

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

VOJISLAV BOGOSAVLJEVIĆ

**PROMENE AKTIVNOSTI ENZIMA
ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U KRVI I TKIVU
BOLESNIKA SA GLIOBLASTOMOM I
MENINGEOMOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2014

UNIVERSITY IN BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

VOJISLAV BOGOSAVLJEVIC

**CHANGES IN THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE
ENZYMES IN BLOOD AND TISSUE OF PATIENTS
DIAGNOSED WITH GLIOBLASTOMA AND
MENINGIOMA**

DOCTORAL DISSERTATION

BELGRADE, 2014

Mentor:

Prof. Dr Miodrag Rakić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor:

Prof. Dr Milica Bajčetić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Članovi komisije:

1. Prof. Dr Vaso Antunović, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu,
2. Doc. Dr Miloš Joković, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu,
3. VNS Dr Aleksandra Nikolić Kokić, IBISS

Rezime

Poređenje oksidativno-reduktivnog stanja malignih i benignih tumora je ključno za razumevanje uloge reaktivnih vrsta koje nastaju kao derivati kiseonika u patofiziologiji agresivnih tipova tumora. Poredili smo sisteme antioksidativne zaštite u visokomalignom tumoru - multiformnom glioblastomu (GBM) i meningeomu, benignom tumoru mozga.

Biohemijskim analizama obuhvaćeni su uzorci tumorskog tkiva i krvi 67 pacijenata sa GBM-om i 67 pacijenata sa meningeomom, kao i uzorak krvi 30 pacijenata koji su činili kontrolnu grupu.

Komponente sistema glutaciona, koji je odgovoran za uklanjanje H_2O_2 pokazao je nižu aktivnost/nivo kod GBM-a: glutation peroksidaza (GBM: 9.90 ± 0.22 ; meningeom: 11.78 ± 0.23 U/mg proteina; $P < 0.001$), glutation reduktaza (GBM: 3.83 ± 0.13 ; meningeom: 4.67 ± 0.11 U/mg proteina; $P < 0.001$); i glutation (GBM: 6.70 ± 0.12 ; meningeom: 7.58 ± 0.14 $\mu\text{mol/g}$ tkiva; $P < 0.001$). Nasuprot tome, odnos aktivnosti glutation reduktaze i glutaciona u eritrocitima su: GBM > meningeom > kontrolna grupa. Aktivnost superoksid dizmutaze i katalaze bile su niže u krvi pacijenata sa malignim tumorom u poređenju sa kontrolnom grupom.

Ćelije malignih tumora pokazuju nishodnu regulaciju sistema antioksidaze koji može dovesti do povišenih nivoa H_2O_2 u poređenju sa tkivom benignih tumora.

Abstract

Comparison of redox conditions in malignant and benign tumours is essential for understanding the role of reactive oxygen species in the pathophysiology of aggressive cancer profiles. We compared antioxidative systems in highly malignant brain tumour - glioblastoma multiforme (GBM), and in meningioma, a benign brain tumour.

Tumour tissues and blood of 67 GBM patients and 67 meningioma patients and blood of 30 control subjects were analysed via biochemical assays.

Components of glutathione system, which is responsible for H₂O₂ removal, showed lower activity/level in GBM: glutathione peroxidase (GBM: 9.90 ± 0.22 ; meningioma: 11.78 ± 0.23 U/mg of proteins; $P < 0.001$), glutathione reductase (GBM: 3.83 ± 0.13 ; meningioma: 4.67 ± 0.11 U/mg of proteins; $P < 0.001$); and glutathione (GBM: 6.70 ± 0.12 ; meningioma: 7.58 ± 0.14 μ mol/g of tissue; $P < 0.001$). In contrast, the rank order of glutathione reductase activity and glutathione level in erythrocytes was: GBM > meningioma > control. Superoxide dismutase and catalase activities were lower in the blood of cancer patients compared to controls.

Cells of malignant brain tumour show down-regulated antioxidative system which might result in increased levels of H₂O₂ compared to benign tumour tissue.

SADRŽAJ

I UVOD	1
II PREGLED LITERATURE	3
2.1. Reaktivne vrste kiseonika i azota.....	6
2.2. Endogena antioksidativna zaštita.....	9
2.2.1. Superoksid dismutaza (SOD).....	10
2.2.2. Katalaza (CAT).....	11
2.2.3. Glutation peroksidaza (GSH-Px).....	12
2.2.4. Glutation reduktaza (GR).....	13
2.3. Signalna transdukcija i ROS.....	15
2.4. Apoptoza i ROS.....	17
2.5. Tumori mozga.....	19
2.5.1. Podela tumora prema WHO klasifikaciji.....	19
2.5.2. Moždani tumori – klinička slika.....	21
2.5.3. Glioblastoma multiforme (WHO Gr IV).....	25
2.5.4. Meningeomi.....	31
2.6. Redoks uslovi u tumorima mozga.....	38
2.6.1. Izvori ROS i RNS u glioblastomu i meningeomu i impakt na eritrocite	38
2.6.2. AOS u glioblastomu i meningeomu.....	42
III CILJ ISTRAŽIVANJA	44
IV MATERIJAL I METODE	45
4.1. Ispitivane grupe.....	45
4.2. Izbor učesnika ispitivanja.....	45
4.3. Neurohirurške procedure.....	46
4.4. Histopatologija.....	48

4.5. Biohemijske procedure.....	50
4.5.1. Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima iz eritocita.....	50
4.5.2. Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima iz tkiva glioblastoma i meningeoma.....	55
4.6. Statistička obrada rezultata.....	61
V REZULTATI.....	63
5.1. Aktivnost enzima u eritrocitima i nivo glutaciona u plazmi.....	64
5.2. Aktivnost enzima i nivo glutaciona u tumorskom tkivu.....	69
5.3. Korelaciona analiza.....	74
VI DISKUSIJA.....	79
VII ZAKLJUČAK.....	84
VIII LITERATURA.....	85

I UVOD

Naš život u kiseoničnoj/oksidativnoj atmosferi, i oslanjanje humanih ćelja na molekularni kiseonik i oksidativno-reduktivne (redoks) procese u pogledu osnovnih funkcija, kao što je ćelijsko disanje odnosno aktivnost mitohondrija i konverzija energije, nosi sa sobom određene rizike. Reč je pre svega o povišenom nivou oksidacije biomolekula (npr. proteina, DNK) od strane reaktivnih vrsta koje nastaju kao derivati kiseonika (tkz. Reactive Oxygen Species – ROS). Nivo oksidacije koji prevazilazi fiziološke granice se označava kao oksidativni stres. Iako se dugo smatralo da ROS isključivo imaju negativne biološke efekte, odnosno da predstavljaju neku vrstu "neizbežnog zla", u poslednjoj dekadi je prikupljen veliki broj dokaza i o njihovoj pozitivnoj ulozi u raznim signalnim putevima. Sveukupno gledajući, ROS i redoks procesi učestvuju u nizu (pato)fizioloških procesa, kao što su:^{1,2}

- ćelijska proliferacija i diferencijacija, prenos signala, regulacija metabolizma i međućelijska komunikacija
- citoprotektivni mehanizmi (inflamacija, odbrana od mikroorganizama)
- patofiziološki fenomeni (starenje, apoptoza, nekroza, kancerogeneza i dr.)

Dakle, za normalnu ćelijsku funkciju neophodna je regulacija redoks miljea, kako bi se sa jedne strane sprečio oksidativni stres, a sa druge omogućio normalan redoks signaling. Ovo predstavlja imperativ za održavanje zdravog fenotipa, kao i samog preživljavanja ćelije. Za regulaciju redoks uslova u nekom tkivu je zadužen antioksidativni sistem (AntiOxidative System - AOS) u samom tkivu, kao i AOS u krvi koji puferuje uslove u tkivu, ali na koga i uslovi u tkivu takođe utiču.^{3,4} AOS se sastoji od niza enzima i malih molekula koji su međusobno umreženi kroz liniju povezanih supstrata i kroz inhibitorne efekte. Oksidativni stres može ozbiljno da naruši ćelijsku homeostazu, da utiče na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, a u nekim slučajevima i na aktivaciju maligne transformacije.^{2,5} Tumorske ćelije pokazuju izmenjen fenotip, koji može uključivati nedakvatnu AOS, ubrzan metabolizam koji je povezan sa većom aktivnošću u mitohondrijama i u vezi sa tim povišenu produkciju ROS, promene na drugim izvorima ROS, i narušene signalne kaskade.^{6,7} Takođe, tumorsko tkivo može imati neadekvatnu prokrvljenost i nivo oksigenacije.² Redoks uslovi se razlikuju za razne vrste tumora, mogu

biti uključeni kako u različite patofiziološke promene (uključujući i promociju proliferacije) i mogu uticati na efekte i uspešnost antikancer terapije, odnosno rezistentnost/susceptibilost tumorskih ćelija na farmako- i radioterapiju.^{8,9}

Na osnovu svega iznetog, ovo istraživanje ima za svrhu da utvrdi promene u antioksidativnom sistemu u krvi i tkivu pacijenata obolelih od:

1. Glioblastoma multiforme u odnosu na zdrave ispitanike
2. Meningeoma u odnosu na zdrave ispitanike

II PREGLED LITERATURE

Ukupni redoks status je opšte prihvaćen kao glavni faktor u regulaciji funkcije kako normalne, tako i maligne ćelije. Pomeranje redoks ravnoteže ka oksidaciji može značajno povećati proliferativni kapacitet malignih ćelija.^{6,7} Ćelijsko redoks stanje ima značajan uticaj na kontrolu preživljavanja, apoptoze i ekspresiju tumor supresornih gena. Oksidaciono stanje u ćeliji pogoduje nastanku tumora, dok redukovano redoks okruženje pogoduje nastanku apoptoze.⁷ ROS i reaktivne vrste azota (Reactive Nitrogen Species - RNS) izazivaju promene u ćelijskom redoks statusu aktivirajući multiple signalne obrasce, učestvuju u regulaciji ćelijskog rasta i smrti i indukuju sintezu zaštitnih proteina u normalnim i malignim ćelijama.^{2,7} Većina mutacija bitna za aktivaciju onkogeni uključuje redoks-senzitivna regulativna mesta, što dovodi do gubitka normalne redoks kontrole ćelijskog rasta i razvoja.⁷

Poremećaj u redoks ravnoteži ćelije dovodi do oksidativnog stresa, što je zapaženo kod različitih tipova kancera. Oštećenja na DNK nastala različitim reaktivnim oksidativnim vrstama predstavljaju prvi korak uključen u mutagenezu, karcinogenezu i starenje. ROS-indukovana oštećenja na DNK uključuju jednolančane i dvolančane prekide DNK, modifikacije purina, pirimidina ili deoksiriboze, i DNK ukrštanje. Oštećenje na DNK dovodi do zaustavljanja transkripcije, indukcije "pogrešne" transkripcije, i replikacije sa greškom indukcijom, a sve navedeno je u vezi sa kancerogenezom.⁵ U zavisnosti od jačine oksidativnog stresa, ćelija može da uđe u 3 različita stanja: tumor, mutagenezu i apoptozu. Većina bioloških efekata antioksidanasa su u vezi sa njihovom ulogom u uklanjanju slobodnih radikala, iako oni mogu učestvovati i u modulaciji ćelijskih signalnih puteva.¹

Smatra se da reaktivne vrste imaju ključnu ulogu u razvoju karcinoma kod ljudi. Dobro je poznato da oksidativni stres može da konvertuje normalne ćelije u ćelije sa kancerskim fenotipom.⁸ Ono što je još važnije za ovu studiju, izmenjeni redoks milje je jedna od karakteristika tumorskog tkiva. Ono definiše dinamiku progresije kancera, proliferacije kancer ćelija, formiranje metastaza, i interakcije sa antikancerskim lekovima (npr. hemioterapijom) i rezistentost na raditerapiju.^{9,10} Na primer, na različitim tipovima kancera, utvrđeno je da tumorske ćelije proizvode mnogo veće količine vodonik peroksida

(H₂O₂), u odnosu na normalne ćelije.¹¹ Između ostalog, ovo promovira mutagenezu, jer je H₂O₂ relativno stabilan i lako prolazi kroz lipidne membrane, uključujući i membranu jedra. Jedro sadrži značajan nivo bakra, koji je redoks aktivan metal (najvažniji uz gvožđe). U reakciji sa redoks aktivnim metalima, H₂O₂ proizvodi hidroksil radikal - najreaktivniju vrstu u biološkim sistemima, koja lako oštećuje DNK.¹² Osim toga, dobro je poznato da tumorsko tkivo pokazuje kontinualno povećanu produkciju azot oksida (NO, spada u RNS). Ova reaktivna vrsta može da aktivira matriks metaloproteaze koje razgrađuju vezivno tkivo (npr. bazalnu laminu krvno-moždane barijere), čime se promovira metastatski procesi.¹³

Funkcija AOS je izmenjena u različitim tipovima kancera. AOS se sastoji od enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px) i glutation reduktaze (GR), dok je najvažnija ne-enzimska komponenta sam glutation (GSH). O njihovim karakteristikama i funkcijama će biti više reči u daljem tekstu, a ovde će biti navedena njihova aktivnost u okviru AOS profila tumorskog tkiva. Subnormalna aktivnost SOD pokazana je u tkivima tumora pluća (ova studija je urađena samo za jedan SOD tip),¹⁴ raka tiroidne žlezde,¹⁵ kolorektalnih tumora,¹⁶ i nekih drugih tipova. S druge strane, povećana aktivnost ili ekspresija SOD je uočena u tkivu kancera jajnika,¹⁷ malignog i benignog raka dojke,¹⁸ a pokazana je i pozitivna korelacija između kliničkog ishoda raka želuca i (povećane) ekspresije SOD u uzorcima tkiva dobijenih biopsijom.¹⁹ Studija u kojoj je merena ukupna SOD aktivnost u tumorskom tkivu raka pluća je pokazala povećanje.²⁰ Ovo istraživanje je utvrdilo i značajno smanjenu CAT aktivnost u tumoru, što je izgleda karakteristika široko zastupljena i kod drugih tipova kancera.²¹ Interesantan je nalaz koji pokazuje da se sa povećanjem ekspresije CAT smanjuje agresivnost fenotipa i povećava susceptibilnost ćelja raka na određene hemioterapijske agense.²¹ GSH i enzimi vezani za njega su od centralnog značaja za mutagenezu, DNK sintezu, rast kancerskih ćelija kao i za njihovu "multidrug" i radijacionu rezistentnost.²² Naime, iako proizvode velike količine H₂O₂ i drugih ROS, ćelije raka ne bi mogle da izdrže oksidativni pritisak koje sebi nameću, a sa kojim takođe mogu biti suočene i u okviru terapije (npr. efekti radijacione terapije su pre svega zasnovani na homolizi vode i produkciji hidroksil radikala). U ovome im upravo pomaže GSH sistem.²² Ovome ću posvetiti više pažnje kasnije, u kontekstu tumora mozga.

Tumorsko tkivo indukuje oksidativni pritisak na krv, što se može videti kroz izmenjeni AOS profil onkoloških pacijenata. Na primer, utvrđeno je da nivo GSH u krvi može da se upotrebi kao marker redoks stanja u tumorskom tkivu raka pluća.²³ Kod raka cerviksa, uočena je manja aktivnost SOD, CAT, GSH-Px, kao i smanjen nivo glutationa (GSH) u krvi.²⁴ U krvi pacijenata obolelih od raka jednjaka i želuca uočena je povećana SOD aktivnost i smanjena CAT i GSH-Px aktivnost u odnosu na kontrolne vrednosti.²⁵ Povišena aktivnost SOD i GSH-Px je utvrđena i u krvi obolelih od kolorektalnog karcinoma.²⁶ Kod pacijenata sa poodmaklim kancerom pluća uočena je povećana CAT aktivnost i smanjen nivo GSH u odnosu na krv zdravih kontrola,²⁷ dok je jedna druga studija ustanovila smanjenu CAT aktivnost, gde je smanjenje bilo posebno ozraženo kod pacijenata sa metastazama.²⁸ Aktivnost CAT u krvi obolelih raka debelog creva je takođe povećana, dok je kod obolelih od raka želuca smanjena u odnosu na kontrolne vrednosti.²⁹ Smanjena CAT aktivnost je takođe uočena u eritrocitima obolelih od malignog limfoma³⁰ i raka jetre.³¹ Aktivnost GSH-Px i nivo GSH je smanjen u krvi obolelih od cervikalnog karcinoma,³² kao i kod obolelih od raka prostate,^{33,34} kod kojih je uočena i manja GR aktivnost u odnosu na zdrave kontrole.³⁴ Zanimljivo je primetiti da je izuzetno mala pažnja posvećena GR, kako u tumorskom tkivu tako i u eritrocitima obolelih. Treba istaći da efekti na nivou AOS u eritrocitima odnosno krvi, zavise od samih redoks karakteristika tumora, ali svakako i od "intenziteta" interakcije, odnosno od veličine tumora i prokrvljenosti tkiva, što barem delom objašnjava različitost rezultata dobijenih u dosadašnjim istraživanjima.

Centralni nervni sistem (CNS) i tumori koji nastaju u istom svakako nose svoje specifičnosti u odnosu na druge vrste karcinoma. Na primer, mozak je izuzetno dobro prokrvljen, kao organ koji konzumira velike količine kiseonika (2% od telesne mase, a troši oko 20% kiseonika) vezano za svoju kontinuiranu aktivnost. Iako se ne tiče direktno teme ovog rada, interesantno je napomenuti da kod tumora mozga, oksidativni stres u tumoru može da izazove značajna oštećenja okolnog tkiva, jer su neuroni jedan od najosetljivijih tipova ćelija na oksidativni stres.³⁵ Redoks profili različitih tumora mozga nisu adekvatno i sistematski ispitani, a studije su rađene na malom broju pacijenata, uz utvrđivanje aktivnosti pojedinačnih parametara AOS bez analize promena u aktivnosti antioksidativnih enzimskih komponenti kao celine i njihovog efekta na cirkulaciju. O

ovome će se govoriti u posebnom poglavlju, nakon što se upoznamo sa karakteristikama i funkcijama ROS i RNS, komponentata AOS, kao i redoks osobinama tumora mozga koji su ovde od interesa.

2.1. REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA I AZOTA

ROS predstavlja grupu reaktivnih jedinjenja koja sadrže kiseonik, i u kojima je kiseonik od centralnog značaja za reakcije sa biomolekulima (slična definicija važi i za RNS i ostale grupe). Reaktivne vrste se dele na slobodne radikale i neradikalske vrste. U skladu sa definicijom, pod slobodnim radikalima se podrazumevaju hemijski entiteti koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i mogu nezavisno da postoje. Zbog viška elektrona u omotaču radikali imaju snažan oksidativni potencijal i vrlo su reaktivni. Radikali kiseonika (Tabela 1) spadaju među fiziološki najznačajnije jer služe kao supstrat za stvaranje drugih reaktivnih vrsta. Centralno mesto zauzima superoksid anjon radikal ili superoksid radikal ($O_2^{\cdot-}$), koji nastaje dovođenjem jednog elektrona na kiseonik u osnovnom stanju. On je progenitor praktično svih ROS i nekih RNS. Osnovni izvor su mitohondrije, odnosno elektronski transport na unutrašnjoj membrani ovih organela, ali može nastati i aktivnošću različitih enzima, kao što je ksantin oksidaza i NADPH oksidaza. Vreme poluživota $O_2^{\cdot-}$ u biološkom miljeu je oko 10^{-6} s. Kako je naelektrisan ne interaguje sa membranom, ali može da bude protonovan do OOH^{\cdot} (oko 3% na pH 7), koji lako izaziva oksidativna oštećenja membranskih lipida - lipidnu peroksidaciju. Superoksid radikal ostvaruje signalnu funkciju tako što interaguje sa Fe-S centrima nekih enzima. Interakcija sa metalnim centrima drugih proteina predstavlja osnovni način na koji $O_2^{\cdot-}$ direktno indukuje oksidativna oštećenja (ireverzibilna inhibicija). Superoksid ne može da napusti mitohondrije, ali može (u manjoj meri) ćeliju kroz kanale za negativne jone na ćelijskoj membrani. Dovođenje dva dodatna elektrona vodi stvaranju H_2O_2 , a četiri dodatna elektrona (uz protonaciju) dovode do stvaranja vode. Osnovni način nastanka H_2O_2 je od $O_2^{\cdot-}$, kroz aktivnost SOD, ali i neenzimskom dismutacijom, i aktivnošću određenih enzima kao što je dualna oksidaza. Ono što je zanimljivo za ćelike kancera, povećana mitohondrijalna aktivnost (vezana za ubrzani metabolizam) dovodi do povećane produkcije $O_2^{\cdot-}$ i pojačanog "curenja" H_2O_2 iz ovih organela. Međutim, još važnija je

činjenica, koja može delovati paradokasno, da je produkcija ROS u mitohondrijama pojačana u hipoksičnim uslovima.³⁶ Vodonik peroksid je glavna signalna vrsta među ROS, i jedina za koju je ovakva funkcija široko potvrđena. Najvažniji redoks prekidači osetljivi na H₂O₂ su tiolne (-SH) grupe, koje se modifikuju u tri koraka. Prvi do -SOH je najvažniji za signalizaciju i reverzibilan je, sledeći je -SO₂H koji je mnogo manje reverzibilan, i treća ireverzibilna forma je -SO₃H, koja često predstavlja znak intenzivnog oksidativnog stresa i uključena je u signalizaciju apoptoze. Dužina poluživota za H₂O₂ je preko 1 s. Dakle relativno je stabilan, a pošto nema naelektrisanje može da difunduje direktno kroz lipidni dvosloj, a takođe postoje kanali - akvaporini, kroz koje može da se prenese u vanćelijsku sredinu (npr. krv). Osim direktne oksidacije tiolnih grupa, H₂O₂ može da reaguje se redoks-aktivnim metalima (Fe, Cu). Ova reakcija se zove Fentonava, i za proizvod ima hidrosil radikal (·OH), koji je ekstremno reaktivan i gotovo potpuno neselektivan. Ovaj radikal najčešće reaguje sa najbližim biomolekulom izazivajući oksidativna oštećenja. Neke reaktivne vrste mogu da nastanu ne samo redukcijom već i dovođenjem energije molekulskom kisoniku. Tako na primer, nastaje singlet kiseonik (¹O₂) koji nema nesparenih elektrona i nije radikal, ali je i pored toga izuzetno toksičan.^{1,2,37-39}

Tabela 1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS)

RADIKALI		NERADIKALI	
O ₂ ^{·-}	Superoksid	H ₂ O ₂	vodonik peroksid
·OH	Hidrosil	HOCl	hipohlorna kiselina
RO ₂ [·]	Peroksil	O ₃	ozon
RO [·]	Alkosil	¹ O ₂	singlet kiseonik
HO ₂ [·]	Hidroperoksil		

