavanje pacijenata, merenjem hOGG1. Nivo 8-OHdG je bio značajno viši u tkivu tumora nego u okolnom tkivu što se tiče ovarijalnog karcinoma visokog stadijuma. Međutim, ovo nije bio slučaj kod karcinoma niskog stadijuma ili benignom karcinomu. Povećan nivo 8-OHdG je indikator lošijeg ukupnog preživljavanja i skraćenog vremena do progresije bolesti. Značajno se smanjuje nivo proteina hOGG1 u tumoru visokog stadijuma, što nije slučaj kod tumora blažeg stadijuma niti benignog tumora u poređenju sa okolnim tkivom. Niža ekspresija hOGG1 povezana je sa pozitivnim rezultatom za p53 (174).

Slične rezultate dobili su i autori koji su merili nivo 8-OHdG u serumu pacijentkinja sa epitelijalnim ovarijalnim karcinomom u studiji koja je imala za cilj da pokaže da li 8-OHdG može da bude prognostički faktor u ovom tipu karcinoma. Visok serumski 8-OHdG bio je prediktor lošeg preživljavanja, naročito u nižim stadijumima bolesti (stadijum 1 i 2). Nivo 8-OHdG i u serumu i u tumorskom tkivu bio je povezan sa tradicionalnim faktorima loše prognoze, nakon čega su autori zaključili da merenje 8-OHdG može biti dobar prognostički alat za epitelijalni ovarijalni karcinom (175).

Chang i sar. su prijavili da viši sadržaj 8-OHdG u urinu može predstavljati senzitivni biomarker kolorektalnog karcinoma (64). Takođe, povišen nivo pokazan je u DNK izolovanom iz limfocita pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. U studiji koja je merila nivo 8-OHdG u plazmi, povećan nivo 8-OHdG je povezan sa razvojem kolorektalnog karcinoma. Ipak, Dincer i sar. su u svojoj studiji došli do zaključka da nizak plazma nivo 8-OHdG udružen sa izmenjenom aktivnošću antioksidativnih enzima, može implicirati defektnu popravku oksidativnog oštećenja DNK kod pacijenata sa gastričnim i kolorektalnim karcinomom (176). Sa druge strane, postoje i studije koje nisu pokazale razliku u nivoima 8-OHdG u limfocitima i urinom izlučenog 8-OHdG. Teško je isključiti sve faktore koji bi mogli uticati na status oksidativnog oštećenja DNK i doprineti povećanju nivoa 8-OHdG u čitavom ljudskom organizmu (55). Pored toga što se koristi kao biomarker endogenog oksidativnog oštećenja DNK, on predstavlja i faktor rizika mnogih bolesti pa i karcinoma. Veći nivo oksidativnog stresa tj. neadekvatne aktivnosti DNK reparacionog sistema, vodi povećanju koncentracije 8-OHdG. Kada se nivo 8-OHdG posmatra u kontekstu različitih stadijuma bolesti, rezultati su kontraverzni. Neke studije ne nalaze razliku u nivou 8-OHdG kroz faze razvoja kolorektalnog karcinoma, dok neke druge pak ukazuju na viši nivo 8-OHdG u uznapredovaloj fazi kolorektalnog karcinoma, u odnosu na ranu fazu (55).

Ispitujući vezu između oksidativnog stresa i gastričnog karcinoma, autori su pokazali porast serumskog 8-OHdG kod pacijenata sa gastričnim karcinomom u odnosu na zdrave kontrole. Oni predlažu teoriju da veće oštećenje DNK u gastričnom karcinomu, ukazuje na značajnu ulogu ROS u karcinogenezi želuca, zajedno sa izmenjenom antioksidativnom aktivnošću, i zato 8-OHdG u serumu može da bude senzitivni biomarker za pacijente sa karcinomom želuca (177, 178).

Poređenjem 8-OHdG kod tumora mozga različitog gradusa pokazano je da je broj 8-OHdG pozitivnih ćelija bio veći kod tumora visokog stepena. Nivo 8-OHdG je bio značajno veći kod tumora gradusa IV, u odnosu na I i II. Dodatno, nivo 8-OHdG bio je veći kod tumora gradusa II nego kod tumora gradusa I (179).

Viši nivo 8-OHdG autori su pronašli u tkivu uterinog mioma, u poređenju sa tkivom bez tumora. Pozitivna korelacija pokazana je između veličine tumora i količine 8-OHdG (180).

U svrhu procene oksidativnog oštećenja i njegove uloge u karcinomu dojke, u jednom istraživanju autori su merili urinarni 8-OHdG kod pacijenata sa karcinomom dojke, benignim bolestima dojke i kontrolama i dobili značajno više vrednosti 8-OHdG kod pacijentkinja sa karcinomom dojke u poređenju ne samo sa zdravim pacijentkinjama već i u odnosu na pacijentkinje sa benignim bolestima. Između pacijentkinja sa benignim bolestima i kontrolnom grupom nije bilo razlike, zbog čega je predloženo da se urinarni 8-OHdG može koristiti kao potencijalni biomarker za procenu rizika, rani skrining i detekciju karcinoma dojke, pogotovo u diferencijaciji pacijentkinja sa karcinomom i benignim bolestima (181). Predloženo je zatim da bi smanjenje oksidativnog stresa bilo važno u primarnoj prevenciji karcinoma dojke.

Stepen ekskrecije 8-OHdG urinom povezan je sa malignim potencijalom bolesti. U jednoj studiji u kojoj je meren urinarni nivo 8-OHdG kod pacijenata sa karcinomom pluća predloženo je da kapacitet organizma da popravlja oksidativne modifikacije DNK može biti oslabljen kod pacijenata sa karcinomom (182).

Povećana koncentracija urinarnog 8-OHdG i njegovih analoga detektovana je kod pacijenata sa tumorom bešike i prostate u poređenju sa zdravim kontrolama. Dalje, serumski nivo 8-OHdG kod pacijenata sa karcinomom prostate bio je veći od nivoa 8-OHdG kod pacijenata sa benignom hiperplazijom prostate i kontrola. Pokazano je da postoji značajna direktna povezanost nivoa 8-OHdG sa ostalim značajnim kliničkopatološkim faktorima kao što su PSA, Gleason skor i metastaza (183).