Pored slobodnih radikala kiseonika, u organizmu se javljaju i radikali ugljenika (trihlormetil radikal CCl₃[·] i dr.), sumpora (tiol radikali -R-S[·]), kao i reaktivne vrste azota (Tabela 2). Od RNS, najvažniji su NO i peroksinitrit. NO predstavlja dobro poznatu signalnu vrstu, ali kao i kod H₂O₂, povišena produkcija koja rezultira u koncentracijama koje prevazilaze fiziološki opseg može da ima patološke efekte. NO je nepolaran i ima

veliki biološki radius, tako da lako napušta tkivo i ulazi u cirkulaciju. Enzimi koji produkuju NO se nazivaju NO sintaze (NOS). Postoje tri vrste neuralna (nNOS), endotelijalna (eNOS) i inducibilna (iNOS). iNOS u normalnim ćelijama i pod normalnim uslovima nije prisutna, međutim kada se njena ekspresija indukuje, dolazi do formiranja velikog broja kopija ovog enzima, te kada iNOS postoji u ćeliji to dovodi do nekoliko redova veličine veće produkcije NO u odnosu na produkciju koju ostvaruju eNOS ili nNOS. Peroksinitrit je "mračna strana" NO-a. Nastaje u veoma brznoj reakciji NO sa $O_2^{\cdot-}$. Dalje može da se protonuje do peroksiazotne kiseline, koja se zatim dekomponuje na azot dioksid i $\cdot OH$.^{1,2}

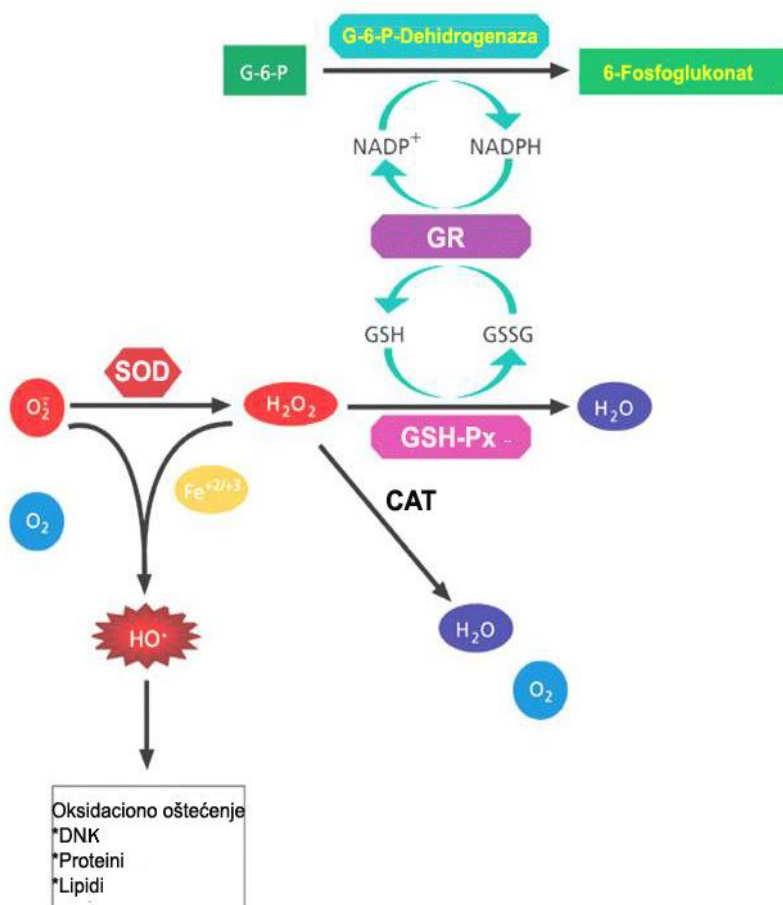
U organizmima slobodni radikali mogu da nastanu delovanjem raznih enzimskih i neenzimskih sistema smeštenih na ćelijskim membranama, u citoplazmi, plazma membrani i krvnim ćelijskim elementima. Slobodni radikali najvećim delom nastaju u mitohondrijama, ali i u peroksizomima, mikrozomima, ćelijskim membranama, i kao sporedni produkti aktivnosti određenih enzima (ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze).⁴⁰ Neki tipovi ćelija intenzivno produkuju reaktivne vrste kiseonika, kao što je slučaj sa inflamatornim ćelijama (polimorfonuklearni leukociti) i fagocitima (neutrofili, eozinofili, monociti makrofagi).⁴¹

Tabela 2. Reaktivne vrste azota (RNS)

RADIKALI		NERADIKALI	
NO^{\cdot}	azot monoksid	HNO_2	azotasta kiselina
NO_2^{\cdot}	azot dioksid	N_2O_3	azot trioksid
		N_2O_4	azot tetraoksid
		NO_2^+	nitronijum (nitril) jon
		$ONOO^-$	peroksinitrit
		$ONOOH$	peroksiazotna kiselina
		$ROONO$	alkil peroksinitrit
		NO^-	nitroksil anjon
		NO^+	nitrozil katjon
		NO_2Cl	nitril hlorid

2.2. ENDOGENA ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

AOS nastao je tokom evolucije kod svih aerobnih organizama kako bi se sprečila, ograničila ili popravila oštećenja nastala delovanjem ROS. Antioksidativni zaštitni sistem obuhvata primarnu i sekundarnu antioksidativnu zaštitu. Primarna zaštita sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenti.^{42,43} Ovaj sistem čine enzimi: SOD, CAT, GSH-Px i GR, šematski prikazani na slici 1.



Slika 1. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

Neenzimske komponente antioksidacionog primarnog zaštitnog sistema dele se na:^{44,45}

1. supstance rastvorljive u mastima (liposolubilne): vitamin E (tokoferol), vitamin A (retinol), provitamin A (karoten), koenzim Q (ubihinon)

2. supstance rastvorljive u vodi (hidrosolubilne): vitamin C (askorbinska kiselina), mokraćna kiselina, albumin, transferin, ceruloplazmin, feritin, bilirubin, cistein, histidin i laktoferin.

Sekundarnu antioksidacionu zaštitu čine protein specifične oksidoreduktaze (tiol-reduktaze),⁴⁶ protein-ADP-ribozil-transferaze,⁴⁷ i ATP i Ca²⁺-nezavisne proteaze.⁴⁸

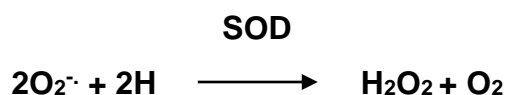
2.2.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaze (EC 1.15.1.1) čine glavnu liniju odbrane od toksičnosti koju stvara kiseonik u živim ćelijama. SOD je metaloprotein koji katalizuje konverziju superoksid anjon radikala u molekularni kiseonik i vodonik-peroksid. Postoje četiri vrste u zavisnosti od metala koji sadrže u centru: - koja sadrži gvožđe - Fe SOD, koja sadrži mangan - Mn SOD, koja sadrži bakar i cink - CuZn SOD i ekstracelularna EC SOD.⁴² Struktura CuZn SOD je prikazana na Slici 2. U humanim ćelijama su zastupljene CuZn SOD (u citoplazmi) i Mn SOD (u mitohondrijama). U eritrocitima (nemaju organele) je prisutna CuZn SOD koja ima funkciju da ukloni superoksid nastao autooksidacijom oksihemoglobina.⁴⁹ U endotelu, ovaj enzim igra veoma važnu ulogu u zaštiti NO od destrukcije od strane superoksida, čime sprečava i nastanak ONOO⁻.⁵⁰



Slika 2. Trodimenziona struktura CuZn SOD

Reakcija dismutacije $O_2\cdot^-$ koju SOD katalizuje izgleda ovako:



Brzina enzimske reakcije iznosi $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$, što je za oko 10^4 puta brže od spontane dismutacije superoksida njen radikala pri normalnom pH. Važno je napomenuti da proizvod H_2O_2 , koji predstavlja proizvod SOD aktivnosti, može da ireverzibilno inhibira CuZn SOD. Vodonik peroksid može da redukuje bakar u Cu^{2+} u aktivnom centru ovog enzima do Cu^+ . Jednovalentni bakar ulazi u Fentonovu reakciju sa H_2O_2 pri čemu dolazi do lokalizovane produkcije $OH\cdot$ koji izaziva oksidaciju histidina u aktivnom centru.⁵¹ Formira se 2-oksohistidin čime je SOD funkcija ugašena,⁵² a enzim čak može da pokaže pro-oksidativnu aktivnost.⁵³

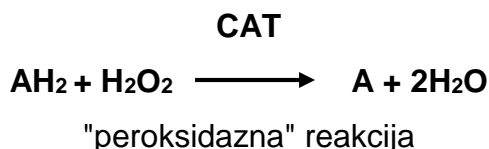
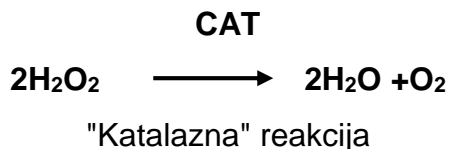
2.2.2. Katalaza (CAT)

Katalaza (EC 1.11.1.6) (Slika 3.) katalizuje redukciju vodonik-peroksida u vodu i molekularni kiseonik sa konstantom brzine "katalazne" reakcije od $10^7 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Katalaza može da vrši i oksidacije H-donora uz utrošak jednog molekula vodonik peroksida sa konstantom brzine "peroksidazne" reakcije (spore) od 10^2 – $10^3 \text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Da li će katalaza katalizovati brzu-"katalaznu" ili sporu-"peroksidaznu" reakciju, zavisi od brzine nastajanja vodonik peroksida kao i od koncentracije donora vodonika.⁵⁵



Slika 3. Trodimenziona struktura CAT

Aktivnost CAT se odvija kroz sledeće reakcije:⁴²



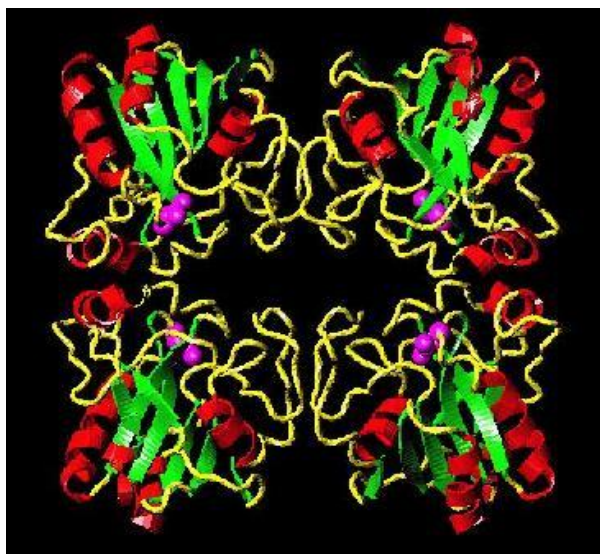
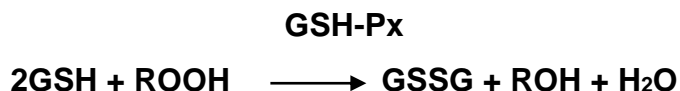
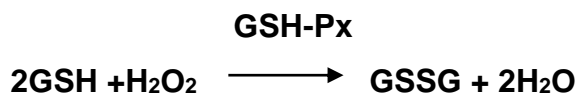
CAT je ključni enzim u eritrocitima odgovoran za uklanjanje kako egzogenog H_2O_2 (npr. poreklom iz tumorskog tkiva, disfunkcionalnog endotelijuma, ćelija uključenih u inflamaciju), tako i endogenog H_2O_2 (proizvedenog kroz auto-oksidaciju oksihemoglobina).^{56,57} Okolno tkivo može ostvariti efekat na CAT aktivnost u eritrocitima kroz pojačanu emisiju NO, koji je inhibitor ovog enzima.⁵⁸

2.2.3. Glutation peroksidaza (GSH-Px)

Glutation redoks ciklus predstavlja glavni put redukcije organskih hidroperoksida u kome centralno mesto zauzima enzim glutacion peroksidaza (EC 2.2.5.1.18) (Slika 4). Prisutna je u svim ćelijama kičmenjaka.

Postoji nekoliko oblika ovog enzima: selen-zavisna glutacion peroksidaza (Se GSH-Px), koja redukuje H_2O_2 do vode i organskih hidroperoksida uz prisustvo GSH kao drugog supstrata, zatim selen-nezavisna forma koja koristi samo organske hidroperoksidge kao supstrat i pripada familiji enzima glutacion-S-transferaza (GST), koja katalizuje reakciju konjugacije GSH sa raznim organskim jedinjenjima, kao i enzim fosfolipid-hidroksiperoksid glutacion peroksidaza (PH GSH-Px), koja reaguje samo sa fosfolipidnim hidroperoksidima.⁵⁹

Osnovne reakcije GSH-Px aktivnosti su sledeće:⁴²



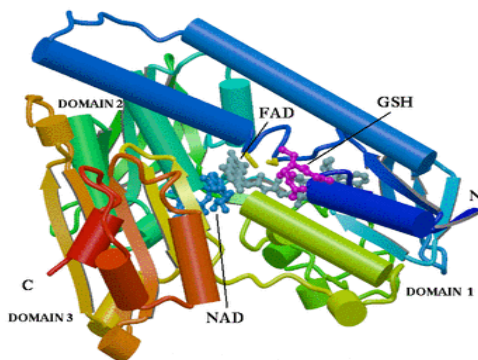
Slika 4. Trodimenziona struktura GSH-Px

U eritrocitima GSH-Px ima specifičnu ulogu da zaštiti ćelisku membranu pre svega, ali i hemoglobin od oksidativnih oštećenja. Ona uklanja H_2O_2 koji ulazi kroz membranu (egzogeni), kao i H_2O_2 koji nastaje kroz auto-oksidaciju hemoglobina vezanog za membranu. Osim toga, za zaštitu membrane je esencijalna sposobnost GSH-Px da uklanja lipidne hidroperoksidge, čime se zaustavlja lančana reakcija lipidne peroksidacije.⁵⁷

2.2.4. Glutation reduktaza (GR)

Enzim glutation reduktaza (EC 1.6.4.2) redukuje oksidovani glutation (GSSG) u redukovani, uz prisustvo NADPH (Slika 5). Redukovani NADPH se obezbeđuje preko

pentozo-monofosfatnog puta u kome u metabolizmu glukoze učestvuju enzimi glukozo-6-fosfat-dehidrogenaza (G-6-PD), kao i 6-fosfo-glukonat-dehidrogenaza, (6-PGD), pri čemu iz glukoze nastaje ribulozo-5-fosfat.¹ Kod sisara je smeštena u citosolu i mitohondrijama a glavna metabolička uloga GR je da održava glutation u redukovanom obliku (Slika 5).⁶⁰ Zanimljivo je da ONOO⁻ inhibira GR. Ovo se ostvaruje kroz nitraciju dva tirozinska aminkiselinska ostatka koja se nalaze na mestu vezivanja GSSG. Ovo sprečava vezivanje supstrata i smanjuje katalitičku efikasnost GR za oko 10³ puta.⁶¹ Reakcija koju GR katalizuje je:



Slika 5. Trodimenziona struktura GR

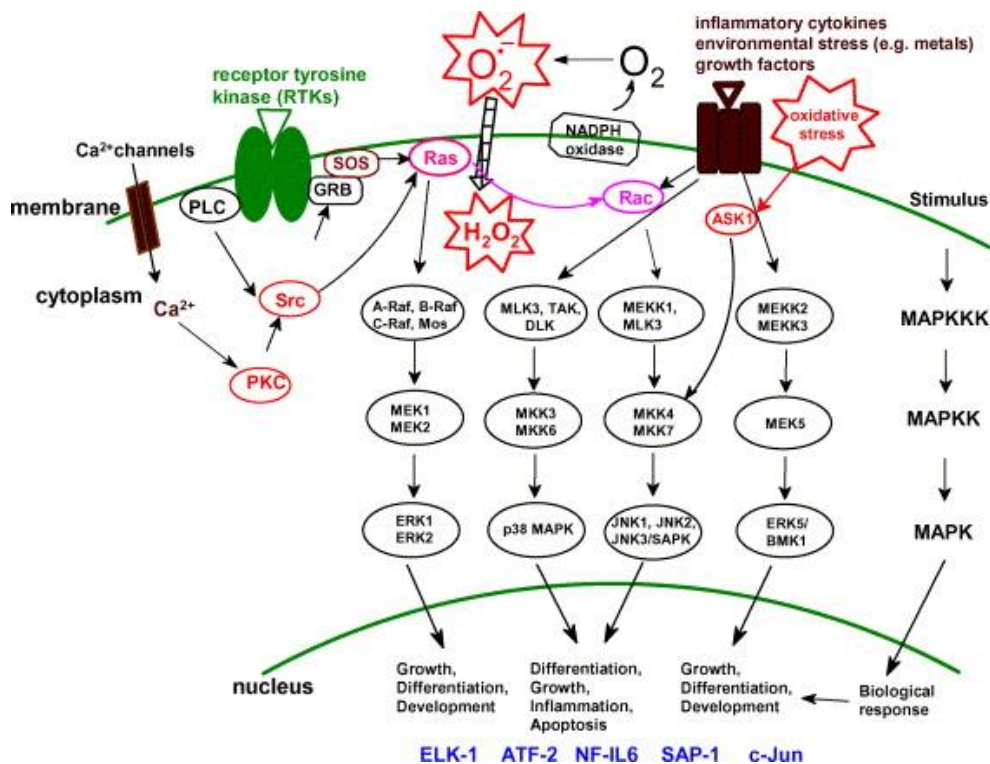
Osim za potrebe aktivnosti GSH-Px, održavanje fiziološkog nivoa GSH je važno i za neenzimsko uklanjanje ROS. U eritrocitima, u slučaju supresovane kuplovane GSH-Px/GR aktivnosti, dolazi do oksidativnih oštećenja na membrani, hemolize i degradacije hema.^{62,63} Tumorske ćelije mogu da koriste ovaj sistem za uklanjanje različitih lekova i njihovih metabolita. U mnogo slučajeva, GSH sistem je deregulisan, što predstavlja jedan od uzroka "multidrug" rezistentnosti.⁶⁴

2.3. SIGNALNA TRANSDUKCIJA I ROS

Ćelije su osetljive na različite signale u svojoj okolini, na koje reaguju i koje integrišu. Signalna transdukcija na ćelijskom nivou podrazumeva kretanje signala kroz ćeliju od spolja ka unutra. To je visoko specijalizovan ćelijski sistem koji integriše, prenosi i umnožava vanćelijsku informaciju sadržanu u hemijskom signalu. Hemijski signali su najčešće prirodni ćelijski produkti - hormoni, citokini, neurotransmiteri i faktori rasta.⁶⁵ Biohemijska osnova za pretvaranje vanćelijskih signala u unutarćelijski događaj je dugo predmet interesovanja.

Mehanizmi koji su u osnovi ROS posredovane signalne transdukcije uključuju direktnu promenu faktora transkripcije i kinaza i indirektnu modulaciju signalnih proteina bogatih cisteinom i osetljivih na redoks ćelijsku signalizaciju. U datom signalnom proteinu, dejstvo slobodnih radikala indukuje ili gubitak funkcije ili sticanje funkcije ili promenu funkcije. Osnovni principi H₂O₂ signalinga kod sisara su u velikoj meri opisani. Oni obuhvataju:⁶⁶⁻⁶⁸ (i) Inaktivaciju fosfataza, gde oksidacija određenog cisteinskog lokusa, odnosno -SH grupe do -SOH, sprečava enzim da prihvati fosfat. U nekim slučajevima se formira disulfidna veza, koja ima za ulogu da spreči dalju oksidaciju (do -SO₃H), čime se izbegava ireverzibilna inaktivacija; (ii) Aktivaciju ili inhibiciju kinaza. Na primer, H₂O₂ aktivira Src kinazu, koja indukuje promene na citoskeletu i omogućava ćelijsku migraciju; (iii) Aktivaciju ili derepresiju transkripcionih faktora. NF-κB, p53, HIF-1α, protein aktivator-1 (AP-1), protein aktivator-2 (AP-2), i p21 ras imaju redoks-senzitivne -SH grupe u domenu preko koga se vezuju za DNK. Ovi faktori imaju ključnu ulogu u kontroli ćelijske proliferacije, ćelijske diferencijacije i morfogeneze. Ovde je posebno od značaja da H₂O₂-indukovana oksidacija tiolnih grupa na DJ-1 i KEAP1 (koji je inhibitor Nrf2) rezultuje u derepresiji Nrf2-regulisane transkripcije niza enzima koji su uključeni u antixenobiotički i citoprotektivni odgovor. Jedan od tih enzima je i GST, koji je integrativni deo GSH sistema i ima važnu ulogu u nastanku rezistentnosti kancer ćelija na terapeutike i zračenje.⁶⁴ Interesantno je napomenuti da je transkripcioni faktor NF-κB otkiviran oksidacijom tiolnih grupa, dok se IκB kinaza inhibira od strane H₂O₂, što zajedno funkcioniše kao bifazni redoks-senzitivni mehanizam; (iv) Aktivaciju jonskih kanala, kao što su ATP-zavisni K⁺ kanali; (v) Modifikaciju aktivnosti niza drugih proteina.