8-OHdG bio je viši u uzorcima pacijenta sa hematološkim malignitetima u odnosu na zdrave kontrole. Dodatno, značajno veći nivo urinarnog 8-OHdG pronađen je u uznapređovalom stadijumu bolesti. Nijedan simptom, dob pacijenata, pušenje, pol nisu imali uticaja na nivo 8-OHdG. Autori ove studije smatraju da urinarni 8-OHdG može biti pouzdan prognostički marker kod pacijenata sa limfomom. Sam tumor produkuje ROS spontano, što rezultuje povećanjem 8-OHdG u DNK. Produkcija velike količine vodonik peroksida dokazana je u nekoliko ćelijskih linija humanih karcinoma. Oksidativni stres koji nastaje direktno iz karcinomskih ćelija je obično nedovoljan da izazove ćelijsku smrt. Smanjenje urinarnog 8-OHdG nakon davanja hemioterapije kod pojedinih tumora, reflektuje redukciju tumorske mase i potkrepljuje činjenicu da urinarni 8-OHdG potiče iz tumorskih ćelija. S obzirom da 8-OHdG ima tendenciju da se smanjuje nakon hemioterapije, pretpostavlja se da urinarni 8-OHdG reflektuje veličinu tumorske mase (184). Kod pacijenata sa limfomom, urinarni 8-OHdG je pozitivno korelirao sa performans statusom, stadijumom bolesti i ostalim parametrima prognoze limfoma. Veći nivo 8-OHdG u uznapređovalom stadijumu bolesti i kod pacijenata sa lošim performans statusom, prema ovim autorima, čini urinarni 8-OHdG dobrim prognostičkim markerom uz pomoć kog bi se moglo proceniti preživljavanje pacijenata sa limfomom (185). U limfocitima pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom evidentno je povećanje 8-OHdG (186).

Cervikalna karcinogeneza je multistepeni proces, koji se razvija kroz faze bolesti. Invazivnom karcinomu prethode displastične lezije koje su povezane sa HPV infekcijom. Iako virusna infekcija igra značajnu ulogu, tačan mehanizam za razvoj karcinoma grlića materice i dalje je nepoznat. Nivo 8-OHdG procenjivan je u humanim cervikalnim ćelijama i koreliran sa prisustvom HPV infekcije i prekanceroznim lezijama. Rezultati su pokazali značajne razlike u sadržaju 8-OHdG među normalnim ćelijama, displazijama niskog i displazijama visokog stepena i to na sledeći način: između normalnih ćelija i HSIL, LSIL i HSIL, dok nije bilo statistički značajnih razlika između normalnih ćelija i LSIL. Što se tiče HPV statusa, nije bilo razlike između HPV+ i HPV- pacijenata. Prema tome, uticaj nivoa 8-OHdG u povećanju rizika od displazije je konstantan kroz stepene SIL. Značajne razlike koje postoje u sadržaju 8-OHdG dokazuju da oksidativno oštećenje DNK može igrati važnu ulogu u cervikalnoj karcinogenezi (187).

U našoj studiji, nivo 8-OHdG u urinu meren je gasno masenom spektrometrijom i koreliran u 4 ispitivane grupe. Statistički značajno veće vrednosti pokazane su u grupi pacijentkinja sa uznapređovalom bolešću u odnosu na sve ostale grupe. Prateći nivo 8-OHdG

i kroz tri grupe pacijentkinja u nižim stadijumima bolesti, takođe je jasno vidljiv trend porasta sa porastom stadijuma bolesti.

Poznat nam je mehanizam cervikalne karcinogeneze koji uključuje HPV i proteine E6 i E7 koji mogu da interaguju i inaktiviraju p53 i pRb tumor supresorske proteine (87, 90). Međutim, predlaže se postojanje drugih mehanizama koji mogu sinergistički delovati sa HPV infekcijom u procesu cervikalne transformacije. Pretpostavljamo da je oksidativno oštećenje izazvano različitim ROS jedan od njih. Takođe, predlažemo da je da je porast 8-OHdG posledica nepoznatog ne-HPV molekularnog događaja. Naši rezultati stoga ukazuju da je 8-OHdG potencijalni marker kako za procenu rizika od karcinoma, ranu detekciju, tako i za tretman i prognozu.

5.5 Potencijalni prediktivni značaj markera oksidativnog stresa na relaps bolesti

Varijacije u prognozi i preživljavanju pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom grlića materice zavise od velikog broja faktora (FIGO stadijum, histopatologija, terapijski modalitet i vreme praćenja). Delimično, ove razlike mogu se objasniti izmenjenim oksidativno-antioksidativnim sistemom u ćelijama karcinoma koje vode rezistenciji na terapiju ili progresiji tumora kod nekih pacijenata i dužem preživljavanju bez progresije bolesti kod drugih.

MnSOD ekspresija u ćelijama karcinoma grlića materice povezana je sa lošijom prognozom bolesti ovih pacijentkinja, potencijalno zbog povećane rezistencije na radioterapiju (105). Predloženo je da prekomerna ekspresija MnSOD pruža otpor intracelularnim oksidativnim mehanizmima koji normalno inhibiraju rast i proliferaciju ćelija karcinoma, time doprinoseći agresivnijem ponašanju ćelija karcinoma i rezistenciji na terapiju (106).

Svega mali broj studija, evaluirao je oksidativni stres kod pacijenata sa cervikalnim karcinomom prospektivno, fokusirajući se na promene biomarkera oksidativnog stresa posle odgovarajućeg tretmana i tokom perioda praćenja i njihovog prognostičkog značaja.

U studiji Sharma i sar., lipidna peroksidacija se smanjila i aktivnost antioksidativnih enzima porasla kako bi se normalizovala nakon 4 meseca posle tretmana i ostala u granicama normalnih vrednosti nakon jedne godine kod pacijentkinja sa kompletnim odgovorom, dok kod pacijentkinja sa parcijalnim odgovorom ili stabilnom bolešću, nije došlo do normalizacije (94). Mila-Kierzenkowska i sar. prijavili su normalizaciju aktivnosti nivoa glutation

peroksidaze, katalaze i TBARS oko 6 meseci posle brahiterapije (107). U studiji Bhuvaramurthy i sar. ovi parametri su se vratili na normalne vrednosti u različitim nivoima u zavisnosti od terapijskog modaliteta (103). U studiji Srivastava i sar., nivo antioksidativnih enzima nastavio je da opada nakon perioda praćenja, dok se nivoi lipidne peroksidacije nisu značajnije menjali (108).

Dodatno, u radu smo istraživali korelaciju između ispitivanih parametara i relapsa bolesti. Predloženo je da biomarkeri oksidativnog stresa mogu biti iskorišćeni kao prediktori odgovora na terapiju, relaps bolesti i preživljavanje pacijentkinja sa karcinomom grlića materice (101, 110, 111). Međutim, i dalje dosta toga ostaje nepoznato o potencijalnoj vezi između biomarkera oksidativnog stresa i odgovora na terapiju i podložnosti relapsu bolesti pacijentkinja sa karcinomom grlića materice. Dosadašnje studije uglavnom su fokusirane na karcinogenezu i biomolekularnu dijagnostiku karcinoma. Ispitali smo nivo 8-OHdG, MDA i antioksidativnih enzima kod pacijentkinja sa lokalno uznapredovalim karcinomom grlića materice pre tretmana i poredili ove rezultate između tri grupe pacijentkinja formirane nakon perioda praćenja, prema vremenu preživljavanja i relapsu bolesti. Cilj je bio da se odredi na koji način su ispitivani biomarkeri povezani sa relapsom bolesti i da procenimo njihov potencijal u budućim istraživanjima i kliničkoj upotrebi.

U ovaj deo istraživanja uključeno je 45 pacijentkinja sa novodijagnostikovanim uznapredovalim karcinomom grlića materice (FIGO IIa-IV). Sve pacijentkinje su tetirane na isti način (konkomitantnom hemoiradijacijom) nakon inicijalne dijagnostike i prikupljanja uzoraka. Nije bilo statistički značajnih razlika između ispitivane tri grupe što se tiče aktivnosti SOD, CAT, GPx, GR, GST i vrednosti TBARS i 8-OHdG. Uočeno je da diskriminacijama među ispitanim pacijentkinjama statistički značajno doprinose vrednosti dobijene za aktivnosti katalaze i glutation-S-transferaze. Položaj ispitanih pacijentkinja pokazao je grupisanje pacijentkinja bez recidiva, odnosno grupisanje pacijentkinja sa recidivima. Takođe, pokazano je odvajanje pacijentkinja bez recidiva od grupe pacijentkinja kod kojih se recidiv javio u roku od 6 meseci, odnosno kasnije.

Individualno, parametri oksidativnog stresa u našoj studiji nisu pokazali značajnije razlike između tri grupe. Analiza svih testiranih biomarkera oksidativnog stresa između tri grupe pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom grlića materice koje su podlegle istom standardnom tretmanu pokazala je između ostalog da su aktivnosti CAT i GST bile najbolji prediktori rekurencije bolesti kod ovih pacijentkinja. Na osnovu aktivnosti ova dva oksidativna enzima, separacija grupe pacijentkinja kod kojih nije došlo do rekurencije bolesti

nakon perioda praćenja od ostale dve grupe kod kojih je došlo do rekurencije bolesti je bila moguća. U našem istraživanju, parametri oksidativnog stresa imaju određenu prediktivnu vrednost na ishod bolesti pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom grlića materice nakon konkomitantne hemo-radioterapije.

Naše razumevanje endogenih mehanizama karcinogeneze uzrokovanih oksidativnim stresom je značajno napredovalo, ali razjašnjavanje molekularnog obrasca karcinogeneze mora se dalje rasvetljivati da bi se maligne bolesti na pravi način lečile. Promena oksidativnog statusa u malignim oboljenjima je složen problem koji zahteva različite pristupe od ispitivanja enzimske aktivnosti do genske ekspresije. Ispitivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane u malignim oboljenjima ima za cilj da utvrdi vezu između promena u oksidativnom statusu i nastanka i toka bolesti. S obzirom da je hronični oksidativni stres pratilac malignih oboljenja, jedan od ciljeva je i utvrditi da li određeni parametri antioksidativnog statusa (aktivnost enzima, ekspresija gena, produkti oksidativnog stresa kao MDA i 8OHdG) mogu poslužiti kao biomarkeri za ove bolesti. Njihov prognostički značaj je predmet interesovanja brojnih istraživanja. Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi procesa apoptoze, ćelijskog ciklusa i ćelijske adhezije su značajni za nastanak i tok malignih bolesti.

Razumevanje ekspresije i regulacije antioksidativnih enzima u malignim tumorima su neophodne za razvoj racionalnih strategija za terapijske intervencije. Rezultati ovakvih studija predlažu nove terapije karcinoma, zasnovane na modulaciji ćelijskog redoks stanja. Nivoi antioksidativnih enzima u tumorima su često visoki i povezani sa lošom diferencijacijom i rapidnom proliferacijom tumora. Indukcija antioksidativnih enzima u tumorima je verovatno inicirana povećanim nivoom oksidativnog stresa što je opet povezano sa ubrzanim metabolizmom maligne ćelije koja podleže nekontrolisanom rastu. S obzirom da je oksidativni stres primarni stimulus za indukciju antioksidativnih enzima, može se očekivati da će maligne ćelije uglavnom biti u oksidisanom redoks stanju.

Rizik od progresije bolesti je zavisao od mnogih faktora uključujući i faktore okruženja, somatske genetske promene i identifikacija biomarkera povezanih sa ovim procesom mogao bi pomoći rasvetljavanju molekularnih događaja i mehanizama povezanih sa cervikalnom karcinogenezom i identifikaciji prognostičkih ili prediktivnih markera.

6 ZAKLJUČAK

U odnosu na postavljene ciljeve istraživanja zaključili smo da postoje statistički značajne razlike između kontrolne grupe (zdravih žena), pacijentkinja sa prekanceroznim lezijama na grliću materice (HSIL), pacijentkinja sa lokalno ograničenim (FIGO Ia-Ib) u odnosu na pacijentkinje sa lokalno uznapredovalim tumorom grlića materice (IIa-IV) u sledećem:

- pokazateljima oštećenja DNK
 - koncentracija 8-OHdG
- pokazateljima oksidativnog stresa
 - intenziteta lipidne peroksidacije (TBARS)
- pokazateljima antioksidativne odbrane
 - određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima
 - superoksid dismutaze (SOD)
 - katalaze (CAT)
 - glutation-S-transferaze (GST)

Nisu pokazane razlike između ispitivanih grupa u aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR).