Verovatno najznačajniji efekat ROS-a na signalne puteve je posmatran kroz MAPK signalni put (protein kinaze-aktivatori mitoze).⁶⁹ MAPK put (slika 6.) podrazumeva aktivaciju nuklearnih transkripcionih faktora (NF- κ B, AP-1, p53 idr.). Ovi faktori kontrolišu ekspresiju pojedinih gena koji popravljaju oštećenu DNA, zaustavljaju proliferaciju oštećenih ćelija i indukuju apoptozu. Nuklearni transkripcioni faktor NF- κ B je uključen u inflamatorni odgovor. AP-1 je odgovoran za ćelijski rast i diferencijaciju.⁶⁹ P53 je nuklearni faktor čija je ključna uloga zaštita ćelije od tumorigeneze, indukuje apoptozu u ćeliji koja je oštećena i zato se često naziva "tumor supresor". Mutacija u p53 dovodi do njegove inaktivacije što je pronađeno kod više od polovine karcinoma kod ljudi. P53 aktivira UV zračenje, γ -zračenje, hipoksija i drugo.⁷⁰ Generisanjem ROS u ćeliji, p53 indukuje ekspresiju p85 koji ima ulogu signalnog molekula u ROS-posredovanoj p53-zavisnoj apoptozu. Postoje rezultati koji pokazuju da pod normalnim/niskim oksidacionim stresom dolazi do ekspresije antioksidacionih gena što je pod kontrolom niske koncentracije p53.⁷¹ U slučaju jakog oksidacionog stresa postoje visoke koncentracije p53, dolazi do formiranja ROS i p53 posredovane apoptoze.⁷

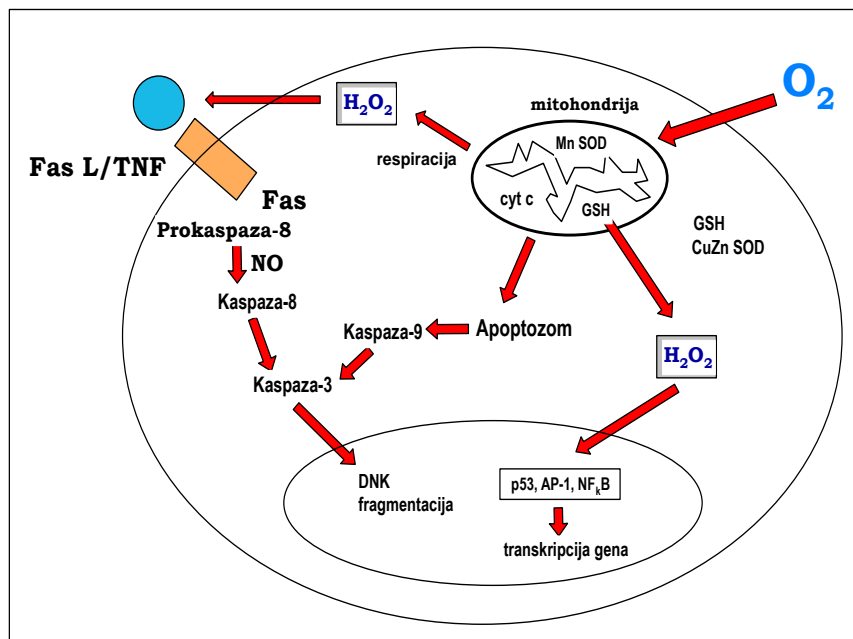


Slika 6. MAPK signalni put

2.4. APOPTOZA I ROS

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt je neophodna kako za pravilan razvoj tako i uništenje (smrt) ćelije, što je bitno za celokupni integritet organizma. Odluka ćelije da li će ući u apoptozu se zasniva na balansu između pozitivnih signala, koji su neophodni za kontinuirano preživljavanje (faktori rasta, interleukin 2) i primanja negativnih signala (povećana koncentracija oksidanasa unutar ćelije, oštećenje DNA, kao i drugi štetni efekti izazvani zračenjem i hemio terapijom).⁷² Postoje 3 različita mehanizma koji uvode ćeliju u apoptozu:⁷³

1. Unutrašnji ili mitohondrijalni signali
2. Spoljašnji signali preko *death* receptora
3. apoptoza indukujući faktor (AIF)

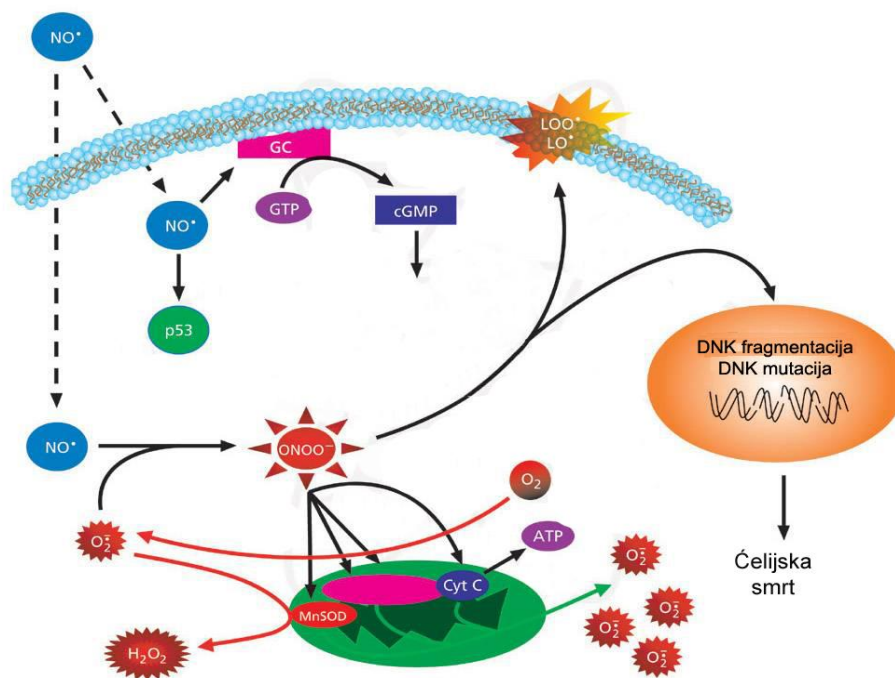


Slika 7. Interakcije ROS i RNS sa putevima apoptoze

Mehanizam apoptoze preko unutrašnjih signala podrazumeva unutaršnja oštećenja ćelije koja mogu biti indukovana od strane ROS, zračenja i dr. Oksidativna oštećenja mogu pokrenuti Bcl-2, protein koji se nalazi na spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani, da aktivira protein Bax koji formira jonski kanal na spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani i tom prilikom se oslobađa citohrom c. Oslobađanje citohroma c je ključan

dogadjaj jer dolazi do njegove agregacije sa proteinom Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*). Ovaj kompleks se vezuje i aktivira jednu proteazu, kaspazu-9.⁷⁴ Kaspaza-9 dalje aktivira efektorske kaspaze (3 i 7) i dolazi do digestije strukturnih proteina u citoplazmi, degradacije DNA i fagocitoze ćelije (slika 7).

NO-zavisna apoptoza je u asocijaciji sa smanjenjem koncentracije kardiolipina, smanjene aktivnosti elektron transportnog lanca i oslobađanje citohroma c. NO može biti medijator apoptoze, a isto tako može delovati i kao antiapoptozni signal, u zavisnosti od nivoa oksidansa, odnosno antioksidansa. On predominantno reguliše put određen ćelijskim tipom. Na primer, pretpostavlja se da je NO-om uzrokovana apoptoza u vaskularnoj glatkoj muskulaturi posredovana nagomilavanjem cikličnog GMP, dok intracelularno povećanje cikličnog GMP, kao odgovor na NO aktivaciju, inhibira apoptozu na PC12 ćelijama i hepatocitima. ONOO⁻ nastao u interakciji NO i superoksida ima snažan pro-apoptični efekat. ONOO⁻ je potentan oksidant koji izaziva DNA fragmentaciju i p53-zavisnu apoptozu (slika 8). U prilog tome govori i podatak da je nakupljanje tumorskog supresornog proteina p53 krucijalni, rani događaj kod NO posredovane apoptoze.^{75,76}



Slika 8. Šematski prikaz signal transdukcionih puteva NO indukovane apoptoze

2.5. TUMORI MOZGA

2.5.1. Podela tumora prema WHO klasifikaciji

Tumori centralnog nervnog sistema se dele na:⁷⁷

1. Tumore neuroepitelnog tkiva
2. Tumore kranijalnih i spinalnih nerava
3. Tumore porekla meninga
4. Hematopoetične neoplazme
5. Tumore germinativnih ćelija
6. Ciste i lezije nalik tumorima
7. Tumore selarne regije
8. Lokalne ekstenzije regionalnih tumora
9. Metastatske tumore

Tumori neuroepitelnog tkiva predstavljaju signifikantnu promenu koju obično podrazumevamo kao primarne moždane tumore. Termin "glioma" se obično koristi za sve glijalne tumore od "low-grade" glioma do "high-grade" glioma i podrazumeva samo tumore koji vode poreklo od astrocita. Glioblastom multiforme pripada ovoj grupi tumora porekla astrocita i klasifikovan je kao gradus IV od ukupno četiri gradusa, s tim da postoje dve varijacije:

- a.) Glioblastom gigantskih ćelija (Giant cell glioblastoma)
- b.) Gliosarkom

Tumori porekla meninga mogu se podeliti u četiri podgrupe:

1. Tumori meningotelnih ćelija:
 - A) Meningeomi
 - Meningotelni
 - Fibroblastični
 - Tranzicionalni (miksni)
 - Psamomatozni
 - Angiomatozni

- Mikrocistični
- Sekretorni
- Clear cell
- Hordoid
- Limfoplazmacitima bogat
- metaplastični

B) Atipični meningeomi

C) Anaplastični (maligni) meningeomi

2. Mezenhimni tumori (nemeningotelni tumori):

A) Beningne neoplazme

- Osteokartilaginozni tumori
- Lipomi
- Fibrozni histiocitomi
- drugo

B) Maligne neoplazme

- Hemangiopericitom
- Hondrosarkom, varijetet mezenhimni hondrosarkom
- Maligni fibrozni histiocitom
- Rabdomiosarkom
- Meningealna sarkomatoza
- Drugo (veoma retko javlja se primarni moždani sarkom koji može biti rezultat sarkomatozne promene već postojećih tumora, kao što su menigeomi, glioblastomi ili oligodendrogliomi)

3. Primarne melanocitične lezije

- Difuzna melanoza
- Melanocitom
- Maligni melanom primarno u CNS-u i njegova varijanta meningealna melanomatoza

4. Tumori neodređene histiogeneze

- Hemangioblastom (kapilarni hemangioblastom)

2.5.2. Moždani tumori – klinička slika

Najčešća klinička slika predstavljena je progresivnim neurološkim deficitom (68%), obično motornom slabošću (45%). Glavobolja kao simptom javlja se u (54%), a epileptični napad u (26%).⁷⁸⁻⁸⁰

Klinička slika kod supratentorijalnih tumora

Znaci i simptomi:

1. Prouzrokuju povišenje intrakranijalnog pritiska:
 - Zbog mas-efekta tumora i/ili edema nastalog tumorskim rastom
 - Zbog blokade likvorne cirkulacije (hidrocefalus), ređe se javljaju kod supratentorijalnih tumora osim kod bolesnika koji imaju koloidnu cistu ili kada tumor zahvata unutrašnjost lateralnih komora
2. Prouzrokuju progresivni fokalni deficit uključujući slabost i disfaziju (37-58%) kod pacijenata sa tumorom najčešće u levoj moždanoj hemisferi:
 - Zbog destrukcije moždanog parenhima tumorskom invazijom
 - Zbog kompresije moždanog parenhima tumorskom masom i/ili peritumorskim edemom i/ili krvarenjem
3. Glavobolja
4. Epileptični napad - nije uobičajeno da bude prvi simptom moždanog tumora, posebno kod pacijenata starijih od 20 godina. Veoma retko se javlja kod tumora zadnje lobanjske jame ili selarne regije.
5. Mentalni status menja se u pravcu depresije, letargije, apatije i konfuznosti
6. Simptomi koji liče na TIA (tranzitorni ishemijski atak) mogu biti prouzrokovani:
 - Okluzijom krvnih sudova tumorskim ćelijama
 - Krvarenjem u tumoru
 - Fokalnim epileptičnim napadima
7. U specifičnim situacijama kod pituitarnih tumora mogu biti prisutni:
 - Simptomi endokrine disfunkcije
 - Krvarenje u hipofizi
 - Nazolikvoreja

Klinička slika kod infratentorijskih tumora

Epileptični napad je veoma redak za razliku od supratentorijskih tumora:

1. Najčešći simptomi i znaci kod tumora zadnje lobanjske jame prouzrokovani su povišenim intrakranijalnim pritiskom (posledica konsekutivnog hidrocefalusa) i uključuju:
 - Glavobolju
 - Mučninu i povraćanje, kao posledicu porasta intrakranijalnog pritiska ili zbog direktne stimulacije vagusnih jedara u area postrema ("centar za povraćanje")
 - Edem papile - javlja se u 50-90% slučajeva i češći je kod tumora koji kompromituju cirkulaciju likvora
 - Poremećaji hoda/ataksija
 - Vrtoglavica
 - Diplopije koje nastaju direktnom kompresijom šestog kranijalnog nerva ili usled porasta intrakranijalnog pritiska
2. Znaci i simptomi prouzrokovani mas-efektom u različitim lokalizacijama zadnje lobanjske jame:
 - Lezije u cerebelarnoj hemisferi prouzrokuju ataksiju ekstremiteta, dismetriju i intencioni tremor
 - Lezije u vermisu cerebeluma dovode do pojave hoda na širokoj osnovi, trunčne ataksije i titubacije
 - Lezije moždanog stabla mogu dati poremećaj više kranijalnih nerava i dugih puteva i na njih se može posumnjati kada se pojavi nistagmus, posebno rotacionog ili vertikalnog tipa

Fokalni neurološki deficit povezan sa moždanim tumorima

Javlja se kao posledica infiltracije zahvaćenog dela mozga rastom tumora i usled destrukcije zahvaćenih struktura.

- Frontalni lobus: abulija, demencija, promene ličnosti. Često bez lateralizacije, dok su apraksija, hemipareza ili disfazija (kao posledica zahvaćenosti dominantne hemisfere) česta pojava

- Temporalni lobus: slušne i vidne halucinacije, déjà vu fenomen, poremećaji pamćenja. Kontralateralna gornja kvadrantanopsija može se detektovati testiranjem vidnog polja
- Parijetalni lobus: kontralateralni motorni i senzorni poremećaji, homonimna hemianopsija. Agnozija i apraksija su česte kod zahvaćenosti dominantne hemisfere
- Okcipitalni lobus: kontralateralni defekt u vidnom polju, aleksija - posebno kod infiltracije korpusa kalozuma tumorom
- Zadnja lobanjska jama - deficit kranijalnih nerava, ataksija (trunkalna ili apendikularna)

Glavobolja kod moždanih tumora

Javlja se sa ili bez povišenog intrakranijalnog pritiska. Podjednako se javlja kod pacijenata sa primarnim ili metastatskim tumorom. Jutarnje glavobolje opisuju se kao više izražene verovatno kao posledica hipoventilacije tokom perioda sna. Pogoršavaju se kašljanjem, naprezanjem ili u 30% zbog prinudnog položajem glave. Povezanost glavobolje sa mučninom i povraćanjem u 40% prisutno je zbog hiperventilacije tokom povraćanja. Navedene činjenice sa fokalnim neurološkim deficitom razlikuju glavobolje prouzrokovane moždanim tumorom od ostalih. Glavobolje u 77% pacijenta sa moždanim tumorom mogu se opisati kao tenzione glavobolje, u 9% kao migrenozne glavobolje i samo u 8% kao klasične glavobolje prouzrokovane moždanim tumorom. Dve trećine ovih pacijenata ima povišeni intrakranijalni pritisak.

Etiologija glavobolja uzrokovanih tumorom mozga

Glavobolje kod moždanih tumora javljaju se kao kombinacija sledećih faktora:

1. Povećani intrakranijalni pritisak može biti prouzrokovan
 - Tumorskim mas-efektom
 - Hidrocefalusom (opstruktivnim ili komunikantnim)
 - Tumorskim mas-efektom povezanim sa edemom mozga
 - Tumorskim mas-efektom povezanim sa krvarenjem
2. Invazijom ili kompresijom struktura koje poseduju nervne završetke

- Dura
 - Krvni sudovi
 - Periost
3. Sekundarni problemi sa vidom
 - Diplopija kao posledica disfunkcije nerava koji kontrolišu ekstraokularne mišiće
 - a.) Direktnom kompresijom na okulomotorijus, trohlearis i abducens
 - b.) Ispadi abducensa kao posledica intrakranijalne hipertenzije
 - c.) Intranuklearna oftalmoplegija prouzrokovana infiltracijom ili kompresijom moždanog stabla
 - Teškoća sa fokusiranjem zbog infiltracije ili kompresije optičkog nerva
 4. Ekstremnom hipertenzijom prouzrokovanom povišenim intrakranijalnim pritiskom
 5. Psihogeno glavobolja - izazavana stresom zbog gubitka funkcionalnih sposobnosti, naročito kod smanjenih radnih sposobnosti

Profilaktička antikonvulzivna terapija kod tumora mozga

Kod pacijenata sa tumorom mozga njih 20-40% ima epileptične napade u trenutku kada se tumor dijagnostikuje. Kod tih pacijenta indikovano je započinjanje antiepileptične terapije, ali je kroz brojne studije dokazano da profilaktičko uvođenje antiepileptika nije sprečilo pojavu epileptičnih napada koja je statistički značajna. Preporučuje se da se antiepileptična terapija ne uvodi profilaktički kod novodijagnostikovanog tumora, s tim da je posle operacije potrebno uvesti antiepileptičnu terapiju, čak i ako se ne očekuje pojava epileptičnih napada.

Hemoterapija kod moždanih tumora

Primena hemoterapije kod moždanih tumora najviše zavisi od prolaska leka kroz krvno-moždanu barijeru. Krvno-moždana barijera predstavlja prepeku na putu hemoterapeutskog leka i na taj način štiti tumor od njegovog uticaja. Nekada priroda tumora pomaže leku da premosti krvno-moždanu barijeru i to:⁸¹

1. Neki tumori centralnog nervnog sistema mogu parcijalno da prekinu krvno-moždanu barijeru, posebno maligni gliomi

2. Lipofilna jedinjenja (agensi rastvorljivi u mastima; npr. nitrozoureja) mogu lako proći krvno-moždanu barijeru
3. Selektivna intraarterijska (intrakarotidna) injekcija prouzrokuje povećanu lokalnu koncentraciju leka koji lakše prolazi kroz krvno-moždanu barijeru uz redukovanu sistemsku toksičnost
4. Krvno-moždana barijera može biti jatrogeno prekinuta (npr. aplikacijom manitola) prilikom primene hemoterapeutskog leka
5. Krvno-moždana barijera može biti premošćena intratekalnom primenom hematoterapeutika ili aplikacijom direktno u lateralnu moždanu komoru.
6. Biorazgradljivi polimer (vafer) sadrži hematoterapeutske lek koji može biti direktno implantiran

2.5.3. Glioblastoma multiforme (WHO Gr IV)

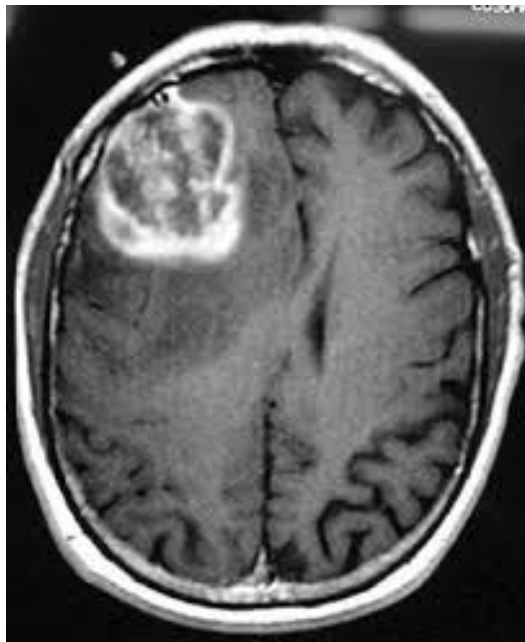
Glioblastom multiforme je najčešći i najmaligniji primarni tumor mozga astrocitnog porekla.⁸² Histološki parametri ukazuju da neki od sledećih nalaza ukazuju na prirodu i poreklo tumora:

- pojava gemistocitičnih astrocita
- Neovaskularizacija sa endotelnom proliferacijom
- Polja nekroze
- Pseudopalisadi sa okolnim poljima nekroze

Infratentorijalni glioblastom multiforme veoma je redak i predstavlja subarahnoidnu diseminaciju supratentorijalnog tumora. Glijalni fibrilarni kiselinski protein (GFAP) je imunopozitivan kod svih astrocitoma.

Gliomi mogu imati cističnu centralnu nekrozu, ali mogu posedovati i cističnu komponentu bez polja nekroze. Sadržaj ciste razlikuje se od cerebrospinalne tečnosti (likvora) i obično je ksantohroman. Cistična komponenta javlja se kod glioblastoma multiforme, ali je najčešća karakteristika pilocitičnog astrocitoma. Astrocitomi su najčešće lokalizovani u beloju masi (centrum semiovale) i prate puteve bele mase tokom svog širenja. Kalcifikacije i ciste javljaju se kod 10-20% svih anaplastičnih astrocitoma. Radiološka prezentacija glioblastoma na CT-u i MRI veoma je tipična i prepoznatljiva. Na

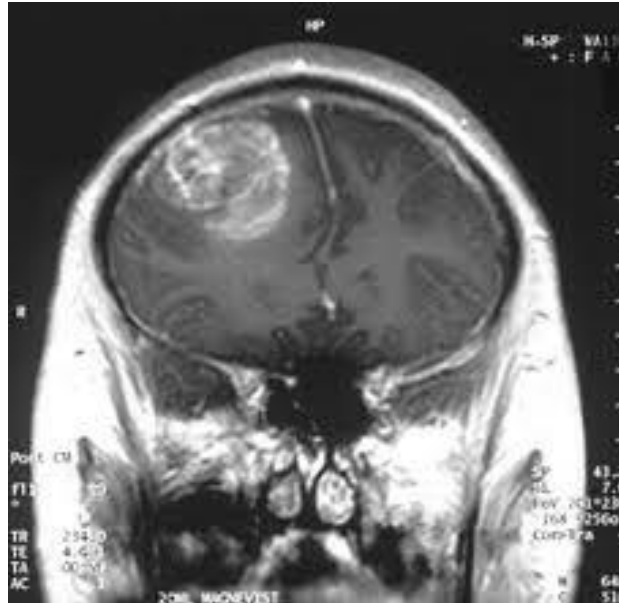
CT-u uočava se jasna kružna ograničenost od okolnih struktura, gde se centralna nekroza ispoljava smanjenim denzitetom. Takođe, poznato je da van takozvanog prstena tumorske ćelije se mogu naći i na udaljenosti od nekoliko santimetara.