Nisu pronađene razlike u koncentraciji 8-OHdG, proizvoda lipidne peroksidacije (TBARS) i aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GST, GPx, GR) unutar grupe pacijentkinja sa lokalno ograničenim karcinomom grlića materice podeljenih u dve podgrupe sa niskim i visokim rizikom u odnosu na relaps bolesti.

Pokazana je pozitivna korelacija aktivnosti CAT i GST i rekurencije bolesti, te postoji potencijal za buduća istraživanja i kliničku upotrebu. Aktivnosti CAT i GST bile su najbolji prediktori rekurencije bolesti kod definisanih pacijentkinja. Na osnovu aktivnosti ova dva oksidativna enzima, separacija grupe pacijentkinja kod kojih nije došlo do rekurencije bolesti nakon perioda praćenja od ostale dve grupe kod kojih je došlo do rekurencije bolesti je bila moguća. Pokazali smo da parametri oksidativnog stresa imaju određenu prediktivnu vrednost na ishod bolesti pacijentkinja sa uznapredovalim karcinomom grlića materice nakon konkomitantne hemo-radioterapije.

Povećan nivo antioksidativnih enzima može predstavljati adaptivni mehanizam ćelije, s obzirom na to da prekomerna produkcija ROS, posredovana tumorskim opterećenjem, može povećati transkripciju gena koji kodiraju antioksidativne enzime. Više vrednosti SOD, CAT i GST kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim karcinomom grlića materice mogu se takođe objasniti povećanjem genske ekspresije ili povećanjem ovih enzima kao odgovor na oksidativno oštećenje. Oksidativni stres se značajno povećava kod maligniteta, s obzirom da karcinomske ćelije proizvode oksidanse, što je i u našem radu bilo potvrđeno povećanim nivoom lipidne peroksidacije. Povećan nivo produkcije slobodnih radikala često izaziva povećanje nivoa antioksidativnih enzima, što postaje još više izraženo u podmaklim stadijumima bolesti. Naša studija je u skladu sa ovom tvrdnjom, s obzirom da smo pokazali visok stepen lipidne peroksidacije, visok nivo 8-OHdG i aktivnosti antioksidativnih enzima u odmaklom stadijumu karcinoma grlića materice.

Biomarkeri oksidativnog stresa su varijabilni kod pacijenata sa karcinomom grlića materice, jer imaju različite vrednosti kod pacijenata sa karcinomom i kod zdravih ljudi i u različitim stadijumima bolesti. Pored toga, oni pokazuju razlike nakon tretmana karcinoma. Značajna istraživanja su potrebna da bi se ustanovio precizan obrazac ovih varijacija i njihov uzrok kako bi se budući nalazi mogli prevesti u kliničku upotrebu. Imajući u vidu prognostičku vrednost biomarkera oksidativnog stresa u karcinomu grlića materice, prospektivne randomizovane studije sa većim grupama pacijenata i dužim periodom praćenja su neophodni da bi se doneli konkretni zaključci. Rezultati nekolicine dosadašnjih studija, opravdavaju dalja istraživanja.

7 REFERENCE

1. Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperth.* 2014; 30(7): 513-23.
2. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014; 94(3): 909-50.
3. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules.* 2015; 5(2): 472-84.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA; 2015.
5. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015; 5(35): 27986-8006.
6. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 55-74.
7. Tafani M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, Polese M, et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: Article ID 3907147.
8. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 2016; 90(1): 1-37.
9. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38(7): 592-607.
10. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2014; 2(1): 17.

11. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1): 9-19.
12. Kabel AM. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World J Nutr Heal.* 2014; 2(3): 35-8.
13. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 80: 50-64.
14. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* 2014; 2: 535-62.
15. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology.* 2014; 24(10): 453-62.
16. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. Biohemija slobodnih radikala. Niš, Medicinski fakultet, 2000.
17. Ghogare AA, Greer A. Using Singlet Oxygen to Synthesize Natural Products and Drugs. *Chem Rev.* 2016; 116(17): 9994-10034.
18. Onyango AN. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: Article ID 2398573.
19. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta.* 2014; 436: 332-47.
20. Cadet J, Davies KJA. Oxidative DNA damage and repair: An introduction. *Free Radic Biol Med.* 2017; 107: 2-12.
21. Che M, Wang R, Li X, Wang H-Y, Zheng XFS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today.* 2016; 21(1): 143-9.
22. Ribeiro TP, Fernandes C, Melo KV, Ferreira SS, Lessa JA, Franco RWA, et al. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2015; 80: 67-76.

23. Wang Y, Branicky R, Noe A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018; 217(6): 1915-28.
24. Kuby SA, editor. A Study of enzymes. 2nd ed. Boston: CRC Press; 1990.
25. Goyal MM, Basak A. Hydroxyl radical generation theory: a possible explanation of unexplained actions of mammalian catalase. *Int J Biochem Mol Biol.* 2012; 3(3): 282-9.
26. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017; 11: 613-9.
27. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med.* 2015; 87: 84-97.
28. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013; 1830(5): 3289-303.
29. Jiao Y, Wang Y, Guo S, Wang G. Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget.* 2017; 8(45): 80093-102.
30. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, et al. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: Article ID 6235641.
31. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013; 1830(5): 3217-66.
32. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(7): 1957-97.
33. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS J.* 2007; 274(9): 2163-80.
34. Fisher AB. Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(3): 831-44.
35. Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M. Male Fertility Is

- Linked to the Selenoprotein Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase1. *Biol Reprod.* 2002; 67(3): 967-71.
36. Fujii J, Kurahashi T, Konno T, Homma T, Iuchi Y. Oxidative stress as a potential causal factor for autoimmune hemolytic anemia and systemic lupus erythematosus. *World J Nephrol.* 2015; 4(2): 213-22.
37. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016; 95: 27-42.
38. Kalinina E, Chernov N, Novichkova M. P-304 - Glutathione in redox regulation of the development of cancer cell resistance. *Free Radic Biol Med.* 2018; 120(1): 137.
39. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev.* 2014; 90(3): 927-63.
40. Raza H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J.* 2011; 278(22): 4243-51.
41. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015; 6: 183-97.
42. Van Bladeren PJ. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact.* 2000; 129(1-2): 61-76.
43. Singh S. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015; 75(1) :1-15.
44. Ayala A, Munoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014: Article ID 360438.
45. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014: Article ID 360438.

46. Gentile A, Pizzimenti S, Daga M, Cetrangolo GP, Chiara D, Alessio L, Maria G, Paul RAJ, Giuseppina FB. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genet.* 2017; 4(2): 103-37.
47. Mehrdad R, Aghdai S, Poryaghoub G. Urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in employees of subway system. *Acta Medica Iran.* 2015; 53(5): 287-92.
48. Cao C, Lai T, Li M, Zhou H, Lv D, Deng Z, et al. Smoking-promoted oxidative DNA damage response is highly correlated to lung carcinogenesis. *Oncotarget.* 2016; 7(14):18919-26.
49. Matter B, Seiler CL, Murphy K, Ming X, Zhao J, Lindgren B, et al. Mapping three guanine oxidation products along DNA following exposure to three types of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2018; 121: 180-9.
50. Dabrowska N, Wiczowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med.* 2017; 26(1): 155-66.
51. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Basic J, Pavlovic DA. The Validation Study of Neurofilament Heavy Chain and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as Plasma Biomarkers of Clinical/Paraclinical Activity in First and Relapsing-Remitting Demyelination Acute Attacks. *Neurotox Res.* 2016; 30(3): 530-8.
52. Valavandis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J Environ Sci Heal Part C.* 2009; 27(2): 120-39.
53. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17(10): 1195-214.
54. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal.* 2015; 13(1): 39.
55. Płachetka A, Adamek B, Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Migula P, Nowak P, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in colorectal adenocarcinoma – is it a result of oxidative stress? *Med Sci Monit.* 2013;19: 690-5.

56. Shafirovich V, Geacintov NE. Removal of oxidatively generated DNA damage by overlapping repair pathways. *Free Radic Biol Med.* 2017; 107: 53-61.
57. Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol cell Biol.* 2014; 15(7): 465-81.
58. Brancato B, Munnia A, Cellai F, Ceni E, Mello T, Bianchi S, et al. 8-Oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine and other lesions along the coding strand of the exon 5 of the tumour suppressor gene P53 in a breast cancer case-control study. *DNA Res.* 2016; 23(4): 395-402.
59. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res.* 2015; 763: 212-45.
60. Muftuoglu M, Mori MP, Souza-Pinto NC de. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion.* 2014; 17: 164-81.
61. Campalans A, Moritz E, Kortulewski T, Biard D, Epe B, Radicella JP. Interaction with OGG1 is required for efficient recruitment of XRCC1 to base excision repair and maintenance of genetic stability after exposure to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2015; 35(9): 1648-58.
62. Wang R, Hao W, Pan L, Boldogh I, Ba X. The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75(20): 3741-50.
63. Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, et al. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res.* 2005; 574(1-2): 58-66.
64. Guo C, Li X, Wang R, Yu J, Ye M, Mao L, et al. Association between Oxidative DNA Damage and Risk of Colorectal Cancer: Sensitive Determination of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. *Sci Rep.* 2016; 6: 32581.
65. Wolters S, Schumacher B. Genome maintenance and transcription integrity in aging and disease. *Front Genet.* 2013; 4: 19.
66. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical

- carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 254(2): 86-99.
67. Oh B, Figtree G, Costa D, Eade T, Hruba G, Lim S, et al. Oxidative stress in prostate cancer patients: A systematic review of case control studies. *Prostate Int*. 2016; 4(3): 71-87.
68. Lorestani S, Hashemy I, Mojarad M, Shahrestanaki MK, Bahari A, Asadi M, et al. Increased glutathione reductase expression and activity in colorectal cancer tissue samples: An investigational study in Mashhad, Iran. *Middle East J Cancer*. 2018; 9(2): 99-104.
69. Bozan N, Demir H, Gürsoy T, Özkan H, Düzenli U, Sarıkaya E, et al. Alterations in oxidative stress markers in laryngeal carcinoma patients. *J Chinese Med Assoc*. 2018; 81(9): 811-5.
70. Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2010; 59(4): 459-69.
71. Pajović SB, Saičić Z, Pejić S, Kasapović J, Stojiljković V, Kanazir DT. Antioxidative biomarkers and cancerogenesis. *Jugoslav Med Biochem*. 2006; 25: 397-402.
72. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(12): 1875-84.
73. Borek C. Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integr Cancer Ther*. 2004; 3(4): 333-41.
74. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics, 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394-424.
75. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017; 28(4): 72-83.
76. Registar za maligne neoplazme Vojvodine. Sremska Kamenica: Zavod za epidemiologiju. Institut za onkologiju Vojvodine (nepublikovani podaci); 2013
77. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”. Incidencija i mortalitet od

- raka u centralnoj Srbiji. Registar za rak u Centralnoj Srbiji 2015. Izveštaj br. 17 Beograd, 2017.
78. Chetty R. 70 years of the JCP-highly cited papers: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2017; 70(12): 997.
 79. Acién M, Acién P. Normal Embryological Development of the Female Genital Tract BT - Female Genital Tract Congenital Malformations: Classification, Diagnosis and Management. In: Grimbizis GF, Campo R, Tarlatzis BC, Gordts S, editors. London: Springer London; 2015. p. 3-14.
 80. Montz FJ. Management of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and low-grade squamous intraepithelial lesion and potential complications. *Clin Obstet Gynecol.* 2000; 43: 394.
 81. Mandic A. Grlic materice. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2016.
 82. Lorusso D, Martinelli F, Maltese G, Fontanella C, Sabatucci I, Ditto A, et al. Locally Advanced Cervical Cancer: Is a Trimodality Treatment a Safe and Effective Approach? *Oncology.* 2018; 95(4): 239–45.
 83. De Marco F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses.* 2013; 5(2): 708–31.
 84. Senapati R, Senapati NN, Dwibedi B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infect Agent Cancer.* 2016;11: 59.
 85. Shrihari TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedicalscience.* 2017; 11: 721.
 86. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015; 12(10): 584-96.
 87. Georgescu SR, Mitran CI, Mitran MI, Caruntu C, Sarbu MI, Matei C, et al. New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *J Immunol Res.* 2018; 2018: Article ID 5315816.
 88. Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016(7): Article ID 6475624.