Slika 9. Frontalni glioblastom multiforme na aksijalnoj MR endokranijuma



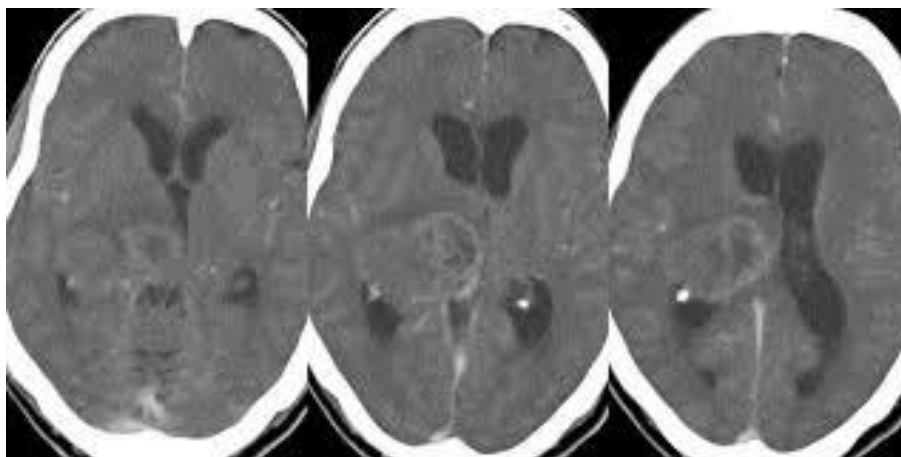
Slika 10. Frontalni glioblastom multiforme na sagitalnoj MR endokranijuma



Slika 11. Frontalni glioblastom multiforme na koronarnoj MR endokranijuma

Manje od 10% recidivantnih glioblastoma javlja se na udaljenom mestu od primarne lokalizacije. Gliomi se šire u sledećim pravcima:

1. Širenjem kroz belu masu
 - a.) Korpus kalozum – širenjem iz tela korpusa kalozuma nastaju bilateralni frontalni glioblastomi poznati kao "butterfly" gliomi – gliomi oblika leptira, a širenjem iz splenijuma korpusa kalozuma zahvaćena su oba parijetalna lobusa tumorom
 - b.) Cerebralni pedunkul – zahvaćene središnje strukture
 - c.) Kapsula interna
 - d.) Fasciculus uncinatus
 - e.) Intertalamični pripoj obuhvata bilateralne talamične gliome
2. Putem cerebrospinalne tečnosti - 10-25% glioma širi se meningealnim i transventrikularnim tipom širenja

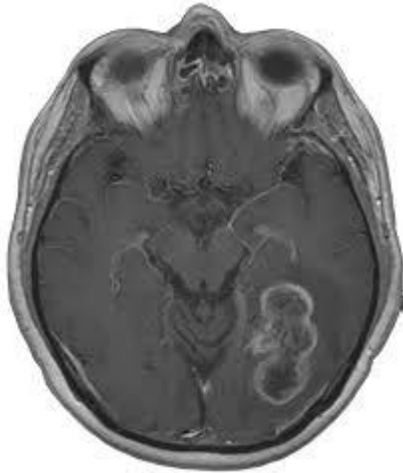


Slika 12. Glioblastom multiforme na aksijalnoj ravni CT endokranijuma

Gliomi se veoma retko šire sistemski. Multiple gliomatozne mase mogu se videti u nekoliko situacija:

1. Konvecionalni glioblastom koji se širi na neki od navedenih načina
2. Gliomatoza mozga - predstavlja difuzni, infiltrativni astroцитom koji invadira celu mozdanu hemisferu i moždano stablo
3. Meningealna gliomatoza - nastaje diseminacijom glioma putem likvora), slično kao i karcinomatoza meningi. Javlja se kod 20% pacijenata sa glioblastomom i tada se viđa u formi kranijalne neuropatije, radikulopatije, mijelopatije, demencije i/ili komunikatnog hidrocefalusa
4. Multipli primarni gliomi se javljaju ređe i to u 2–20% i tada su udruženi sa neurofibromatozom i tuberoznom sklerozom, a ređe sa multiplom sklerozom i progresivnom multifokalnom leukoencefalopatijom

Kod multiplih glioma nije indikovano operativno lečenje i intersticijalno zračenje, već iradijacija celog mozga i konkomitantna hemoterapija.



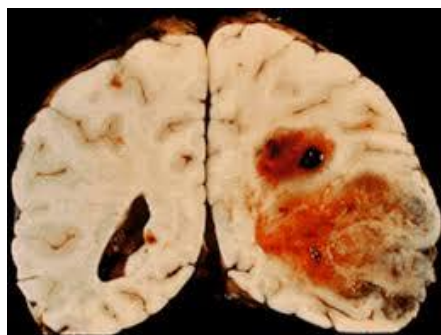
Slika 13. Glioblastom multiforme na aksijalnoj ravni MR endokranijuma.

Terapija kod Glioblastoma multiforme gr IV

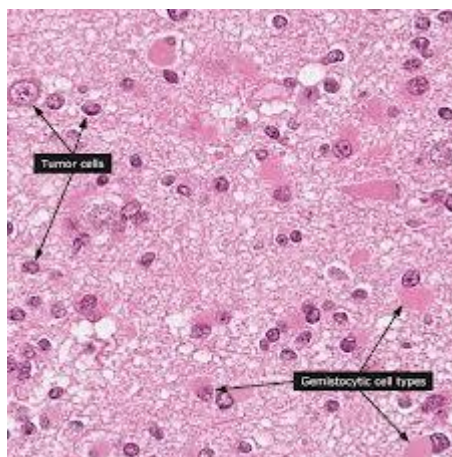
Citoreduktivna hirurgija ili maksimalna resekcija tumora sa zračnom terapijom od 40 Gy celog mozga i 15-20 Gy ležišta tumora je standardna uz primenu adjuvantne hemoterapije.⁸³ Ekstenzivnost operacije, kao i volumen rezidualnog tumora, pokazali su se kao signifikantan faktor kada je u pitanju tumorska progresija i srednje vreme preživljavanja. Jedna od najvažnijih stvari u terapiji glioblastoma je dužina preživljavanja posle primene kombinovane terapije. Takođe je bitno da se kod starijih pacijenata od 65 godina proceni šta je najsvrsishodnije načiniti, jer su brojne studije pokazale da je posle biopsije tumora i onkološke terapije srednje vreme preživljavanja svega 17 nedelja, u odnosu na 30 nedelja ukoliko se načini radikalna hirurška intervencija i primeni onkološka terapija. Parcijalna resekcija glioblastoma nosi značajan rizik od postoperativnog krvarenja i/ili edema koji može prouzrokovati hernijaciju mozga. Na osnovu svega iznetog, poželjno je načiniti maksimalnu redukciju tumora kada je to god moguće.

Pacijenti koji nisu kandidati za operativno lečenje su:

1. Glioblastom sa ekstenzivnom infiltracijom dominante hemisfere
2. Lezije sa bilateralnom progresijom (veliki butterfly gliomi)
3. Pacijenti u podmaklom životnom dobu
4. Pacijenti sa niskim Karnofski skorom



Slika 14. Glioblastom multiforme – patološki preparat.



Slika 15. Histološka građa glioblastoma multiforme

Radioterapija kod pacijenata sa glioblastomom multiforme

Uobičajena doza radioterapije kod malignih glioma je 50–60 Gy. Kada primenimo zračenje celog mozga, u poređenju na primenjenu terapiju na samo ležište tumora, nema velike razlike u preživljavanju, ali su kod fokalne iradijacije znatno redukovani nepovoljni efekti zračenja. Može se primeniti i brahiterapija koja nije pokazala signifikantnu razliku u odnosu na klasičnu zračnu terapiju.⁸⁴

Hemoterapija kod pacijenta sa glioblastomom multiforme

Terapija koja se danas koristi nije u značajnijoj meri povećala dužinu preživljavanja, ali važeći modaliteti primene su da se daje pre, uporedo ili posle radioterapije, ali u svakom slučaju posle operativnog zahvata. Najčešće se koriste Carmustine (BCNU), u dozi 110mg/m² u trajanju od 6 nedelje i Lomistine (CCNU), u dozi od 100 mg/m² prvog dana

terapije kao primarna hemoterapeutska sredstva. Poslednjih nekoliko godina počela je primena Temozolomida (Temodal) kod novootkrivenih glioblastoma multiforme, kao i kod recidiva nakon operacije i to u dozi od 150 mg/m² u trajanju od 5 dana i takvi ciklusi se ponavljaju svakih 28 dana.⁸⁵

Reoperacije recidiva glioblastoma multiforme izvode se kod pacijenata mlađeg životnog doba, koji su u dobroj kondiciji, sa visokim Karnofski skorom. Sama reoperacija nosi rizik od povišenog morbiditeta od 5-18%, rizik od infekcije do 3 puta veći u odnosu na prvobitnu operaciju, a nije redak slučaj da se pojavi i dehiscencija operativne rane.

Preživljavanje pacijenata lečenih zbog glioblastoma multiforme može se izraziti kroz tri statistički nezavisna faktora koji utiču na dužinu života:

1. kod pacijenata mlađih od 40 godina prosečno preživljavanje od 18 meseci se postiže kod 50% pacijenta, kod pacijenata između 40-60 godina iznosi 20%, a kod pacijenta starijih od 60 godina samo 10%
2. Histološka verifikacija tumora upućuje na prosečno preživljavanje od 36 meseci kod anaplastičnih astrocitoma i kod glioblastoma multiforme od 10 meseci
3. preoperativni Karnofski skor određuje prosečno preživljavanje od 18 meseci u 34% slučajeva ako je Karnofski skor bio iznad 70, dok isti period preživljavanja ima samo 13% pacijenata ukoliko im je skor bio manji od 60. Uz svu poznatu terapiju koju je danas moguće primeniti i ukoliko je preoperativni Karnofski skor veći od 70, samo 7.6% pacijenata preživi 5 godina, a ako je Karnofski manji od 60, preživljavanje od 5 godina je prisutno samo kod 3.2% pacijenata.

2.5.4. Meningeomi

Meningeomi rastu sporo, najčešće su benignih histopatoloških karakteristika, ekstra-aksijalne lokalizacije i potiču od ćelija arahnoideje (ne sa dure). Obično je moguće odstraniti ih u potpunosti. Najčešće lokalizacije su na falksu, konveksitetu ili sfenoidalnoj kosti. U nekim slučajevima izazivaju hiperostozu koja se nalazi iznad pripoja, dok su kalcifikacije vrlo čest nalaz. U histološkom nalazu dominiraju psamomatozna tela.⁸⁶

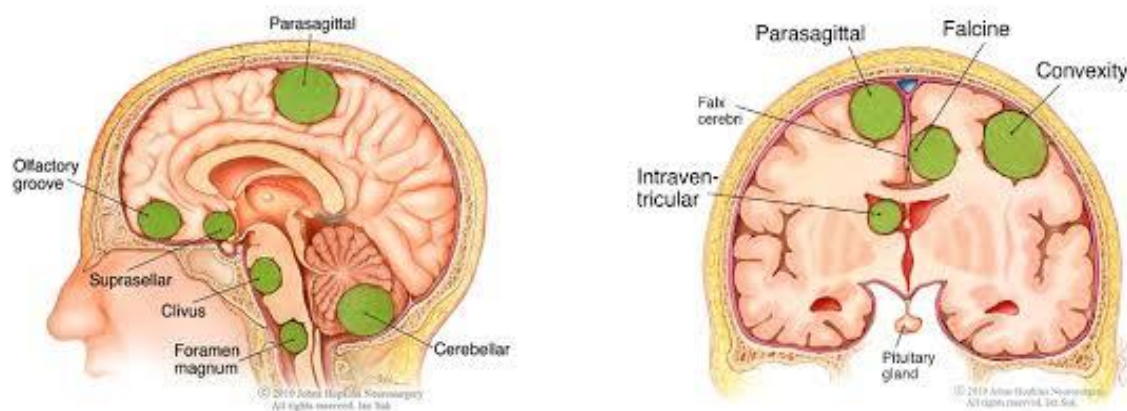
Gde god ima arahnoidnih ćelija (između mozga i baze lobanje, između moždanih komora i duž spinalnog stuba) moguće je naći pripoj meningeoma. Ove neoplazme obično sporo rastu, imaju cirkumskriptni oblik i ne invadiraju okolne strukture. Histološki maligni tipovi imaju incidencu od 1.7% i tada im je rast veoma brz. Kod neurofibromatoze mogu se uočiti multipli meningeomi i to u 8% slučajeva. Poseban entitet su en plaque meningeomi koji se prostiru na velikoj površini.

Epidemiologija meningeoma

Prema dosadašnjim istraživanjima, kod svih autopsija pacijenata starih preko 60 godina, menigeomi su pronađeni u 3% nalaza. Od svih primarnih intrakranijalnih neoplazmi na meningeome otpada 14.3–19%. Vrh incidence javljanja je 45 godina života, a odnos žena i muškaraca je 1.8:1. U dečijem uzrastu javljaju se u 1.5% u periodu od 10 do 20 godine. 19–24% meningeoma adolescentnog perioda javlja se kod pacijenata kod kojih je potvrđena neurofibromatoza tip I (Mb Von Recklinghausen).

Lokalizacija meningeoma

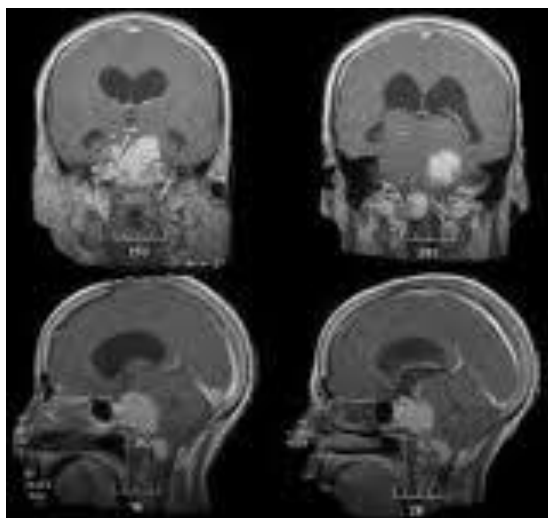
Najčešće lokalizacije tumora su parasagitalna 20.8%, konveksitetna 15.2%, tuberkulum sele 12.8%, sfenoidalni greben 11.9%, olfaktorna 9.8%, falksna 8%, lateralna komora 4.2%, tentorijum 3.6%, srednja moždana jama 3%, orbita 1.2%, spinalna 1.2%, u Silvijevoj fisuri 0.3%, ekstrakalvarijalna 0.3% i multipla 0.9%. Ostale lokalizacije uključuju pontocerebelarni ugao, klivus i foramen magnum.⁸⁷



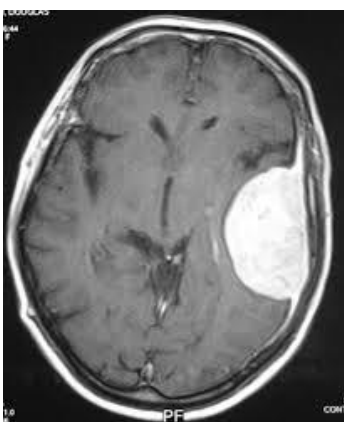
Slika 16. Najčešće lokalizacije meningeoma

Kod dece meningeomi su u 28% slučajeva intraventrikularni, a nije redak slučaj da budu i u zadnjoj lobanjskoj jami.

1. Meningeomi sa pripojem na krilima sfenoidalne kosti (sfenoidni greben)
 - Pripoj na lateralnom krilu sfenoidne kosti (pterionalno) – njih je lako odstraniti i ponašaju se kao konveksitetni meningeomi
 - Središnji pripoj (alarni tip)
Pripoj na klinoidu: imaju tendenciju da obuhvate unutrašnju karotidnu arteriju i srednju moždanu arteriju, kao i kranijalne nerve u regiji gornje orbitalne fisure i optički nerv. Mogu da komprimuju moždano stablo. Nekada ih nije moguće odstraniti u potpunosti.
2. Parasagitalni i falks meningeomi (dele se na osnovu invazije gornjeg sagitalnog sinusa)
 - Prednji - pripoj na falksu od etmoidne kosti do koronalne suture. Ima ih 33% i obično se manifestuju sa glavoboljom i promenama u mentalnom statusu
 - Srednji - pripoj na falksu od koronarne do lamboidne suture. Ima ih 50% i obično se manifestuju Jacksonovim napadima i progresivnom monoplegijom
 - Zadnji - pripoj na falksu od lamboidne suture do torkulara Herophili. Ima ih 20% i obično se manifestuju sa glavoboljom, problemima sa vidom, fokalnim epileptičnim napadima ili promenama u mentalnom statusu.
Parasagitalni meningeomi mogu se inicijalno manifestovati kontralateralnom slabošću noge.



Slika 17. Sfenoidalni menigeom prikazan na MRI endokranijuma

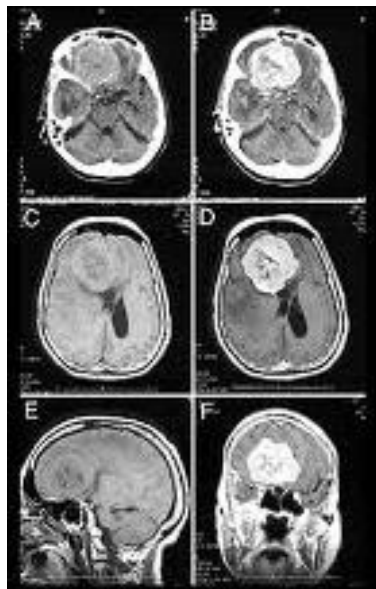


Slika 18. Temporalni menigeom prikazan na aksijalnoj MR endokranijuma



Slika 19. Parijetalni meningeom prikazan na sagitalnoj MR endokranijuma

3. Olfaktorni meningeomi (mogu biti jako veliki, a pritom asimptomatski) mogu se manifestovati :
 - Foster–Kenedijevim sindromom (anosmija, ipsilateralna optička atrofija, kontralateralni edem papile)
 - Promenama u mentalnom statusu - kompresija čeonih režnjeva (apatija, abulija)
 - Urinarnom inkontinencijom
 - Posteriorno postavljene lezije mogu komprimovati optički aparat i prouzrokovati smetnje sa vidom
 - Epilptičnim napadima



Slika 20. Olfaktorni meningeom prikazan na MR endokranijuma u sve tri ravni

4. Tuberkulum sele meningeomi

Pripoj ovih tumora je 2 cm posteriorno u odnosu na pripoj olfaktornih meningeoma. Ovi tumori su odgovorni za gubitak vida.

5. Foramen magnum meningeomi

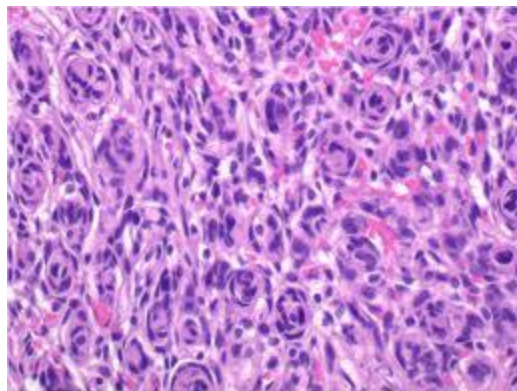
Kao i druge lezije foramena magnuma mogu uneti konfuziju zbog nespecifičnih neuroloških simptoma i znakova. Prema pripoju na foramenu magnumu razlikujemo: prednje 31%, lateralne 56% i zadnje u 13%. Većina ih je intraduralna,

ali mogu biti ekstraduralni ili kombinovani. Teški su za totalnu resekciju, a posebno što mogu anglobirati vertebralnu arteriju sa obe strane.

Histopatološka klasifikacija meningeoma

Mikroskopski posmatrano, meningeomi imaju veoma raznovrsnu histološku građu na osnovu koje ih možemo razvrstati u nekoliko histoloških podtipova bez prognostičkog značaja:

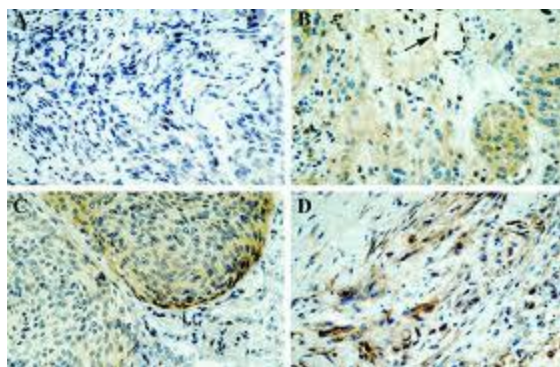
- Meningotelni
- Fibrozni (fibroblastični)
- Tranzicioni
- Angioblastični
- Atipični meningeomi
- Maligni meningeomi



Slika 21. Histološka građa meningeoma

Ekstremno retko meningeomi stvaraju metastaze van centralnog nervnog sistema. Većinu tih metastaza potiče od angioblastičnih ili malignih meningeoma, a pluća, jetra, limfni čvorovi i srce su najčešća mesta širenja.

Da bi dijagnostikovali meningeom, potrebno je načiniti CT ili MRI endokranijuma, a potom i angiografiju krvnih sudova mozga. Nekada je moguće postaviti tačnu dijagnozu već nakon rendgenskog snimka zbog čestih tumorskih kalcifikacija i/ili hiperostoza kosti ispod koje je pripoj meningeoma.



Slika 22. Prikaz histološke građe različitih tipova meningeoma

Terapija meningeoma

1. Hiruški tretman je tretman izbora kod simptomatskih meningeoma. Zbog svoje bogate vaskularizacije mora se voditi računa o nadoknadi krvi.
2. Zračna terapija se ne koristi uobičajeno i njena efiksnost u sprečavanju recidiva je diskutabilna. Kod malignih meningeoma koji se ponašaju invazivno, kod dobro vaskularizovanih lezija, kod onih koji brzo recidiviraju i kod kojih nije bilo moguće ih odstraniti u potpunosti, indikovano je primeniti zračnu terapiju.
3. Petogodišnje preživljavanje pacijenata operisanih od meningeoma je 91.3%.⁷⁸



Slika 23. Angiografski prikaz vaskularizacije meningeoma pre i posle operacije

Recidivantni meningeomi

Radikalnost hirurškog odstranjivanja meningeoma je glavni prognostički faktor u prevenciji pojave recidiva. Simpsonova skala od 5 gradusa resekcije meningeoma nam pomaže u predviđanju nastanka recidiva.

- Gradus I: makroskopski kompletna resekcija tumora sa ekscizijom duralnog pripoja i zahvaćene kosti (uključuje i resekciju sinusa ukoliko je zahvaćen)
- Gradus II: makroskopsko kompletna resekcija sa endotermičkom koagulacijom duralnog pripoja meningeoma
- Gradus III: makroskopski kompletno odstranjivanje tumora bez resekcije koagulisiranog duralnog pripoja ili ekstraduralne ekstenzije i zahvaćene kosti
- Gradus IV: Parcijalna resekcija tumora i ostavljanje dela tumora na postojećoj lokalizaciji
- Gradus V: Jednostavna dekompresija (biopsija)

Recidiv meningeoma kod totalne resekcije tumora javlja se u 11-15% slučajeva, a u 29% posle parcijalne resekcije. Petogodišnja incidenca recidiva kreće se od 37-85% posle parcijalne resekcije. Maligni meningeoma imaju očekivano mnogo veću incidencu recidiva.

Nakon primene zračne terapije pojava recidiva varira od svega 4% posle totalne resekcije meningeoma do 32% posle parcijalne resekcije tumora.

2.6. REDOKS USLOVI U TUMORIMA MOZGA

2.6.1. Izvori ROS i RNS u glioblastomu i meningeomu i impakt na eritrocite

Generalna karakteristika tumorskih ćelija je povećana produkcija H_2O_2 i NO, gde naravno različiti tipovi tumora pokazuju svoje specifičnosti. Zato je važno prvo ukazati na izvore ROS i RNS u tumorima mozga, pre svega Glioblastoma multiforme i meningeoma.