89. Foppoli C, De Marco F, Cini C, Perluigi M. Redox control of viral carcinogenesis: The human papillomavirus paradigm. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1850(8): 1622-32.
90. Nirmala JG, Narendhirakannan RT. Detection and Genotyping of High-Risk HPV and Evaluation of Anti-Oxidant Status in Cervical Carcinoma Patients in Tamil Nadu State, India - a Case Control Study. *APJCP*. 2011; 12(10): 2689-95.
91. Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, et al. Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J Med Virol*. 2015; 88(2): 336-44.
92. Siegel EM, Patel N, Lu B, Lee JH, Nyitray AG, Huang X, et al. Circulating biomarkers of iron storage and clearance of incident human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21(5): 859-65.
93. Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, Lizano M. Cellular redox, cancer and human papillomavirus. *Virus Res*. 2018; 246: 35-45.
94. Jiang B, Xiao S, Khan MA, Xue M. Defective antioxidant systems in cervical cancer. *Tumor Biol*. 2013; 34(4): 2003-9.
95. Gariglio P, Organista-Nava J, Alvarez-Rios E. Role of HR-HPVs E6 and E7 Oncoproteins in Cervical Carcinogenesis. *J Mol Genet Med*. 2016; 10(216): e1000216.
96. Kwasniewska A, Gozdzicka-Jozefiak A, Borzecki A, Baranowski W. DNA adducts in squamous cell cervical carcinomas associated with HPV infection. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2004; 25(3): 359-61.
97. Sgambato A, Zannoni GF, Faraglia B, Camerini A, Tarquini E, Spada D, et al. Decreased expression of the CDK inhibitor p27Kip1 and increased oxidative DNA damage in the multistep process of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2004; 92(3): 776-83.
98. Del Nonno F, Pisani G, Visca P, Signore F, Grillo LR, Baiocchi A, et al. Role and predictive strength of transglutaminase type 2 expression in premalignant lesions of the cervix. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2011; 24(6): 855-65.
99. Li L, Chen C, Cao Z, Liao Q, Du H, Zhan S, et al. Expression of peroxiredoxin III in

- cervical lesions. *Chinese J Exp Clin Virol.* 2009; 23(6): 443-5.
100. Perluigi M, Giorgi A, Blarzino C, De Marco F, Foppoli C, Di Domenico F, et al. Proteomics analysis of protein expression and specific protein oxidation in human papillomavirus transformed keratinocytes upon UVB irradiation. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(8b): 1809-22.
 101. Sharma A, Rajappa M, Satyam A, Sharma M. Oxidant/anti-oxidant dynamics in patients with advanced cervical cancer: correlation with treatment response. *Mol Cell Biochem.* 2010; 341(1-2): 65-72.
 102. Weitmann HD, Gustorff B, Vaupel P, Knocke TH, Pötter R. Oxygenation Status of Cervical Carcinomas Before and During Spinal Anesthesia for Application of Brachytherapy. *Strahlentherapie und Onkol.* 2003; 179(9): 633-40.
 103. Ho GY, Palan PR, Basu J, Romney SL, Kadish AS, Mikhail M, et al. Viral characteristics of human papillomavirus infection and antioxidant levels as risk factors for cervical dysplasia. *Int J cancer.* 1998; 78(5): 594-9.
 104. Lopez J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, Perez-Plasencia C, Garcia-Carranca A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer.* 2012; 12: 48.
 105. De Marco F, Perluigi M, Foppoli C, Blarzino C, Cini C, Coccia R, et al. UVB irradiation down-regulates HPV-16 RNA expression: implications for malignant progression of transformed cells. *Virus Res.* 2007; 130(1-2): 249-59.
 106. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-31.
 107. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22): 6049-55.
 108. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974. p 673-77.
 109. Beutler E. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods.* 3rd Edition. New York: Grune and Stratton. 1984; pp. 188.

110. Bhuvaramurthy V, Balasubramanian N, Govindasamy S. Effect of radiotherapy and chemoradiotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 1996; 158(1): 17-23.
111. Mukundan H, Bahadur AK, Kumar A, Sardana S, Naik SL, Ray A, et al. Glutathione level and its relation to radiation therapy in patients with cancer of uterine cervix. *Indian J Exp Biol.* 1999; 37(9): 859-64.
112. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis C De, Marinari UM, et al. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: Article ID 6235641.
113. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016; 7(6): e2253.
114. Mateu-Jiménez M, Sánchez-Font A, Rodríguez-Fuster A, Aguiló R, Pijuan L, Fermoselle C, et al. Redox Imbalance in Lung Cancer of Patients with Underlying Chronic Respiratory Conditions. *Mol Med.* 2016; 22: 85-98.
115. Genet S, Gamini M, El Metwally TH. Deranged Antioxidant Status and Oxidative Stress in Patients with Cervical Cancer Receiving Radiotherapy. 2018; 5(13): 66-77.
116. Marinescu S, Anghel R, Gruia MI, Beuran M. Involvement of reactive oxygen species in the mechanisms associated with cervical cancer specific treatment. *Chirurgia.* 2014; 109(6): 806-11.
117. Kim YT, Kim JW, Choi JS, Kim SH, Choi EK, Cho NH. Relation between deranged antioxidant system and cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2004; 14(5): 889-95.
118. Quagliariello V, Rossetti S, Cavaliere C, Di Palo R, Lamantia E, Castaldo L, et al. Metabolic syndrome, endocrine disruptors and prostate cancer associations: biochemical and pathophysiological evidences. *Oncotarget.* 2017; 8(18): 30606-16.
119. Didziapetriene J, Bublevic J, Smailyte G, Kazbariene B, Stukas R. Significance of blood serum catalase activity and malondialdehyde level for survival prognosis of ovarian cancer patients. *Medicina (Kaunas).* 2014; 50(4): 204-8.
120. El-Far M, Abol-Enein H, Zakaria A, El-Gedamy M. Evaluation of nitric oxide and