Veći broj studija je postulirao značajno povećanu aktivnost COX (ciklooksigenaze, postoje 3 izoforme) u tumorima mozga. COX su enzimi koji su uključen u transformaciju arahidonske kiseline, a čija aktivnost kao sporedni proizvod daje $O_2^{\cdot-}$. Kod glioma je

visoka ekspresija COX povezana sa lošom kliničkom prognozom.^{88,89} Ekspresija COX je značajno veća u tkivu glioma sa visokim gradusom u odnosu na gliome niskog gradusa,⁹⁰ a posebno je izražena kod Glioblastoma multiforme.⁸⁹ Jedna nedavno objavljena studija je pokazala da se radiosenzitivnost ćelija glioblastoma može povećati selektivnom inhibicijom COX-2.⁹¹ Važno je napomenuti da je ekspresija COX (konkretno COX-2) regulisana od strane transkripcionog faktora NF- κ B, za koga je pokazano da je veoma važan za proliferaciju i preživljavanje ćelija glioblastoma.⁹² Kod meningeoma su utvrđeni slični nalazi. Povećana ekspresija COX-2 predstavlja univerzalnu karakteristiku meningeoma. Specifična inhibicija ovog enzima u kultivisanim ćelijama humanog meningeoma indukuje usporavanje rasta i apoptozu.⁹³ Takođe je utvrđeno da nivo ekspresije COX-2 raste sa razvojem agresivnog fenotipa meningeoma: benigni < atipični < maligni.⁹⁴ COX se već duže vreme ispituje kao target za terapiju oba tumora mozga koji su ovde od interesa. Iz svega prethodno navedenog, nije potrebno posebno isticati da povećana COX aktivnost predstavlja osnovu za povećanu produkciju H₂O₂ u tumorskom tkivu. Visoka produkcija H₂O₂ u ćelijama Glioblastoma multiforme se jasno oslikava u vidu drastično povećanog nivoa GSSG i smanjenog GSH/GSSG odnosa u poređenju sa normalnim glijalnim ćelijama.⁹⁵ Takođe nivo oksidacije proteina u Glioblastomu multiforme i meningeomu je značajno povećana u odnosu na normalno refrentno tkivo.⁹⁶

Drugi izvor ROS u tumorskom tkivu najverovatnije predstavljaju mitohondrije. Osim ubrzanog metabolizma, karakterističnog za ćelije koje brzo proliferuju, i koje značajna količine energije koriste u pripremi za deobe, a koji podrazumeva povišenu aktivnost mitohondrija i time veću osnovnu produkciju ROS u njima, postoje i drugi specifični mehanizmi. Pre svega, maligni gliomi pokazuju drastično uvećan broj kopija mitohondrijalne DNK (mtDNK), što ukazuje na povećan broj ovih organela.⁹⁷ Utvrđeno je da ćelije glioblastoma pokazuju mutacije na mtDNK, što čini njihove mitohondrije disfunkcionalnim, jer mtDNK nosi zapis za subjedinice skoro svih kompleksa uključenih u transport elektrona u okviru oksidativne fosforilacije.⁹⁸ Greške u transportu elektrona u mitohondrijama lako mogu da povećaju produkciju ROS.³⁶ Izgleda da produkcija H₂O₂ u mitohondrijama igra esencijalnu ulogu u definisanju agresivnosti glioblastomskih ćelija, što je postulirano i u slučaju drugih tipova kancera.⁹⁹ Jedno istraživanje je u odstranjenim glioblastomima odredilo aktivnost Mn SOD i povezalo je sa srednjim vremenom

preživljavanja nakon neurohirurškog zahvata.¹⁰⁰ Uočeno je da su pacijenti sa manjom količinom Mn SOD imaju duži period preživljavanja u odnosu na pacijente čije se tumorsko tkivo karakteriše visokim sadržajem Mn SOD. Povećana ekspresija Mn SOD ukazuje na povećanu produkciju ROS u mitohondrijama. Inače glioblastomi sa visokim sadržajem Mn SOD se takođe pokazivali neaktivnost tumor supresora p53.¹⁰⁰ Važno je reći da se zbog disfunkcionalnosti mitohondrija, ćelije glioblastoma u velikoj meri oslanjaju na glikolizu za produkciju ATP-a.⁹⁸ Kod meningeoma je uočena značajno povećana mitohondrijalna aktivnost u odnosu na normalno tkivo, ali je ova aktivnost i prateći nivo ATP-a niži u odnosu na glioblastom.¹⁰¹ Produkcija ROS u mitohondrijama može biti promovisana i kroz još jedan dosta zanimljiv mehanizam. Naime, ćelije glioblastoma pokazuju aktivnost Poli (ADP-Ribozo) Polimeraze 1 (PARP-1), koja je odsutna u normalnom tkivu CNS. Rezultati jedne studije su bili toliko uverljivi, da je postulirano da imunohistohemijsko bojenje na PARP1 može da se koristi za prepoznavanje glioblastomskih ćelija.¹⁰² PARP1 je enzim koji popravljaja oštećenja na DNK i neophodan je za preživljavanje tumorskih ćelija, i kao takav predstavlja potencijalni terapijski target.¹⁰³ Međutim ono što je ovde važno, a vezano je za PARP1, je činjenica da ovaj enzim kao svoj supstrat koristi Nikotinamid Adenin Dinukleotid (NADH). Velika potrošnja NADH, usled nestabilosti tumorske DNK, dovodi do smanjenja odnosa između redukovane i oksidovane forme – NADH/NAD⁺, a pad u ovom odnosu je jedan od najjačih stimulusa za produkciju ROS u mitohondrijama.³⁶

Jedan od faktora na kojima je zasnovan biološki "uspeh" glioma je i supresovanje imunog odgovora, koji bi trebao da se bori protiv transformisanih ćelija.^{104,105} Na primer, u histopatološkim preparatima tkiva glioma se može uočiti veoma mali broj T limfocita. Jedan od mehanizama koji ćelije tumora mogu koristiti u imunosupresiji predstavlja i emisija H₂O₂. Poznato je da T limfociti poseduju tiolne "prekidače" na svojoj površini, čija oksidacija dovodi do inhibicije aktivnosti T limfocita, a u krajnjoj liniji i do apoptoze.¹⁰⁶ Dakle za obavljanje svoje funkcije T limfociti zahtevaju redukovanu sredinu, protiv čega se tumorske ćelije "bore".

Povećana ekspresija NOS i produkcija NO u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo CNS je pokazana u nizu studija, i čak je implicirana korelacija između NOS ekspresije i stepena maligniteta.^{107,108} Pokazano je da je u gliomima povećana ekspresija nNOS, i da

je ovo povećanje posebno izraženo u tumorima visokog gradusa. U nekim slučajevima bila je prisutna i ekspresija iNOS. Za meningeome je karakteristična povećana ekspresija eNOS u endotelijalnim ćelijama tumorske vaskulature.¹⁰⁹ Jedno istraživanje je dalo interesantan nalaz gde je kod obolelih od glioblastoma došlo do značajnog porasta CAT aktivnosti samo 7 dana nakon operacije. CAT aktivnost je postala veća u odnosu na kontrolne vrednosti.¹¹⁰ Ovaj period je previše kratak da bi došlo da promene u populaciji eritrocita kroz eritropoezu, i jasno ukazuje na prisustvo oksidativnog pritiska pre hirurškog zahvata (ima više CAT), kao i na deinhibiciju nakon uklanjanja tumora (ima manje NO, koji je CAT inhibitor⁵⁸). Konačno, uslovi u kojima je povećana produkcija $O_2^{\cdot-}$ s jedne strane, i NO s druge, pogoduju nastanku njihovog proizvoda – $ONOO^{\cdot-}$. U vezi sa ovim, pokazano je da u tkivu glioblastoma postoji povišen nivo nitrovanog tirozina, koji je derivat $ONOO^{\cdot-}$.¹¹¹ Povećan nivo $ONOO^{\cdot-}$ dereguliše transkripcionu aktivnost p53 u ćelijama glioma.¹¹² Ne postoje podaci o produkciji $ONOO^{\cdot-}$ u menigeomu.

Pro-oksidativni uslovi u tumorskom tkivu se mogu reflektovati na cirkulaciju, odnosno na AOS u krvi, čiji su enzimi u najvećoj meri smešteni u eritrocitima.^{3,113,114} Osim emisije ROS i RNS, i to pre svega onih stabilnijih vrsta i onih koje mogu da prođu ćelijsku membranu (H_2O_2 i NO), tumorska masa može da utiče na redoks stanje u krvi i na druge načine.^{115,116} Na primer, u i oko tumorske mase može doći do ishemije/reperfuzije, što je veoma dobro poznat mehanizam za indukciju ksantin oksidazne produkcije $O_2^{\cdot-}$.¹¹⁷ Iz tumorskog i okolnog oštećenog tkiva mogu u cirkulaciju da "cure" redoks aktivni metali (npr. gvožđe) i oksidovani lipidi, koji takođe mogu uticati na redoks milje u krvi.¹¹⁵

Veoma mali broj studija se bavio efektima tumora mozga na AOS eritrocita. Rao i saradnici su pokazali značajno smanjenu SOD i GR aktivnost u eritrocitima obolelih od menigeoma (n = 28) u odnosu na kontrole (n = 48).¹¹⁵ CAT je bila niža u menigeomu, ali ne statistički signifikantno, dok GSH-Px nije pokazala nikakvu razliku u odnosu na kontrolne vrednosti. GR aktivnost je bila niža u eritrocitima obolelih od gliomima u odnosu na meningeome. Nisu uočene značajne razlike između malignih i benignih tumora mozga ni za jedan AOS enzim u eritrocitima. Ova studija se nije posebno bavila glioblastomom, i bilo je uključeno samo 5 pacijenata sa ovim tipom tumora.¹¹⁵ Woźniak i kolege su našli povećan nivo proizvoda lipidne peroksidacije u serumu, i povećanu SOD aktivnost u eritrocitima obolelih od glioblastoma (n = 9) u odnosu na zdrave kontrole (n = 20).

Aktivnost CAT se nije razlikovala.¹¹⁰ Aggarwal *et al.* su utvrdili da je SOD i GR aktivnost u eritrocitima manja kod obolelih od tumora mozga u odnosu na kontrole, međutim aktivnosti se nisu razlikovale za maligne i benigne tumore.¹¹⁸ Jedna novija studija na malom broju pacijenata obolelih od glioma (n = 21) i meningeoma (n = 14) je pokazala da u je u serumu aktivnost CAT i GSH-Px značajno veća u odnosu na serume zdravih kontrola.¹¹⁹ Međutim problem sa ovom studijom leži u tome što se aktivnost ovih enzima mora određivati u eritrocitima, a ne u serumu, koji ima značajno (nekoliko redova veličine) manje AOS enzima u odnosu na eritrocite, a nivo CAT je tako nizak, da se dovodi u pitanje da li ona i postoji u serumu pod fiziološkim uslovima.¹²⁰ Izgleda da je ono što su autori našli u stvari povećano curenje ovih enzima u serum zbog oštećenosti tkiva (u okolini tumora ili same tumorske mase) ili eritrocita (usled izloženosti oksidativnom stresu tokom prolaska kroz tumorsku masu). Konačno, zanimljivo istraživanje izvedeno na krvnim sudovima izolovanim iz tumorske mase meningeoma i glioma je pokazalo značajno nižu SOD aktivnost za meningeom, međutim ovo nije stavljeno u kontekst oksidativnog pritiska na endotelijum, već je objašnjeno endotelijalnom proliferacijom i strukturnim promenama koje su bile više izražene kod glioma.¹²¹

2.6.2. AOS u glioblastomu i meningeomu

U literaturi je dostupno malo podataka o AOS sistemima u glioblastomu i meningeomu. Postoje značajne razlike među podacima dobijenim u različitim studijama, što se može objasniti generalno malim brojem uzoraka, kao i različitim pristupima u prikupljanju istih (npr. definisanje grupa, različiti gradusi, itd).

Pu i kolege su našle da je SOD aktivnost u tkivu menigeoma (broj pacijenata - n = 26) i astrocitoma (n = 18) manja u odnosu na normalno moždano tkivo. SOD aktivnost u astrocitomu visokog gradusa (n = 10) je bila manja u odnosu na meningeom.¹²² CAT aktivnost je bila nekoliko puta veća u tumorskom tkivu (i u meningeomu i u astrocitomu) u odnosu na normalno tkivo. Meningeom je pokazao značajno veću GSH-Px aktivnost i u odnosu na normalno tkivo i u odnosu na astrocitom, u kome se GSH-Px aktivnost nije razlikovala u odnosu na kontrolne vrednosti.¹²² Ovakav profil za Glioblastom multiforme (CAT povećana, GH-Px neizmenjena u odnosu na zdravo tkivo) je uočen u radu Del

Maestro *et al.*,¹²³ dok su za ovaj isti tip tumora Atukeren i kolege uočili manju SOD aktivnost u odnosu na kontrolno moždano tkivo.¹²⁴ Zengin i saradnici su poredili AOS sisteme astrocitoma (n = 16), meningeoma (n = 14) i peritumoralnog tkiva (kontrole). Za oba tipa tumora uočena je smanjena SOD i GR aktivnostu odnosu na kontrolne vrednosti. Koncentracija GSH je bio manja, a nivo lipidne peroksidacije veći u tumorskom tkivu. Lipidna peroksidacija je bila više izražena kod astrocitoma u odnosu na meningeom.¹²⁵

Tanriverdi *et al.* su uporedili GSH sistem u Glioblastomu multiforme (n = 26), menigeomu (n = 22) i normalnom moždanom tkiva. Aktivnost GSH-Px i GR je bila oko 2 puta niža u tumorima u odnosu na kontrole. Glioblastom je u odnosu na meningeom pokazao nešto niže vrednosti za aktivnost oba enzima.⁹⁶ Čelije glioblastoma pokazuju GST aktivnost koja je slična normalnoj,^{126,127} dok je nivo GSH manji u glioblastomu u odnosu na normalno tkivo.^{95,128} Uz pojačanu oksidaciju, potencijalni uzrok smanjenja nivoa GSH u glioblastomu je uključenje cisteina, koji je jedana od tri amino kiseline koje su neophodne za sintezu GSH, u metabolički put specifičan za ćelije glioblastoma. Naime, ćelije glioblastoma pokazuju pojačanu ekspresiju enzima cistein dioksigenaze 1, koja katalizuje reakciju cisteina i molekuskog kiseonika pri čemu nastaje cisteinska sulfinična kiselina (Cys-SO₂H). Ovaj metabolit je uključen u nastanak i rast tumorskih ćelija agresivnog profila.¹²⁹ Ovo ipak ne znači da je za glioblastom GSH sistem nevažan. Jedna studija je na ćelijama Glioblastoma multiforme pokazala da inhibicija GSH-Px dovodi do ćelijske smrti i povećane senzitivnosti na oksidativni stres.⁹⁵ U odnosu na glioblastom, AOS meningeoma se mnogo više oslanja na GSH sistem, na šta ukazuje činjenica da je GST aktivnost u tkivu meningeoma 2–3 puta veća u odnosu na fiziološko moždano tkivo,¹²⁶ dok je GSH-Px aktivnost veća u meningeomu u odnosu na gliome.¹²² Zanimljivo je napomenuti da ćelije glioblastoma imaju sposobnost da veoma efikasno odgovore na egzogeni oksidativni pritisak, tako što povećaju nivo ekspresije AOS enzima i do nekoliko puta u odnosu na referentne netransformisane ćelije, kao odgovor na ekspoziciju radijaciji.¹³⁰

III CILJ ISTRAŽIVANJA

Polazeći od teorijske pretpostavke ovo istraživanje ima za cilj da utvrdi:

- Da se utvrde promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i plazmi:
 - a. pacijenata sa glioblastomom u odnosu na zdrave ispitanike
 - b. pacijenata sa meningeomom u odnosu na zdrave ispitanike
- Da se utvrde promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i plazmi pacijenata sa glioblastomom u odnosu na pacijente sa meningeomom.
- Da se utvrde promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u tkivu glioblastoma u odnosu na tkivo meningeoma.
- Da se uporedi aktivnost antioksidativnog enzimskog zaštitnog sistema u krvi i tkivu pacijenata obolelih od glioblastoma i meningeoma.

IV MATERIJAL I METODE

Ovo prospektivno istraživanje obavljeno je u period od 2004. do 2009. godine na Institutu za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije i Institutu za kliničku farmakologiju, farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu

4.1. Ispitivane grupe

U ovom istraživanju analizirani su uzorci periferne venske krvi i tumorskog tkiva glioblastoma ili meningeoma 134 ispitanika oba pola, starosti od 18 do 70 godina. Na osnovu precizno postavljene dijagnoze (CT ili MRI i histopatološke analize tkiva) ispitanici su bili podeljeni u dve istraživane grupe operisanih pacijenata:

I grupa – oboleli od malignog tumora mozga – glioblastoma (n = 67)

II grupa – oboleli od benignog tumora mozga – meningeoma (n = 67)

Kontrolnu grupu je činilo 30 zdravih ispitanika, adekvatnog uzrasta i pola, nepušača koji u poslednjih 6 meseci nisu uzimali vitamine, dodatke u ishrani ili lekove sa antioksidantnim dejstvom.

4.2. Izbor učesnika ispitivanja

Odabir pacijenata izvršen je na Institutu za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije na osnovu:

Kriterijuma za uključivanje u ispitivanje:

- postavljene dijagnoze (CT ili MRI i histopatološke analize tkiva)

Kriterijuma za neuključivanje u ispitivanje:

- hronična oboljenja koja mogu poremetiti redoks ravnotežu,
- virusna infekcija,

- terapija lekovima sa antioksidantnim dejstvom
- kontinuirana suplementacija vitaminima
- pušenje.

Tip operativnog lečenja Glioblastoma multiforme I meningeoma

- makroskopski totalna resekcija tumora
- subtotalna resekcija tumora
- biopsija tumora

4.3. Neurohirurške procedure

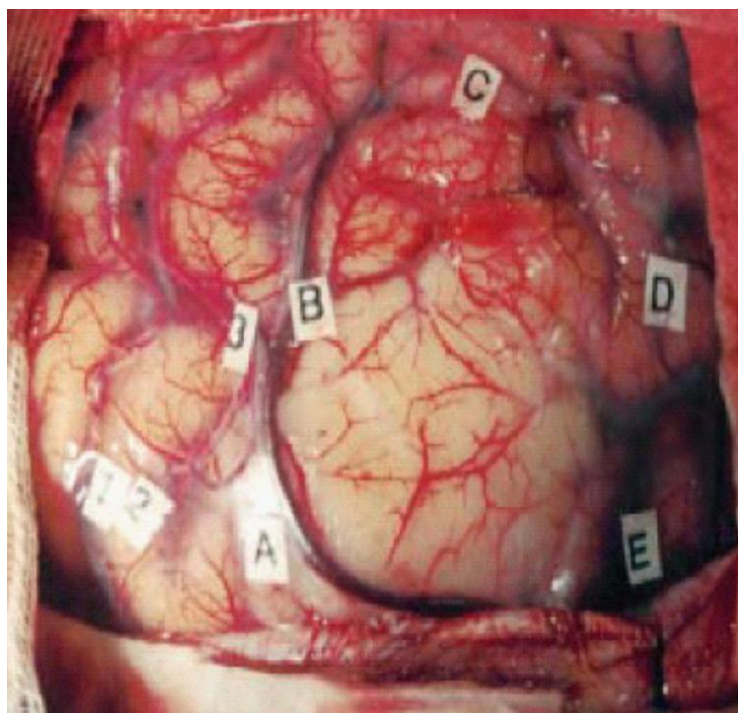
Kod svih pacijenata sa dijagnostikovanim Glioblastomom multiforme lociranih u predelu centralnog sulkusa, koji su predhodno snimljeni na nuklearnoj magnetnoj rezonanaci (MRI) načinjena je operativna resekcija tumora. Pored potvrde postojanja tumora u i oko motorne zone ispred centralnog sulkusa, registrovano je i postojanje atrofičnih promena moždanog parenhima i ožiljne promene posle cerebrovaskularnog insulta. U cilju postizanja jasne preoperativne orijentacije, a naročito u slučajevima prisutnog infiltrativnog rasta tumora, bez postojanja vidljive granice tumora prema okolnom mozgu, izvršili smo merenje rastojanja centralnog sulkusa (najduži sulkus na visokim parijetalnim presecima) u odnosu na koronarnu suturu na snimcima MRI, na osnovu kojih je postavljena dijagnoza i planirana operacija.

Svi pacijenti su operisani u opštoj anesteziji, korišćna je opšta intravenska anestezija, bez dodavanja isparljivih anestetika. Za indukciju anestezije korišćeni su u bolusu propofol (1-2 mg/kg) i fentanil (5-10 µg/kg). Anestezija je održavana kontinuiranom administracijom propofola (75-125µg/kg). Intraoperativna analgezija je postignuta remifentanilom (0,25 µg/kg/min). Neuromuskularni blokatori su korišćeni jedino pri intubaciji (rocuronium 0.3-0.4 mg/kg ili mivacurium 0.2mg/kg), ali ne tokom same operacije (neuromuskularna blokada je bila efektivna samo 15-25 minuta tokom intubacije).

Planiranje kraniotomije se zasnivalno na topografskim orijentirima lobanje i rezultatima neuroradiološke dijagnostike, radi identifikacije koronarne suture, i

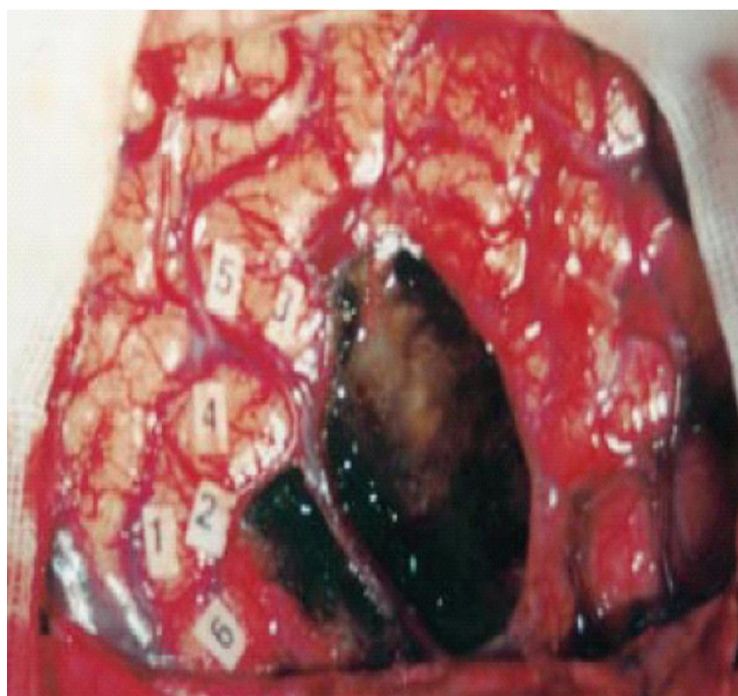
preoperativnoj proceni udaljenosti centralnog sulkusa od nje na osnovu snimka NMR. Profilaktički je preoperativno svakom pacijentu ordiniran antibiotik (Nilacef 2 g na 12h), Dexametason u pojedinačnoj dozi od 8mg iv na 6h i antikonvulzivna terapija Mazepin 3x200 mg.

Tokom svih operacija je sprovedena elektrokortikostimulacija prikazane površine mozga, radi anatomskog lociranja M1 segmenta motornog korteksa. Za elektrostimulaciju korteksa su korišćene 3-kontakt strip elektrode (AD-Tech® strip elektrode, AD Tecnic, WI, SAD). Elektrode su postavljane na moždani korteks upravno, što podrazumeva ugao od približno 65° između elektrode i površine mozga. U toku procedure elektrokortikostimulacije (ES) menjane su vrednosti jačine struje, frekvence i trajanja pulsnog talasa, do dobijanja motornog odgovora. Po identifikaciji motornog polja, merena je udaljenost od koronarne suture i vršeno je upoređivanje sa vrednostima dobijenim na osnovu preoperativnog merenja rastojanja centralnog sulkusa od koronarne suture na MRI snimku.



Slika 24. Identifikacija cerebralnog motornog korteksa direktnom elektrostimulacijom

Radikalnost operativne resekcije tumorskog tkiva je rangiran u tri stepena: biopsija, subtotalna i radikalna. Tokom operacije uzeti materijal tumora je poslat na histološku analizu. Kod svih pacijenata je sprovedena postoperativni snimak mozga MRI ili CT u periodu od mesec dana do 4 meseca, a nalaz je kvantifikovan kao radikalna operacija bez prisutnog resta tumora ili prisutan rest tumora.

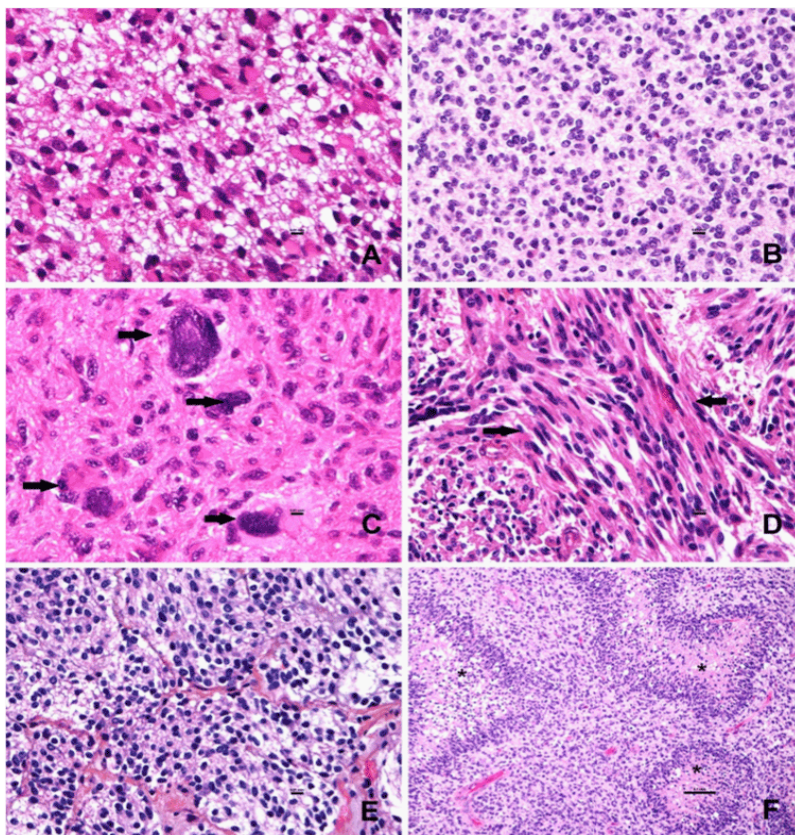


Slika 25. Radikalna operacija sa intaktnim cerebralnim korteksom

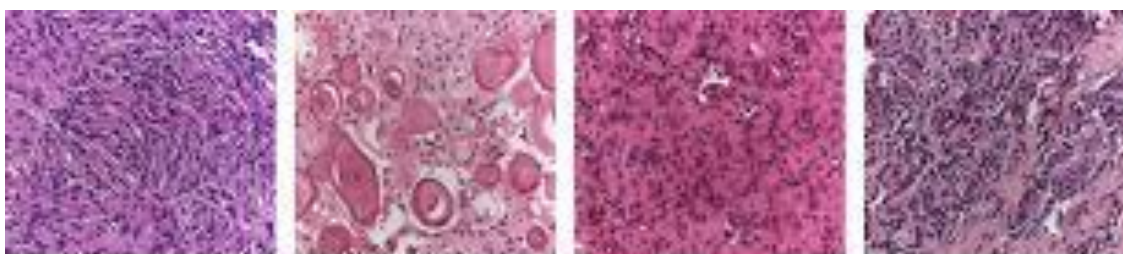
4.4. Histopatologija

Histološka klasifikacija svih ispitivanih tumora u ovoj studiji se zasniva na Klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2002. godine.¹³¹ Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, WHO gradus I meningeomi se razlikuju prema devet histoloških podtipova benignih meningeoma uključujući tranzicionalni meningeom. Skoro svi podtipovi gradusa I pokazuju prisustvo vimantina, epitelijskog membranskog antigena, dezmozoplakina. Jedina široko zastupljena (ali ne univerzalna) mikroskopska karakteristika je formiranje kružnih grupacija ćelija, koje se zatim kalcifikuju i formiraju zrnasta tela ("psammoma bodies"). Vrednost ove klasifikacije benignih meningeoma sa devet

histoloških podtipova je kontraverzna jer ne postoji signifikantna prognostička razlika u odnosu na kliničko ponašanje. Tumori klasifikovani kao Glioblastom (gradus IV) po ovoj istoj klasifikaciji u ovoj studiji pokazuju polja nekroze sa prisutnim okolnim ćelijskim pseudopalisadima (pseudopalisading necrosis) i mikrovaskularnom hiperplazijom, koje predstavljaju karakteristike po kojima se Glioblastoma multiforme razlikuje od astrocitoma nižih gradusa.



Slika 26. Histološka građa glioblastoma multiforme



Fibroblastični

Pseudomatozni

Meningeotelijalni

Tranzicionalni

Slika 27. Prikaz histološke građe različitih tipova meningeoma

4.5. Biohemijske procedure

4.5.1. Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima iz eritocita

Biohemijska procedura uzorkovanja krvi

Od svih ispitanika uzeto je po 5 mL periferne venske krvi heparinizovanim špricem (0.2 ml heparina). Eritrociti i plazma su razdvojeni centrifugiranjem (10 min na 5000 rpm, 4°C) Izdvojeni eritrociti su ispirani tri puta fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje (10 min. na 5000 rpm, 4°C), i tako pripremljeni uzorci su zaleđeni na -82°C. Pred početak rada uzorci su odmrznuti i u njima je određivana aktivnost enzima SOD, CAT, GSH-Px, i GR.

Biohemijske analize rađene su na: Institutu za kliničku farmakologiju, farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na aparatu spektrofotometar Helios Beta–UNICAM, Velika Britanija.

Određivanje aktivnosti enzima iz eritrocita

Alikvoti tri puta ispranih eritrocita su lizirani. U delu lizata određena je količina hemoglobina (Hb) metodom Drabkin & Austin,¹³² a lizati su korišćeni za određivanje aktivnosti enzima antioksidacione zaštite (CAT, GSH-Px, GR). Za određivanje aktivnosti Cu/Zn SOD bilo je neophodno prvo ukloniti hemoglobin metodom Tsuchihashi-ja.¹³³

Adrenalinska metoda za određivanje aktivnosti SOD

Metoda koju smo koristili u našem radu pripada grupi metoda "negativnog" tipa, jer se prati smanjenje brzine autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od O₂⁻. Ovu metodu su postavili Misra i Fridovich.¹³⁴ Prisutna SOD uklanja O₂⁻ i pri tome inhibira reakciju autooksidacije adrenalina. Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski preko promene apsorbance na 480 nm. Porast apsorbance na 480 nm potiče od akumulacije adrenohroma.

Brzina autooksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dela porasta apsorbancije. Procenat inhibicije koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna), a brzina

autooksidacije u prisustvu SOD, odnosno proteina u citosolu predstavlja deo referentne vrednosti.

RASTVORI:

1. Adrenalin, 3×10^{-4} M u 0.1 M HCl .

Rastvor se priprema neposredno pre merenja.

2. Karbonatni pufer, pH 10.2 , sastava:

Na₂CO₃ 0.05 M

EDTA 1×10^{-4} M.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

U 3.2 mL reakcione smeše koju čine: 3 mL karbonatnog pufera, pH 10.2 i 0.1 mL rastvora adrenalina, dodavano je 0.01 mL ranije pripremljenog supernatanta. Autooksidacija adrenalina praćena je u toku četiri minuta na 480 nm. Reakcija je stabilna u temperaturnom opsegu od 26-30°C. Uporedo je rađena i kontrolna reakcija. Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti.

Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po g Hb (jedinica (U)/g Hb). Jedinica SOD aktivnosti definisana je kao zapremina, odnosno količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorpcije.

Izračunavanje je urađeno po sledećoj jednačini:

$$SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times Hb \times \Delta K}$$

- ΔK - promena apsorpcije kontrolne reakcije u minuti
- ΔA - promena apsorpcije reakcije sa uzorkom u minuti
- V - zapremina uzorka koji se sipa u reakcionu smešu (mL)
- Hb - količina hemoglobina (g /100 mL lizata)
- R - razblaženje.

Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT u lizatu određivana je po metodi Beutler-a.¹³⁵ Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje H₂O₂ u prisustvu CAT na 230 nm. Na toj talasnoj dužini H₂O₂ apsorbira svetlost.

RASTVORI:

1. Pufer, pH 8.0 , sastava:
Tris HCl 1 M
EDTA 5 mM.
2. H₂O₂..... 10 mM

Tačna koncentracija H₂O₂ određivana je na sledeći način: u odnosu na apsorpciju razblaženog rastvora pufera (1:10), kao nula, očitavana je apsorpcija rastvora sastavljenog od 0.9 mL razblaženog pufera i 0.1 mL razblaženog 30% rastvora H₂O₂ (1:100). Koncentracija H₂O₂ izračunavana je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta, koji je za H₂O₂ na 230 nm 0.071, po formuli:

$$C = \frac{\Delta A}{0,071}$$

Dobijena koncentracija je potom razblaživana do 10 mM.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

U kvarcnu kivetu u kojoj se nalazi 50 µL pufera dodavano je između 5 i 50 µL uzorka (zavisno od aktivnosti katalaze). Reakcija počinje dodatkom 1 mL 10 mM rastvora H₂O₂ (10 mM). Pad apsorpcije praćen je na 230 nm u toku 3 minuta. Aktivnost je izražavana u jed/mg Hb, a jedinica je definisana kao količina redukovano H₂O₂, izražena u mM, u minuti. Izračunavanje je rađeno prema sledećoj jednačini:

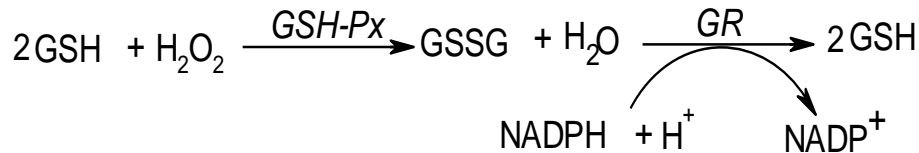
$$CAT = \frac{\Delta A x R x 100}{0,071 x Hb x V}$$

- ΔA - promena apsorpcije u minuti,
- R - razblaženje,
- V - zapremina uzorka (mL) i

- Hb - količina Hb (g/100 ml lizata).

Određivanje aktivnosti GSH-Px

Aktivnost GSH-Px određivana je po modifikovanoj metodi Paglia i Valentine.¹³⁶ Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Ovom metodom se prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz GR na 340 nm. Ova indirektna metoda koja meri promenu proizvoda reakcije pokazala se veoma reproduktivnom u poređenju sa drugim metodama određivanja GSH-Px aktivnosti.

RASTVORI:

1. Fosfatni pufer pH 7.0.....0.5 M
2. NADPH u 1% NaHCO₃.....0.2 mM
3. GSH.....10⁻³ M
4. t-butil hidroperoksid.....0.03 M
5. GR (TYPE II spec. akt. 105 IU/mg proteina).

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

U staklenu kivetu dodaje se 1.6 mL vode, 0.3 mL pufera, 0.6 mL rastvora NADPH, 0.3 mL rastvora GSH, 0.1 mL t-butil hidroperoksida i oko 0.05 mL uzorka, preračunati tako da bude 5% (m/m) Hb. Reakcija otpočinje dodatkom GR u količini od 105 IU/mg proteina. Reakcija se odvija na temperaturi od 37°C. Apsorpcija se očitava na 340nm od prvog do četvrtog minuta. Uporedo se radi i kontrolna reakcija. U kiveti kontrolne reakcije nalaze se svi reagensi osim uzorka.

Aktivnost GSH-Px se izračunava na sledeći način:

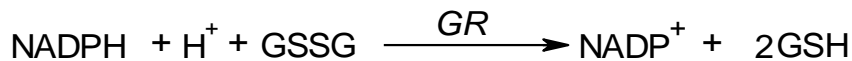
$$GSH - Px = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 100}{6.22 \times 0.833}$$

- ΔA -promena apsorpcije /min za uzorak *i*
- ΔB -promena apsorpcije/min za kontrolnu reakciju.

Rezultati se izražavaju u $\mu\text{mol NADPH/min/g Hb}$.

Određivanje aktivnosti GR

Određivanje aktivnosti GR rađeno je po metodi Glatzle i saradnika.¹³⁷ GR katalizuje redukciju oksidovanog glutationa sa NADPH:



Oksidacija NADPH se prati merenjem promene apsorpcije na 340 nm.

RASTVORI:

1. Fosfatni pufer pH 7,4.....0.5 M
2. EDTA.....0.5 M
3. GSSG.....2 mM
4. NADPH.....0.1 mM.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

U spektrofotometrijsku kivetu sipa se 0,6 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml GSSG, 0,1 ml uzorka i vode do 3 ml (2ml). Reakcija otpočinje dodatkom 0,1 ml NADPH. Optimalna temperatura reakcije je 37°C. Prati se promena apsorpcije u toku 3 minuta, a aktivnost izračunava pomoću jednačine:

$$GR = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 10^3 \times 3}{6.22 \times V \times Hb}$$

- ΔA -promena apsorpcije/minuti u uzorku,
- ΔB -promena apsorpcije/minuti u kontrolnom uzorku,
- V -zapremina uzorka i
- Hb-količina hemoglobina (g/100 ml lizata).

Aktivnost se izražava u $\mu\text{mol NADPH /min /g Hb}$.

4.5.2. Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima iz tkiva glioblastoma i meningeoma

Od svih obolelih ispitanika tokom hirušskog zahvata izvađena tumorska masa glioblastoma ili meningeoma biće korišćena za histopatološki nalaz, a deo mase od 1g za određivanje aktivnosti enzima SOD, CAT, GPX, GR. Tumorsko tkivo glioblastoma ili meningeoma do eksperimentalne procedure čuvaće se na -82°C .

Priprema uzoraka i kompletna biohemijska analiza biće urađena na Institutu za kliničku farmakologiju, farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na aparatima: spektrofotometar Helios Beta–UNICAM, Velika Britanija; homogenizator T18 Basic-Ultra Turrax, Brazil IKA; sonifikator UW2070, Bandelin, Nemačka; ultracentrifuga UP65, Iskra HKG.

Priprema uzoraka tkiva

Uzeto tkivo mase od 1g se macerira i homogenizuje u saharoznom puferu pH 7.4 (0.25 M saharoza, 0.05 M TRIS HCl i 1mM EDTA) blinder homogenizerom, 3 puta po 10 sekundi, po metodi Rossi-ja i saradnika,¹³⁸ i de Waziers-a i Albrecht-a.¹³⁹ Uzorci su potom sonifikovani 3 puta po 15 sekundi pri jačini od 10 kHz.¹⁴⁰

Za određivanje količine glutationa iz sonifikata je izvršeno taloženje proteina sulfosalicilnom kiselinom (0.5 ml sonifikata i 0.25 ml 10% sulfosalicilne kiseline) uz centrifugiranje 10 minuta na 5000 rpm. Preostali sonifikat je centrifugiran u ultracentrifugi 90 minuta na 37500 rpm i 4°C , a zatim je izdvojen supernatant koji je dalje zamrznut na -82°C do određivanja količine proteina i enzimske aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px, i GR-a.

Određivanje koncentracije proteina u tkivima

Koncentracija proteina u tkivima pacova određivana je po metodi Lowry-ja i saradnika.¹⁴¹ Vrednosti se očitavaju sa standardne krive poznatih koncentracija rastvora goveđeg albumina i izražavaju se u mg proteina po g tkiva.

Određivanje aktivnosti SOD

Metoda koju smo koristili u našem radu pripada grupi metoda "negativnog" tipa, jer se prati smanjenje brzine autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od O_2^- . Prisutna SOD uklanja O_2^- i pri tome inhibira reakciju autooksidacije adrenalina.¹³⁴ Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski preko promene apsorbance na 480 nm. Porast apsorbance na 480 nm potiče od akumulacije adrenohroma.

Brzina autooksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dela porasta apsorbancije. Procenat inhibicije koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna), a brzina autooksidacije u prisustvu SOD, odnosno proteina u citosolu predstavlja deo referentne vrednosti.

RASTVORI:

1. Adrenalin, 3×10^{-4} M u 0.1 M HCl .

Rastvor se priprema neposredno pre merenja.

2. Karbonatni pufer, pH 10.2 , sastava:

Na_2CO_3 0.05 M

EDTA 1×10^{-4} M.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

U 3.2 mL reakcione smeše koju čine: 3 mL karbonatnog pufera, pH 10.2 i 0.1 mL rastvora adrenalina, dodavano je 0.01 mL ranije pripremljenog supernatanta. Autooksidacija adrenalina praćena je u toku četiri minuta na 480 nm. Reakcija je stabilna u temperaturnom opsegu od 26-30°C. Uporedo je rađena i kontrolna reakcija. Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti.

Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina. Jedinica SOD aktivnosti definisana je kao zapremina, odnosno količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorpcije.

Izračunavanje je urađeno po sledećoj jednačini:

$$SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \cdot xR}{V \cdot Law \cdot \Delta K}$$

- ΔK - promena apsorpcije kontrolne reakcije u minuti
- ΔA - promena apsorpcije reakcije sa uzorkom u minuti
- V - zapremina uzorka koji se sipa u reakcionu smešu (ml)
- Law - količina proteina (mg / ml lizata)
- R - razblaženje.

Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost katalaze u sonifikatu određivana je po metodi Beutler-a.¹³⁵ Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik-peroksida u prisustvu katalaze na 230 nm. Na toj talasnoj dužini vodonik-peroksid apsorbuje svetlost.

RASTVORI:

1. Pufer, pH 8.0, sastava:

Tris HCl 1 M

EDTA 5 mM.

2. H₂O₂..... 10 mM.

Tačna koncentracija vodonik-peroksida određivana je na sledeći način: u odnosu na apsorpciju razblaženog rastvora pufera (1:10), kao nula, očitavana je apsorpcija rastvora sastavljenog od 0.9 mL razblaženog pufera i 0.1 mL razblaženog 30% rastvora H₂O₂ (1:100). Koncentracija H₂O₂ izračunavana je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta, koji je za H₂O₂ na 230 nm 0.071, po formuli:

$$C = \frac{\Delta A}{0,071}$$

Dobijena koncentracija je potom razblaživana do 10 mM.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

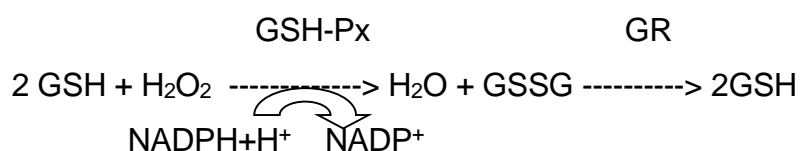
U kvarcnu kivetu u kojoj se nalazi 50 μL pufera dodavano je između 5 i 50 μL uzorka (zavisno od aktivnosti katalaze). Reakcija počinje dodatkom 1mL 10 mM rastvora vodonik-peroksida. Pad apsorbance praćen je na 230 nm u toku 3 minuta. Aktivnost je izražavana u jed/mg proteina odn. jed./ g sveže mase, a jedinica je definisana kao količina redukovano H_2O_2 , izražena u μM , u minuti. Izračunavanje je vršeno prema sledećoj jednačini:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \times R}{0,071 \times \text{Low} \times V}$$

- * ΔA - promena absorbance u minuti
- * R - razblaženje
- * V - zapremina uzorka (ml)
- * Low - količina proteina (mg/ ml sonifikata).

Određivanje aktivnosti GSH-Px

Aktivnost glutation-peroksidaze određivana je po metodi Tamure i saradnika.¹⁴² Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Ovom metodom se prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz glutation reduktazu na 340nm. Ova indirektna metoda koja meri promenu proizvoda reakcije pokazala se veoma reproduktivnom u poređenju sa drugim metodama određivanja GSH-Px aktivnosti.

RASTVORI:

1. Fosfatni pufer pH 7.0.....0.5 M
2. NADPH u 1% NaHCO₃.....0.2 mM
3. GSH.....10⁻³ M
4. NaN₃1 mM
5. EDTA 1mM
6. t-butilhidroperoksid.....0,03 M
7. GR (TYPE II spec. akt. 105 IU/mg proteina).

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

U staklenu kivetu spektrofotometra dodaje se 1.5 mL vode, 0.3 mL rastvora GSH, 0.6 mL rastvora NADPH, 0.1 mL NaN₃, 0.1 mL EDTA, 0.3 mL fosfatnog pufera, 0.1 mL t-butilhidroperoksida i oko 0.05 mL uzorka. Reakcija otpočinje dodatkom 105 IU/mg proteina GR. Reakcija se odvija na temperaturi 37°C. Absorpcija se očitava na 340nm, a reakcija traje 150 sekundi. Upravo se radi i kontrolna reakcija. U kiveti kontrolne reakcije nalaze se svi reagensi osim uzorka. Aktivnost GSH-Px se izračunava na sledeći način:

$$\text{GSH-Px} = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^3}{6,22 \times V \times \text{Low}}$$

* ΔA -promena apsorbance/min za uzorak

* ΔB -promena apsorbance/min za kontrolnu reakciju.

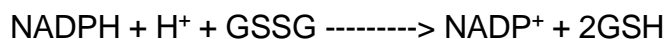
* V - zapremina uzorka u ml

* Low – koncentracija proteina u mg/ml

Rezultati su izraženi u nmol NADPH/min/mg proteina, odn. nmol NADPH/min/g vlažne mase.

Određivanje aktivnosti GR

Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze rađeno je po metodi Glatzle *et al.*¹³⁷ Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog u redukovanu glutation.



Oksidacija NADPH se prati merenjem promene apsorbance na 340nm.

RASTVORI:

1. Fosfatni pufer pH 7.4.....0,5 M
2. EDTA.....0.5 mM
3. GSSG.....2 mM
4. NADPH.....0.1 mM.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK:

U spektrofotometrijsku kivetu sipa se 0,6 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml GSSG, 0,1 ml uzorka i vode do 3 ml (2ml). Reakcija otpočinje dodatkom 0,1 ml NADPH. Optimalna temperatura reakcije je 37°C. Prati se promena apsorbance u toku 3 minuta, a aktivnost izračunava pomoću jednačine:

$$\text{GR} = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^3}{6,22 \times V \times \text{Low}}$$

- * ΔA -promena absorbance/minuti u uzorku
- * ΔB -promena absorbance/minuti u kontrolnom uzorku
- * V- zapremina uzorka (ml)
- * Low- količina proteina (mg/ ml sonifikata)

Aktivnost je izražena u nmol NADPH/min/mg proteina,odn. nmol NADPH/min/g vlažne mase.