- malondialdehyde levels in serum of Egyptian patients with bladder and renal tumors: Potential use as medicinal biomarkers. *J Pharm Pharm Sci.* 2014; 3(6): 87-101.
121. Pirinççi N, Kaba M, Geçit İ, Güneş M, Yüksel MB, Tanık S, et al. Serum prolidase activity, oxidative stress, and antioxidant enzyme levels in patients with renal cell carcinoma. *Toxicol Ind Health.* 2013; 32(2): 193-9.
 122. Kilic N, Yavuz Taslipinar M, Guney Y, Tekin E, Onuk E. An investigation into the serum thioredoxin, superoxide dismutase, malondialdehyde, and advanced oxidation protein products in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014; 21(13): 4139-43.
 123. Seraj AK, Shankhar M, Raju KD, Punam J, Anju P, Rajat KA. Antioxidants and Lipid Peroxidation Status In Women with Breast Cancer. *Int Med J Malaysia.* 2015; 14(1): 71-5.
 124. Portakal O, Ozkaya O, Erden Inal M, Bozan B, Kosan M, Sayek I. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 2000; 33(4): 279-84.
 125. Karki K, Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna RS, Khanna HD. Association between biomarkers of oxidative stress, trace elements, and cell proliferation index in patients with benign and malignant breast diseases. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2015; 34(1): 1-10.
 126. Gopcevic KR, Rovcanin BR, Tatic SB, Krivokapic ZV, Gajic MM, Dragutinovic VV. Activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in different stages of colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2013; 58(9): 2646-52.
 127. Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2007; 375 (1-2): 119-23.
 128. Looi ML, Mohd Dali AZH, Md Ali SA, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer Prev.* 2008; 17(6): 555-60.

129. Naidu MSK, Suryakar AN, Swami SC, Katkam R V, Kumbar KM. Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian J Clin Biochem.* 2007; 22(2): 140-4.
130. Hristozov D, Gadjeva V, Vlaykova T, Dimitrov G. Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Arch Physiol Biochem.* 2001; 109(4): 331-6.
131. Abiaka C, Al-Awadi F, Al-Sayer H, Gulshan S, Behbehani A, Farghally M. Activities of erythrocyte antioxidant enzymes in cancer patients. *J Clin Lab Anal.* 2002; 16(4): 167-71.
132. Asaduzzaman Khan M, Tania M, Zhang D, Chen H. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese J Cancer Res.* 2010; 22(2): 87-92.
133. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med.* 2018; 54(4): 287-93.
134. Hemachandra LPMP, Dier U, Hempel N. Abstract 1440: Mitochondrial superoxide dismutase (Sod2) modulates ovarian clear cell carcinoma transcoelomic metastatic pathway. *Cancer Res.* 2015; 75(15): 1440.
135. Ekoue DN, He C, Diamond AM, Bonini MG. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017; 1858(8): 628-32.
136. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(6): 718-44.
137. Chen P-M, Wu T-C, Shieh S-H, Wu Y-H, Li M-C, Sheu G-T, et al. MnSOD promotes tumor invasion via upregulation of FoxM1-MMP2 axis and related with poor survival and relapse in lung adenocarcinomas. *Mol Cancer Res.* 2013; 11(3): 261-71.
138. Xu Z, Chen Y, Gu D, Lee NP, Sun S, Gong W, et al. SOD2 rs4880 CT/CC genotype predicts poor survival for Chinese gastric cancer patients received platinum and fluorouracil based adjuvant chemotherapy. *Am J Transl Res.* 2015; 7(2): 401-10.

139. Strzelczyk JK, Wielkoszynski T, Krakowczyk L, Adamek B, Zalewska-Ziob M, Gawron K, et al. The activity of antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma and corresponding normal mucosa. *Acta Biochim Pol.* 2012; 59(4): 549-56.
140. Ma RL, Shen LY, Chen KN. Coexpression of ANXA2, SOD2 and HOXA13 predicts poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2014; 31(5): 2157-64.
141. Shwetha SD, Shastry AH, Arivazhagan A, Santosh V. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is a malignant astrocytoma specific biomarker and associated with adverse prognosis in p53 expressing glioblastoma. *Pathol Res Pract.* 2016; 212(1): 17-23.
142. Nourazarian AR, Kangari P, Salmaninejad A. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(12): 4745-51.
143. Becuwe P, Ennen M, Klotz R, Barbieux C, Grandemange S. Manganese superoxide dismutase in breast cancer: From molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. *Free Radic Biol Med.* 2014; 77: 139-51.
144. Bisevac JP, Djukic M, Stanojevic I, Stevanovic I, Mijuskovic Z, Djuric A, et al. Association Between Oxidative Stress and Melanoma Progression. *J Med Biochem.* 2018; 37(1): 12-20.
145. Nakano T, Oka K, Taniguchi N. Manganese superoxide dismutase expression correlates with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer Res.* 1996; 56(12): 2771-5.
146. Rabelo-Santos SH, Termini L, Boccardo E, Derchain S, Longatto-Filho A, Andreoli MA, et al. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. *Oncotarget.* 2018; 9(31): 21630-40.
147. Wiczorek E, Jablonowski Z, Tomasik B, Gromadzinska J, Jablonska E, Konecki T, et al. Different Gene Expression and Activity Pattern of Antioxidant Enzymes in Bladder Cancer. *Anticancer Res.* 2017; 37(2): 841-8.
148. Miara A, Hevia D, Muñoz-Cimadevilla H, Astudillo A, Velasco J, Sainz RM, et al.

- Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic Biol Med.* 2015; 85: 45-55.
149. Karihtala P, Porvari K, Soini Y, Haapasaari K-M. Redox Regulating Enzymes and Connected MicroRNA Regulators Have Prognostic Value in Classical Hodgkin Lymphomas. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: Article ID 2696071.
150. Ben Mahmoud L, Mdhaffar M, Ghozzi H, Ammar M, Hakim A, Atheymen R, et al. Oxidative stress in Tunisian patients with acute lymphoblastic leukemia and its involvement in leukaemic relapse. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2017; 39(3): 124-30.
151. Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B, Krauss MR, Chen KT, Smith DM, et al. Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J Immunol.* 1991; 147(1): 149-54.
152. Hasan HR, Mathkor TH, Al-Habal MH. Superoxide dismutase isoenzyme activities in plasma and tissues of Iraqi patients with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(6): 2571-6.
153. Inci E, Civelek S, Seven A, Inci F, Korkut N, Burçax G. Laryngeal Cancer: in Relation to Oxidative Stress. *Tohoku J Exp Med.* 2003; 200(1): 17-23.
154. Silva GÁF, Nunes RAL, Boccardo E, Villa LL, Termini L. Abstract B69: Study of superoxide dismutase-2 protein in HPV-mediated cell transformation. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(1): 69.
155. Srivastava S, Natsu SM, Gupta A, Pal KA, Singh U, Agarwal GG, et al. Lipid peroxidation and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. *Indian J Cancer.* 2009; 46(4): 297-302.
156. Manoharan S, Kolanjiappan K, Kayalvizhi M. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. *Cell Mol Biol Lett.* 2004; 9(4A): 699-707.
157. Chiou JF, Hu ML. Elevated lipid peroxidation and disturbed antioxidant enzyme activities in plasma and erythrocytes of patients with uterine cervicitis and myoma.