Određivanje GSH

GSH je u plazmi i u supernatantima ekstrakcije tkiva određivan metodom Akerboom & Sies.¹⁴³ Biološki uzorak se prvo oslobodi proteina upotrebom sulfosalicilne kiseline i centrifugiranja (5000 rpm/10 min). Metoda koristi redukciju kojom GSH redukciju DTNB (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina)) prevodi u TNB.

RASTVORI:

1. Sulfosalicilna kiselina10%
2. Pufer, pH 6.....EDTA (6 mM); NaH₂PO₄ (125 mM)
3. DTNB.....6 mM
4. GSH (standard).....4.8 mg/100 mL pufera

Očitavanje se vrši u periodu od 150 s, na 30°C i talasnoj dužini od 412 nm.

$$[\text{GSH}] = \frac{\text{Konc. St.} \times A_{Uz}}{A_{St} \times V_{Uz}} \times 1000$$

Jedinice za koncentraciju GSH u plazmi su µmol/L plazme. Za tkiva se brojilac u razlomku množi razblaženjem, a dobijena koncentracija je u jedinicama µmol/g tkiva.

4.6. Statistička obrada rezultata

Izračunavanje dovoljnog broja ispitanika u istraživanju sprovedeno je na osnovu pilot studije kod 30 ispitanika: 15 sa glioblastomom i 15 sa meningeomom .

Pri analizi podataka primenjene su osnovne metode deskriptivne statistike: srednja vrednost (X) sa merama disperzije (standardnom greškom (SE), standardnom devijacijom (SD), rasponom varijacije Min-Max i vrednostima medijane (Med) i moda (Mod)).

Normalnost raspodele je testirana Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom.

Za testiranje statističke značajnosti i proveru hipoteza su korišćeni sledeći statistički testovi:

- Studentov t-test (parametrijski test) za zavisne i nezavisne uzorke.
- Analiza varijanse (ANOVA), jednofaktorska i dvofaktorska sa pratećom *a priori* Boniferonijevom t procedurom i *post hoc* Tuckey HSD, LSD i Dunnett-ovim testom za višestruka poređenja među grupama.

Kvantifikacija povezanosti između varijabli biće utvrđena Pirsonovom linearnom korelacijom.

Baza podataka i analiza rezultata je izvršena pomoću softverskog paketa SPSS 10.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL,USA).

V REZULTATI

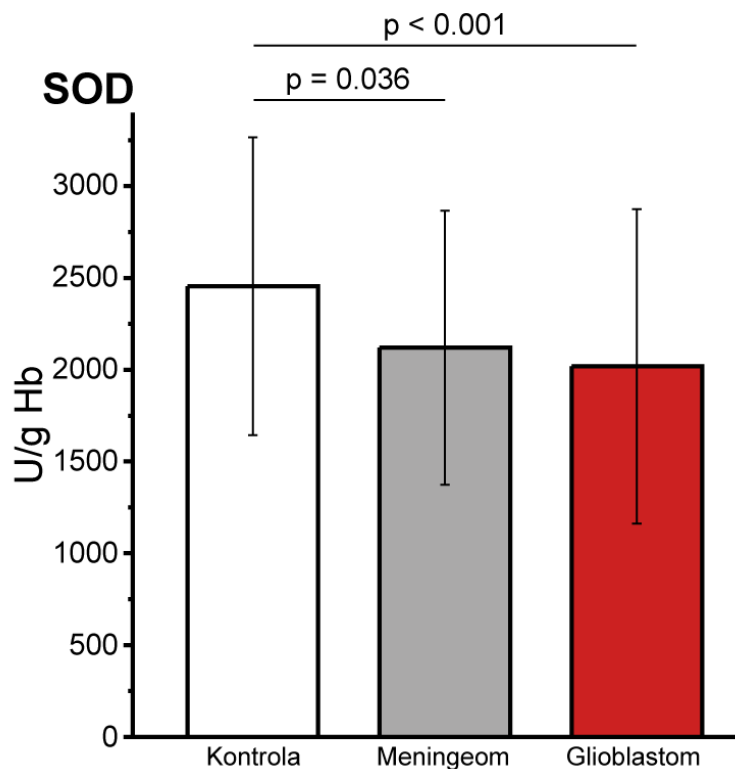
Aktivnost enzimskih komponenti superoksid dismutaze (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px), glutation reduktaze (GR) antioksidativnog zaštitnog sistema određivane su kod populacije ljudi oba pola, starosti od 22 do 76 godina obolelih od Meningeoma (benigni tumor) i Glioblastoma (maligni tumor). Enzimske aktivnosti su određivane i kod populacije zdravih ljudi prosečne starosti od 21 do 53 godina i te vrednosti su uzete kao kontrolne (Tabela 3).

Tabela 3. Osnovne karakteristike studije.

	Zdravi (kontrolne)	Oboleli meningeom	Oboleli glioblastom
Broj učesnika	32	67	67
Starost (srednja vrednost ± S.D.)	33.2 ± 7.2	59.2 ± 10.2	52.9 ± 11.5
Starost (opseg)	21 – 53	30 – 74	22 – 76
Odnos polova (m/ž)	18/15	44/23	38/31

5.1. Aktivnost enzima u eritrocitima i nivo glutationa u plazmi

Može se uočiti da je aktivnost SOD značajno manja u eritrocitima obolelih od glioblastoma i meningeoma u odnosu na zdrave kontrole (Slika 28.; Tabela 4). Nema razlike u aktivnosti između dva tipa tumora.

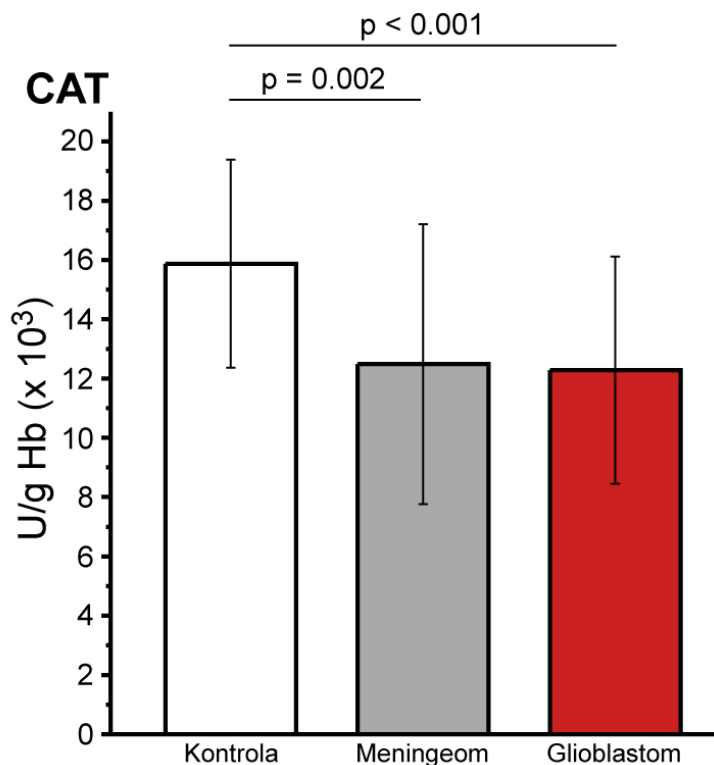


Slika 28. Aktivnost SOD u eritrocitima (u eritrocitima je prisutna CuZn SOD). Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici.

Tabela 4. Brojčane srednje vrednosti SOD aktivnosti (i standardne devijacije) u eritrocitima izražene u jedinicama po gramu hemoglobina.

Uzorak	Aktivnost	S.D.
Kontrola	2455	811
Meningeom	2121	746
Glioblastom	2012	855

Slika 29. i Tabela 5 pokazuju sličan trend kod CAT, dakle smanjen aktivnost u eritrocitima neuro-onkoloških pacijenata, bez razlike između obolelih od Glioblastoma multiforme i meningeoma.

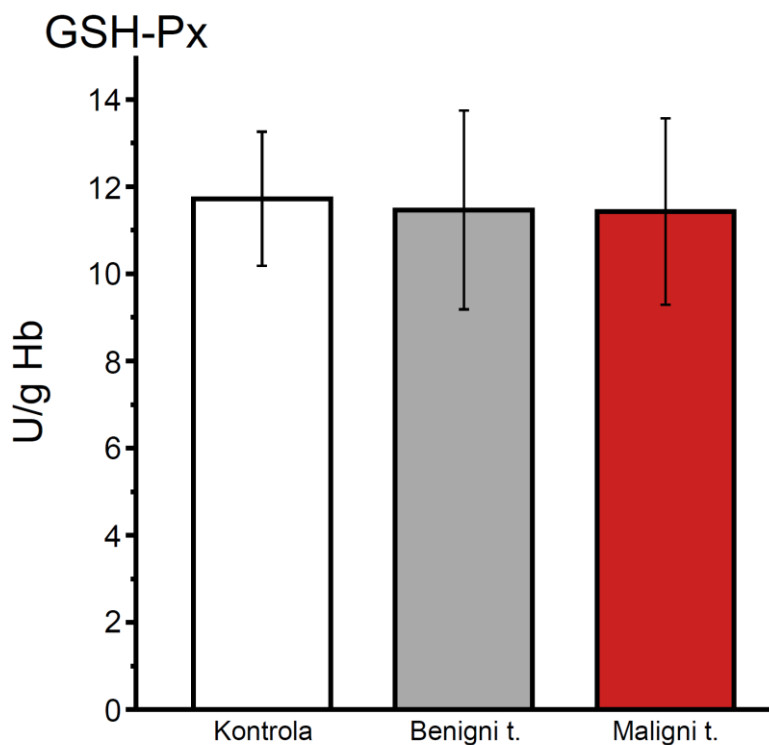


Slika 29. Aktivnost katalaze (CAT) u eritrocitima. Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici.

Tabela 5. Brojčane srednje vrednosti CAT aktivnosti (i standardne devijacije) u eritrocitima izražene u jedinicama (x 1000) po gramu hemoglobina.

Uzorak	Aktivnost	S.D.
Kontrola	15.88	3.51
Meningeom	12.48	4.72
Glioblastom	12.26	3.83

Nema razlike u aktivnosti GSH-Px između bilo koje dve grupe uzoraka (Slika 30; Tabela 6).

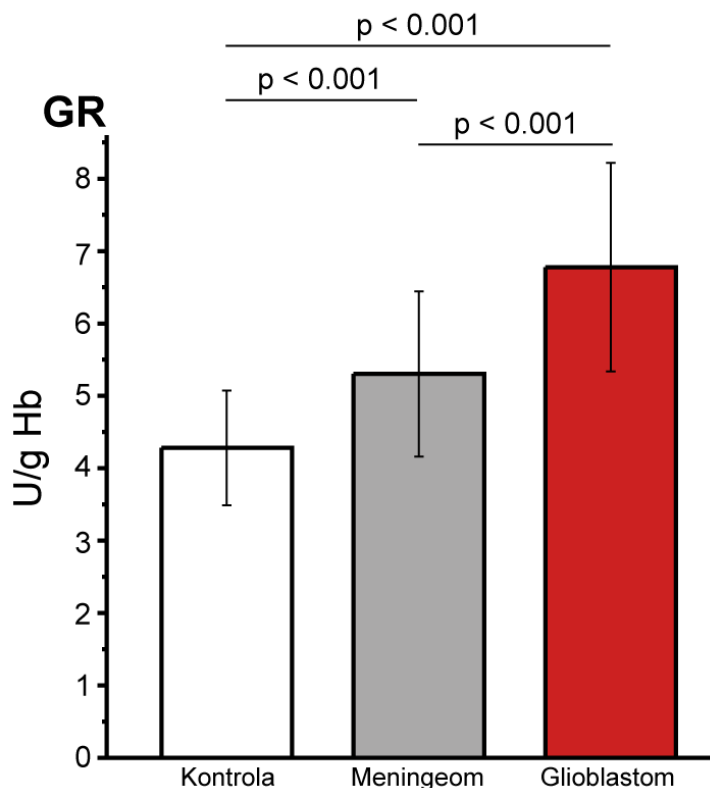


Slika 30. Aktivnost GSH-Px u eritrocitima.

Tabela 6. Brojčane srednje vrednosti GSH-Px aktivnosti (i standardne devijacije) u eritrocitima izražene u jedinicama po gramu hemoglobina.

Uzorak	Aktivnost	S.D.
Kontrola	11.72	1.54
Meningeom	11.46	2.28
Glioblastom	11.39	2.14

Najkompleksniji profil je dobijen za GR aktivnost, gde su uočene signifikantne razlike između svih parova uzoraka. Aktivnost je pokazala sledeći trend: kontrola < meningeom < glioblastom (Slika 31; Tabela 7).

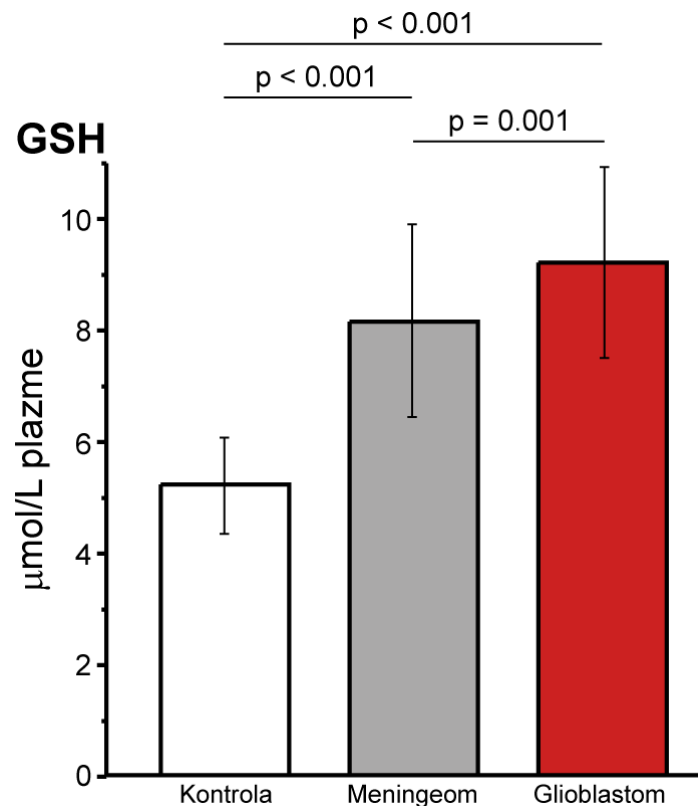


Slika 31. Aktivnost GR u eritrocitima. Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici.

Tabela 7. Brojčane srednje vrednosti GR aktivnosti (i standardne devijacije) u eritrocitima izražene u jedinicama po gramu hemoglobina.

Uzorak	Aktivnost	S.D.
Kontrola	4.28	0.79
Meningeom	5.30	1.14
Glioblastom	6.78	1.44

Za koncentraciju GSH u plazmi se može uočiti isti trend kao za GR u eritrocitima: kontrola < meningeom < glioblastom (Slika 32; Tabela 8). Uzevši u obzir sve rezultate, jasno je da u krvi obolelih kako od glioblastoma tako i od meningeoma dolazi narušavanja redoks ravnoteže u krvi, a promene su izraženije kod glioblastoma.



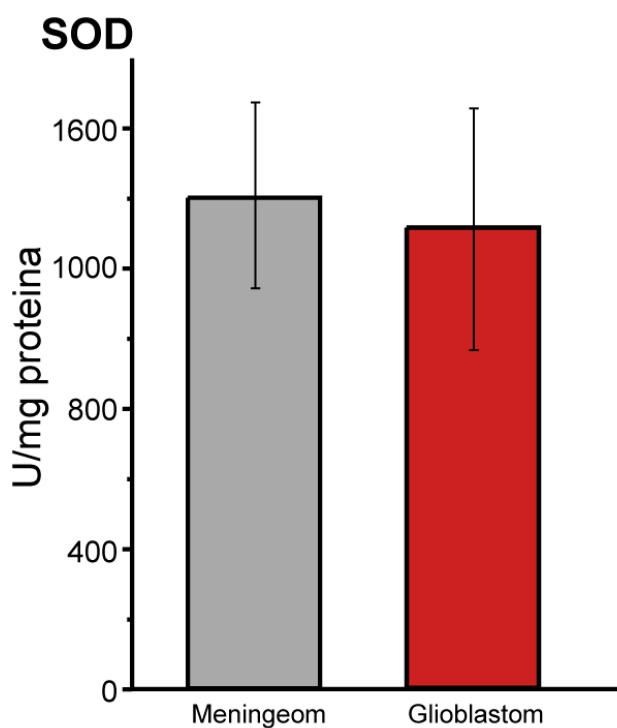
Slika 32. Koncentracija GSH u plazmi. Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici.

Tabela 8. Brojčane srednje vrednosti nivoa GSH (i standardne devijacije) u plazmi izražene u mikromolima po L plazme.

Uzorak	Koncentracija	S.D.
Kontrola	5.25	0.86
Meningeom	8.18	1.73
Glioblastom	9.22	1.71

5.2. Aktivnost enzima i nivo glutationa u tumorskom tkivu

Slika 33. i Tabela 9. pokazuju da tkivo glioblastoma ima nešto manju aktivnost SOD u odnosu na meningeom, ali nema statističke signifikantnosti ($p = 0.07$; granica signifikantnosti $p < 0.05$).

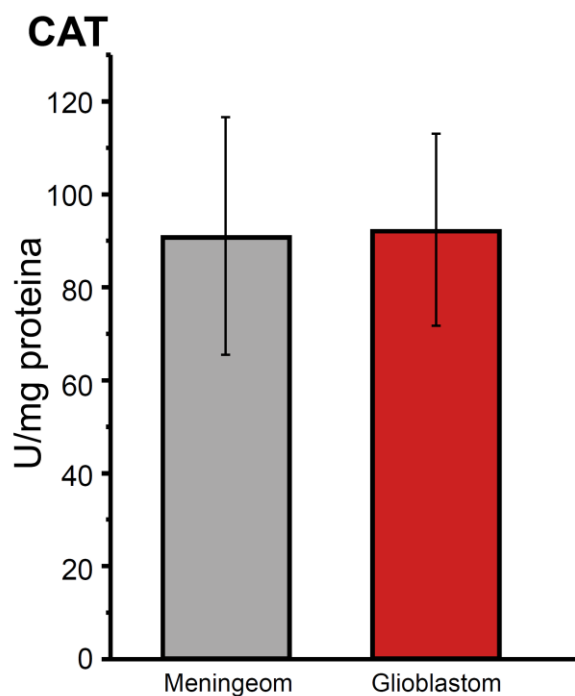


Slika 33. Aktivnost SOD u tumorskom tkivu.

Tabela 9. Brojčane srednje vrednosti SOD aktivnosti (i standardne devijacije) u tumorskom tkivu izražene u jedinicama po miligramu proteina.

Oboljenje	Aktivnost	S.D.
Meningeom	1409	265
Glioblastom	1313	345

Katalaza u tkivu tumora ne pokazuje različitu aktivnost za glioblastom i meningeom (Slika 34; Tabela 10).

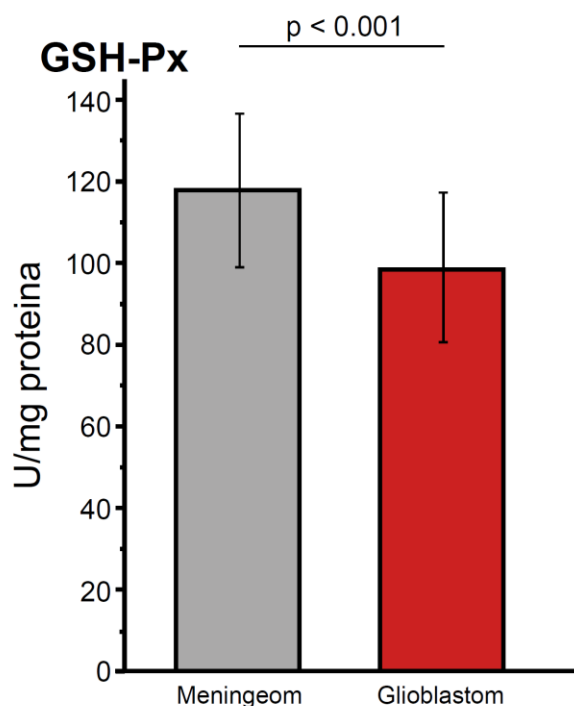


Slika 34. Aktivnost CAT u tumorskom tkivu.

Tabela 10. Brojčane srednje vrednosti CAT aktivnosti (i standardne devijacije) u tumorskom tkivu izražene u jedinicama po miligramu proteina.

Oboljenje	Aktivnost	S.D.
Meningeom	91.0	25.6
Glioblastom	92.4	20.7

Aktivnost GSH-Px u glioblastomu je značajno niža u odnosu na tkivo meningeoma (Slika 35; Tabela 11).

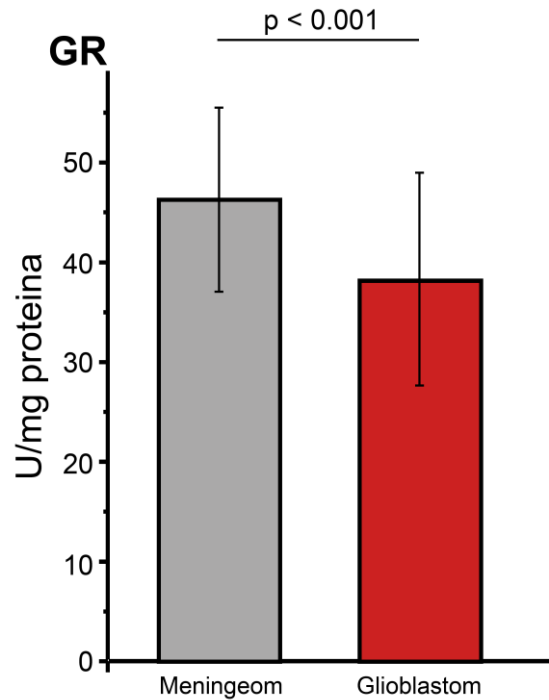


Slika 35. Aktivnost GPx u tumorskom tkivu. Statistički značajna razlika i pripadajuća p vrednosti je prikazana na slici.

Tabela 11. Brojčane srednje vrednosti GPx aktivnosti (i standardne devijacije) u tumorskom tkivu izražene u jedinicama po miligramu proteina.

Oboljenje	Aktivnost	S.D.
Meningeom	117.8	18.8
Glioblastom	99.0	18.3

Isti trend je uočen i za aktivnost GR (Slika 36; Tabela 12).