- Clin Biochem.* 1999; 32(3): 189-92.
158. Yamakura F, Matsumoto T, Ikeda K, Taka H, Fujimura T, Murayama K, et al. Nitrated and oxidized products of a single tryptophan residue in human Cu, Zn-superoxide dismutase treated with either peroxyxynitrite-carbon dioxide or myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite. *J Biochem.* 2005; 138(1): 57-69.
159. Wilcox KC, Zhou L, Jordon JK, Huang Y, Yu Y, Redler RL, et al. Modifications of Superoxide Dismutase (SOD1) in Human Erythrocytes: A possible role in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 2009; 284(20):13940-7.
160. Doskey CM, Buranasudja V, Wagner BA, Wilkes JG, Du J, Cullen JJ, et al. Tumor cells have decreased ability to metabolize H₂O₂: Implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy. *Redox Biol.* 2016; 10: 274-84.
161. Mila-Kierzenkowska C, Kedziora-Kornatowska K, Woźniak A, Drewa T, Woźniak B, Drewa S, et al. The effect of brachytherapy on antioxidant status and lipid peroxidation in patients with cancer of the uterine cervix. *Cell Mol Biol Lett.* 2004; 9(3): 511-8.
162. Tsai JY, Lee MJ, DahTsyng Chang M, Huang H. The effect of catalase on migration and invasion of lung cancer cells by regulating the activities of cathepsin S, L, and K. *Exp Cell Res.* 2014; 323(1): 28-40.
163. Gęgotek A, Nikliński J, Żarković N, Żarković K, Waeg G, Łuczaj W, et al. Lipid mediators involved in the oxidative stress and antioxidant defence of human lung cancer cells. *Redox Biol.* 2016; 9: 210-9.
164. Glorieux C, Sandoval JM, Fattaccioli A, Dejeans N, Garbe JC, Dieu M, et al. Chromatin remodeling regulates catalase expression during cancer cells adaptation to chronic oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2016; 99: 436-50.
165. Senthil K, Aranganathan S, Nalini N. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clin Chim Acta.* 2004; 339(1-2): 27-32.
166. Arun BK, Granville LA, Yin G, Middleton LP, Dawood S, Kau SW, et al. Glutathione-S-Transferase-Pi Expression in Early Breast Cancer: Association With Outcome and Response to Chemotherapy. *Cancer Invest.* 2010; 28(5): 554-9.

167. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830(5): 3143-53.
168. Jardim BV, Moschetta MG, Leonel C, Gelaleti GB, Regiani VR, Ferreira LC, et al. Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: an immunohistochemical and molecular study. *Oncol Rep*. 2013; 30(3): 1119-28.
169. Lassoued S, Mseddi M, Mnif F, Abid M, Guerhazi F, Masmoudi H, et al. A comparative study of the oxidative profile in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, and papillary thyroid cancer. *Biol Trace Elem Res*. 2010; 138(1-3): 107-15.
170. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30(11): 1286-92.
171. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*. 1985; 240(2): 500-8.
172. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett*. 2000; 151(1): 87-95.
173. Tabur S, Aksoy ŞN, Korkmaz H, Ozkaya M, Aksoy N, Akarsu E. Investigation of the role of 8-OHdG and oxidative stress in papillary thyroid carcinoma. *Tumour Biol*. 2015; 36(4): 2667-74.
174. Xu X, Wang Y, Guo W, Zhou Y, Lv C, Chen X, et al. The significance of the alteration of 8-OHdG in serous ovarian carcinoma. *J Ovarian Res*. 2013; 6(1): 74.
175. Pylväs-Eerola M, Karihtala P, Puistola U. Preoperative serum 8-hydroxydeoxyguanosine is associated with chemoresistance and is a powerful prognostic factor in endometrioid-type epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2015; 15(1): 493.
176. Dincer Y, Himmetoglu S, Akcay T, Ersoy EY, Gunes KN, Tortum O. Prognostic significances of oxidative DNA damage evaluated by 8-hydroxy-deoxyguanosine and antioxidant enzymes in patients undergoing resection of gastric and colon carcinoma. *Neoplasma*. 2007; 54(2): 131-6.

177. Yongsheng M, Lin Z, Shengzhong R, et al. Relation between Gastric Cancer and Protein Oxidation, DNA Damage, and Lipid Peroxidation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013(2): Article ID 543760.
178. Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(4): 302-8.
179. Soon BH, Abdul Murad NA, Then S-M, Abu Bakar A, Fadzil F, Thanabalan J, et al. Mitochondrial DNA Mutations in Grade II and III Glioma Cell Lines Are Associated with Significant Mitochondrial Dysfunction and Higher Oxidative Stress. *Front Physiol.* 2017; 8: 231.
180. Foksinski M, Kotzbach R, Szymanski W, Olinski R. The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(7): 597-601.
181. Guo C, Li X, Ye M, Xu F, Yu J, Xie C, et al. Discriminating patients with early-stage breast cancer from benign lesions by detection of oxidative DNA damage biomarker in urine. *Oncotarget.* 2017; 8(32): 53100-9.
182. Yano T, Shoji F, Baba H, Koga T, Shiraishi T, Orita H, et al. Significance of the urinary 8-OHdG level as an oxidative stress marker in lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2009; 63(1): 111-4.
183. Kumar L, Kumar S, Agarwal S. To find the role of DNA damage marker 8-hydroxy 2-deoxy guanosine in patients of prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and its association to other prognostic factors of prostate cancer. *J Integr Nephrol Androl.* 2017; 4(2): 55-9.
184. Mei S, Yao Q, Wu C, Xu G. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches - Capillary electrophoresis and GC/MS: An assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *J Chromatogr B, Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 827(1): 83-7.

185. Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leuk Res.* 2000; 24(6): 461-8.
186. Pande D, Negi R, Karki K, Khanna RS, Khanna HD. Oxidative damage and cell signaling transduction in patients of chronic myeloid leukemia. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015; 47(6): 474-6.
187. Romano G, Sgambato A, Mancini R, Capelli G, Giovagnoli MR, Flamini G, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis.* 2000; 21(6): 1143-7.