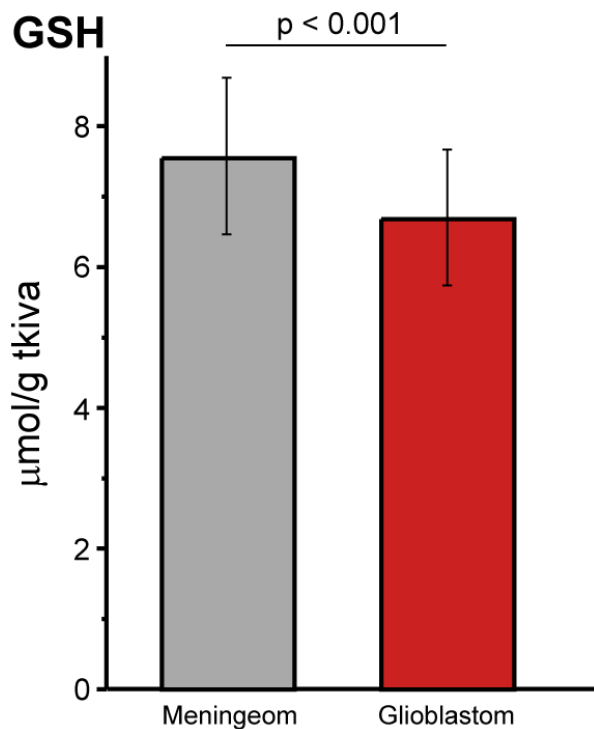


Slika 36. Aktivnost GR u tumorskom tkivu. Statistički značajna razlika i pripadajuća p vrednosti je prikazana na slici.

Tabela 12. Brojčane srednje vrednosti GPx aktivnosti (i standardne devijacije) u tumorskom tkivu izražene u jedinicama po miligramu proteina.

Oboljenje	Aktivnost	S.D.
Meningeom	46.7	9.2
Glioblastom	38.3	10.7

Koncentracija GSH u tkivu glioblastoma je značajno niža u odnosu na meningeom (Slika 37; Tabela 13).



Slika 37. Nivo GSH u tumorskom tkivu. Statistički značajna razlika i pripadajuća p vrednosti je prikazana na slici.

Tabela 13. Brojčane srednje vrednosti koncentracije GSH (i standardne devijacije) u tumorskom tkivu izražene u mikromolima po g proteina.

Oboljenje	Koncentracija	S.D.
Meningeom	7.58	1.11
Glioblastom	6.70	0.96

5.3. Korelaciona analiza

Korelacija aktivnosti AOS enzima u krvi

Enzimi antioksidativne zaštite u eritrocitima predstavljaju povezani sistem, jer zajedno učestvuju u regulaciji redoks stanja krvi, ali i zato što su njihovi supstrati povezani. Superoksid koga uklanja SOD, se dismutira do H₂O₂, koga uklanjaju CAT i GSH-Px. GR obnavlja drugi supstrat GSH-Px-a, a to je glutation, prevodeći ga iz oksidovane (GSSG) u redukovanu formu (GSH). GSH nije samo supstrat GSH-Px-a već može i samostalno da vrši popravku oksidativnih izmena (npr. oksidovani cisteini na proteinima, direktno uklanjanje slobodnih radikala). S druge strane glavni progenitor svih reaktivnih vrsta kiseonika je superoksid. Ukupno sa ovog stanovišta može se očekivati da u fiziološkim uslovima enzimi antioksidativne zaštite rade koordinisano, odnosno da između aktivnosti određenih komponenti sistema postoji korelacija.

Tabela 14. Korelacioni koeficijenti (r) za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i nivoa GSH u plazmi zdravih osoba (kontrola). Crvenim su obeležene r vrednosti koje su statistički značajne ($p < 0.05$).

Enzim	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GSH
SOD	-	0.184	0.073	0.247	0.430
CAT	0.184	-	0.190	0.308	-0.145
GSH-Px	0.073	0.190	-	0.565	0.103
GR	0.247	0.308	0.565	-	0.302
GSH	0.430	-0.145	0.103	0.302	-

U kontrolnim uzorcima statistički značajna korelacija je utvrđena između aktivnosti GSH-Px i GR, kao i aktivnosti SOD u eritrocitima i nivoa GSH u plazmi (Tabela 14). Veza između usko povezanog para enzima (GSH-Px/GR) se mogla očekivati. Otsustvo pozitivne korelacije između GR i GSH se može objasniti činjenicom da koncentracija GSH u plazmi zavisi od najmanje dva proces - potrošnje usled aktivnosti GSH-Px i direktnih reakcija sa radikalnim vrstama, i njegove "reciklaže" kroz aktivnost GR. Pozitivna

korelacija SOD/GSH se može objasniti činjenicom da su oba targetirana od strane istog ROS-a. Konkretno, H₂O₂ smanjuje koncentraciju GSH kroz oksidaciju, a takođe može da inhibira SOD.

Tabela 15. Korelacioni koeficijenti (r) za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i nivoa GSH u plazmi obolelih od menigneoma. Crvenim su obeležene r vrednosti koje su statistički značajne ($p < 0.05$).

Enzim	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GSH
SOD	-	0.260	0.104	0.070	0.041
CAT	0.260	-	0.221	0.164	0.205
GSH-Px	0.104	0.222	-	0.227	0.089
GR	0.070	0.164	0.227	-	-0.008
GSH	0.041	0.205	0.089	-0.008	-

U krvi obolelih od meningeoma, statistički značajna korelacija je utvrđena samo između aktivnosti SOD i CAT (Tabela 15). Može se uočiti da je kohezija AOS u krvi obolelih od meningeoma narušena. Kroz korelaciju između SOD i CAT aktivnosti implicirana je uloga O₂⁻, čije potpuno eliminisanje iz sistema zahteva i SOD i jedan od načina za uklanjanje H₂O₂ (u ovom slučaju enzim CAT).

Tabela 16. Korelacioni koeficijenti (r) za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i nivoa GSH u plazmi obolelih od glioblastoma.

Enzim	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GSH
SOD	-	0.073	-0.073	0.151	-0.028
CAT	0.073	-	0.135	0.157	0.201
GSH-Px	-0.073	0.135	-	-0.068	-0.021
GR	0.151	0.157	-0.068	-	-0.028
GSH	-0.028	0.201	-0.021	-0.028	-

U krvi obolelih od glioblastoma statistički značajna korelacija je nije utvrđena niti u jednom paru enzima (Tabela 16). Dok u krvi obolelih od meningeoma, dolazi do promene u redoks ravnoteži, kod obolelih of glioblastoma ova ravnoteža se izgleda potpuno gubi.

Korelacija aktivnosti AOS enzima u tumorima

Redoks stanje u tkivu je strogo regulisano, jer s jedne strane ROS učestvuju u signalnim kaskadama, a sa druge njihova produkcija iznad određenog fiziološkog nivoa vodi do patološkog stanja označenog kao oksidativni stres. Za očekivati je, u ovom smislu, da su komponente antioksidativnog enzimskog sistema na neki način povezane, odnosno koordinisane.

Tabela 17. Korelacioni koeficijenti (r) za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i nivoa GSH u tkivu meningeoma.

Enzim	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GSH
SOD	-	0.045	-0.080	-0.095	0.044
CAT	0.045	-	0.070	-0.109	0.010
GSH-Px	-0.080	0.070	-	0.017	0.136
GR	-0.095	-0.109	0.017	-	-0.173
GSH	0.044	0.010	0.136	-0.173	-

Međutim, kao što se može videti iz Tabele 17, ovakva koordinacija ne postoji (nema značajne korelacije) u tkivu meningeoma. Situacija se čini još lošijom u tkivu glioblastoma (Tabela 18). Ovde se može uočiti negativna korelacija između aktivnosti SOD i CAT, dva enzima direktno povezana u nizu otklanjanja reaktivnih vrsta kisoenika ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2$). Dakle, tamo gde je SOD aktivnost povećana, CAT aktivnost je smanjena.

Tabela 18. Korelacioni koeficijenti (r) za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i nivoa GSH u tkivu glioblastoma. Crvenim su obeležene r vrednosti koje su statistički značajne ($p < 0.05$).

Enzim	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GSH
SOD	-	-0.403	0.147	0.062	-0.121
CAT	-0.403	-	0.026	0.024	-0.162
GSH-Px	0.147	0.026	-	0.017	-0.173
GR	0.062	0.024	0.017	-	-0.037
GSH	-0.121	-0.162	-0.173	-0.037	-

Korelacija tumori/eritrociti

Određivanje korelacije u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima i u tumorskom tkivu predstavlja pokušaj da se ustanovi na koji način se patološko stanje u CNS reflektuje na redoks uslove u krvi.

Tabela 19. prikazuje korelacione koeficijente između aktivnosti enzima u eritrocitima obolelih od meningeoma i u samom tkivu tumora. Može se videti da korelacije ima samo po jednom parametru. Naime, negativno koreliraju GSH-Px aktivnost u eritrocitima i nivo GSH u tumoru.

Tabela 19. Korelacioni koeficijenti (r) za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u tkivu meningeoma i u eritrocitima obolelih od meningeoma. Crvenim su obeležene r vrednosti koje su statistički značajne ($p < 0.05$).

		Tkivo meningeoma				
		SOD	CAT	GSH-Px	GR	GSH
Eritrociti	SOD	0.183	-0.051	0.095	0.115	0.084
	CAT	0.180	0.029	0.101	-0.206	0.019
	GSH-Px	0.059	0.143	0.079	0.048	-0.273
	GR	-0.103	0.027	0.122	-0.067	-0.078
	GSH	0.183	-0.022	0.222	-0.109	0.102

Analiza pokazuje da aktivnost SOD u eritrocitima pozitivno korelira sa aktivnošću ovog enzima u tkivu glioblastoma.

Tabela 20. Korelacioni koeficijenti (r) za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u tkivu glioblastoma i u eritrocitima obolelih od glioblastoma. Crvenim su obeležene r vrednosti koje su statistički značajne ($p < 0.05$).

		Tkivo glioblastoma				
		SOD	CAT	GSH-Px	GR	GSH
Eritrociti	SOD	0.380	-0.109	-0.172	0.151	-0.017
	CAT	0.077	0.240	0.006	0.139	-0.117
	GSH-Px	0.047	0.004	-0.009	0.060	-0.016
	GR	0.135	-0.116	-0.086	-0.105	-0.219
	GSH	0.074	0.142	0.068	-0.017	-0.026

Korelaciona analiza ukazuje da postoji veza između redoks stanja u tumorskom tkivu i u krvi. Čini se da se ova veza razlikuje kod meningeoma i kod glioblastoma. Međutim ovi se rezultati moraju uzeti sa izvesnom dozom rezerve, jer pokazuju korelaciju između (tumorskog) tkiva u kome aktivnost enzima i količina redukovano glutationa zavise i od inhibitora, odnosno prevođenja u oksidovanu formu (GSSG), ali i od *de novo* sinteze. Sa druge strane, AOS sistem u eritrocitima primarno zavisi od inhibitorskih efekata, a u mnogo manjoj meri od promene nivoa enzima koja zahteva promene na nivou eritropoeze.

VI DISKUSIJA

Reaktivne vrste (ROS i RNS) i enzimi AOS su uključeni u mehanizme kancerogeneze, proliferacije tumorskih ćelija, razvoja različitih profila agresivnosti, i otpornosti na hemio- i radioterapiju.^{6,21,71,92,99,103} Redoks parametri su od posebnog značaja u patologiji tumora mozga i drugih tkiva (npr. pluća) koja se karakterišu intenzivnom potrošnjom kiseonika - progenitora većine reaktivnih vrsta. Ova studija se fokusirala na Glioblastoma multiforme koji predstavlja najmaligniji primarni tumor mozga, i na meningeome koji su najčešće benigni. U kontekstu relevantnosti redoks parametara u definisanju agresivnosti tumorskih ćelija, poređenje ova dva tipa tumora je od velike važnosti. Tretman glioblastoma nakon citoreduktivne hirurgije, uključuje radioterapiju i aplikaciju citostatika. Međutim, ćelije glioblastoma su se pokazale kao veoma rezistentne. Konkretno, intenzivna radioterapija može produžiti vreme preživljavanja za svega nekoliko meseci, dok su pokušaji razvoja hemioterapeutskog pristupa u lečenju glioblastoma opisani u literaturi kao dug i veoma razočaravajući poduhvat.¹⁴⁴ Zato se ulažu veliki naponi da se poveća senzitivnost ćelija glioblastoma na terapiju, gde je poseban fokus na adjuvansima za redoks targete.^{21,91,103,145} Konačno, izmenjeni redoks uslovi u tumorskoj masi mogu da se reflektuju na stanje u krvi, odnosno u eritrocitima.^{3,113,114,120} Analiza AOS u krvi je svakako korisna u ispitivanju redoks mehanizama uključenih u patologiju tumora mozga (surogat markeri), ali može potencijalno naći i primenu i za razvoj markera za dijagnostikovanje, praćenje progresije i utvrđivanja efekata terapije.^{23,113,145-148}

U okviru diskusije, prvo ćemo se osvrnuti na AOS profile u eritrocitima obolelih od Glioblastoma multiforme, meningeoma i zdravih subjekata, zatim ćemo uporediti AOS u dva tipa tumorskog tkiva. Važno je napomenuti da iako određena veoma mala količina podataka postoji na ovu temu, naša studija je prva koja se usresredila i jasno definisala kao cilj poređenje Glioblastoma multiforme (kao primera malignog tumora mozga) i meningeoma (primer benignog tumora mozga). Osim toga, naše studija jedina zadovoljava svojom sistematičnošću, kao i statističkom snagom, gde je kada se uzmu u obzir sve dosadašnje redoks studije na bilo kom tipu tumora mozga, ovo najveća sistematska studija sa brojem učesnika/uzoraka dovoljnim da ispuni uslove stroge

biostatističke analize, gde je na osnovu preliminarnih rezultata na po 15 uzoraka iz svake grupe utvrđeno da najmanji broj uzoraka po grupi neophodan za adekvanu statistiku iznosi 67, koliko učesnika smo i imali u studiji.

Krv obolelih od Glioblastoma multiforme i meningeoma pokazuje očigledan odklon od fiziološkog redoks stanja. U oba slučaja je uočeno značajno smanjenje aktivnosti SOD i CAT, a povećan nivo GR i GSH. GSH-Px je pokazala identične aktivnosti u svim grupama uzoraka. Prvi zaključak koji se iz ovoga može izvesti je da u tumorskom tkivu postoje patološki redoks proces koji se reflektuju na eritrocite tokom kontakta u okviru tumorske cirkulacije. Analiza AOS eritrocita se razlikuje u odnosu na analizu u tkivima, jer eritrociti nemaju *de novo* sintezu enzima, te se svaka smanjena aktivnost primarno može pripisati direktnoj inhibiciji.^{3,113,114,120} Aktivacija enzima se može povezati sa deinhibicijom, ali se rezultati ne smeju posmatrati jednoznačno, odnosno moraju se postaviti u određeni (pato)fiziološki kontekst. U skladu sa navedenim, iz dobijenih rezultata može se izvesti da se tkiva glioblastoma i meningeoma karakterišu povećanom produkcijom H₂O₂ i NO, koji "cure" u cirkulaciju i utiču na AOS u eritrocitima. Konkretno, H₂O₂ je inhibitor SOD (i to specifično CuZn SOD koja je karakteristična za eritrocite),⁵¹⁻⁵³ dok je NO inhibitor CAT.⁵⁸ U ovakvim uslovima, sa inhibiranim enzimima zaduženim za zaštitu, kako od endogenog oksidativnog stresa (kroz auto-oksidaciju oksihb), tako i od H₂O₂ koji dolazi iz spoljne sredine (tj. tkiva), mora doći do kompenzacije. Kako razvoj tumora mozga nije akutni događaj, odnosno zahteva određen duži vremenski period, ima dovoljno vremena da promenjeni redoks uslovi u krvi utiču na proces eritropoeze,¹⁴⁹ te da se eritrociti zamene novom generacijom koja je bolje opremljena za borbu sa tumor-indukovanim oksidativnim stresom. Ovde se vidi poštovanje određene fiziološke "logike". Naime, povećan nivo CAT ne bi imao efekta, jer bi i veće količine CAT bile barem delimično inhibirane. Zato se kompenzacija javlja u vidu povećanja GR aktivnosti, i sa tim u vezi višim nivoom GSH, koji može H₂O₂ da uklanja kroz aktivnost GSH-Px, ali i direktnim skevindžingom (ovo važi i za ROS, a i NO se može vezati za GSH).¹ Važno je napomenuti da ONOO⁻ koji je inhibitor GR ne može da napusti tkivo zbog negativne šarže. Veći nivo GR i GSH u krvi obolelih od Glioblastoma multiforme u odnosu na meningeom jasno ukazuje da je kod glioblastoma neophodna jača kompenzacija, odnosno da je oksidativni pritisak koji ovo tumorsko tkivo vrši na nivo eritrocita veći. Ukratko, u glioblastomu se

produkuje više H_2O_2 (a verovatno i NO) u odnosu na tkivo meningeoma. Pretpostavljeni veći oksidativni pritisak je u skladu i sa korelacionom analizom, koja je pokazala da je AOS sistem više narušen u krvi obolelih od Glioblastoma multiforme u odnosu na meningeom.

Gde se ovi rezultati nalaze u odnosu na prethodne studije? Wozniak i kolege su našli povećanu SOD aktivnost u eritrocitima obolelih od glioblastoma ($n = 9$) u odnosu na zdrave kontrole ($n = 20$). Aktivnost CAT se nije razlikovala.¹¹⁰ Rao i saradnici su pokazali smanjenu SOD i GR aktivnost u eritrocitima obolelih od menigeoma ($n = 28$) u odnosu na kontrole ($n = 48$).¹¹⁵ CAT je bila niža u meningeomu, ali ne statistički signifikantno, dok GSH-Px nije pokazala nikakvu razliku u odnosu na kontrolne vrednosti. U kontekstu poređenja maligni vs. benigni tumori mozga, nisu uočene značajne razlike u AOS.^{115,118} Dakle po pitanju CAT i GSH-Px prethodni rezultati su slični našim. Rezultati za SOD se nisu slagali među studijama, što se može objasniti i malim brojem uzoraka i moguće neadekvatnom primenom biohemijskog eseja za SOD, gde se zahteva visoka stručnost i pažnja. Konačno razlike u nalazima za GR, s obzirom da je reč o kompenzatorskim procesima, mogu poticati od različitog perioda trajanja oboljenja.

Što se tiče tkiva, ovde smo se ograničili na poređenje AOS sistema u tumorskom tkivu Glioblastoma multiforme i meningeoma. Smatrali smo da kadaverično tkivo dobijeno autopsijom ne predstavlja adekvatnu kontrolu. Peritumorsko tkivo je predstavljalo moguću alternativu, ali s obzorom na blizinu tumora, verovatno je kao i krv izloženo oksidativnom pritisku, te bi korišćenjem vrednosti za AOS enzime moglo da dođe do pogrešne interpretacije. Dok se SOD i CAT nisu razlikovali u aktivnosti u glioblastomu i meningeomu, rezultati su pokazali da je GSH sistem, odnosno aktivnosti GSH-Px i GR kao i nivo GSH značajno šiftovan ka manjim vrednostima u glioblastomu. Korelaciona analiza pokazala je da u meningeomu ne postoji veza između bilo kog para AOS komponenata. U glioblastomu uočena je značajna negativna korelacija između SOD i CAT aktivnosti. Dakle veća SOD aktivnost za sobom povlači manju SOD aktivnost, i obratno, manja SOD aktivnost ide u paru sa većom CAT aktivnošću. Ovo je jako zanimljiv nalaz u kontekstu studije koja je pokazala da se glioblastomi mogu podeliti u dve grupe prema sadržaju SOD koji su povezani sa "boljom" (manje SOD) i "lošijom" prognozom (više SOD).¹⁰⁰ Naši rezultati pokazuju da je viša aktivnost SOD povezana sa smanjenom

CAT aktivnošću, što jasno vodi do hiperprodukcije H_2O_2 u toj grupi (subtipu) glioblastoma. Ukratko, čini se da je veća produkcija H_2O_2 u glioblastomu povezana sa "lošijom" prognozom, odnosno kraćim periodom preživljavanja pacijenata obolelih od glioblastoma.

Vratimo se na GSH sistem u glioblastomu. Smanjena GR aktivnost u tkivu glioblastoma u odnosu na meningeom može da implicira povećanu produkciju ONOO⁻, GR inhibitora.⁵¹ Iako ovo može predstavljati jedan od osnova za uočenu razliku, čini se da nije dominantan, jer kod glioblastoma nije reč o izolovnoj inhibiciji jednog enzima, već o sistemski suprimiranom čitavom GSH sistemu, naravno relativno u odnosu na meningeom. Naš nalaz je u skladu sa ranijom studijom Tanriverdija i kolega koji su (na mnogo manjoj populaciji, oko 20 pacijenata po grupi) pokazali da glioblastom u odnosu na meningeom ima manju GSH-Px i GR aktivnost.⁹⁶ Međutim aktivnosti su i dalje bile oko dva puta veće u odnosu na kontrolno tkivo. GSH-Px i GR i troše i obnavljaju GSH, ali velika produkcija H_2O_2 prevlađuje ovaj sistem, što rezultuje u tome da nivo GSH bude manji u glioblastomu u odnosu na normalno tkivo.^{95,128} Manja aktivnost GSH sistema u glioblastomu u odnosu na meningeom uočena ovde, implicira da maligni profil tumorskih ćelija koriguje svoj AOS u cilju promocije produkcije H_2O_2 . Naravno, određeni nivo anti- H_2O_2 aktivnosti je neophodan kako bi se sprečila autodestrukcija.⁹⁵ Drugi potencijalni uzrok manje aktivnosti GSH sistema u glioblastomu je preusmeravanje cisteina (GSH progenitora) u metabolički put za proizvodnju cisteinske sulfonične kiseline, koja je uključena u nastanak i rast tumorskih ćelija agresivnog profila.¹²⁹

Osim postuliranja važnih detalja u mozaiku (redoks) metabolizma najagresivnijeg tumora mozga - Glioblastoma multiforme, i meningeoma koji je generalno benignan, ali može dobiti maligni profil ili biti pozicioniran na mestu koje sprečava adekvatan neurohirurški zahvat, naša studija pruža još dva potencijalno veoma važna nalaza. Prvi je specifičan profil AOS u krvi obolelih od tumora mozga. Smanjena aktivnost SOD i CAT, i povećana aktivnost GR (gde je poslednje najvažniji detalj) je AOS profil kakav nismo mogli da nađemo u literaturi za bilo koje neonkološko oboljenje. Očigledno da potencijal za razvoj markera za tumore (mozga) postoji, gde bi se određivanjem AOS profila (eseji se uz stručnu pomoć mogu uvesti u kliničke biohemijske laboratorije) vršila rana dijagnostika, praćenje uspešnosti terapije i progresija (rasta) tumora. Naravno, ovaj koncept se mora dalje ispitati i razraditi. Drugi krucijalan nalaz je ogromna produkcija

H_2O_2 u glioblastomu, što H_2O_2 čini važnim terapijskim targetom. Ovde se mogu upotrebiti dve strategije: (i) Smanjivanje nivoa H_2O_2 u glioblastomu aplikacijom antioksidativnih agenasa, kao što je N-acetilcistein, koji direktno reaguje sa H_2O_2 .^{150,151} Generalni problem u terapiji tumora mozga je prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, koja je kod nekih pacijenata oštećena, što je svakako klinički loše, ali omogućava da antioksidanti stignu do CNS. U okviru ove strategije, mogu se aplicirati i jedinjenja koja promovišu sintezu AOS enzima, kao što je selen. (ii) Možemo se protiv glioma boriti njegovim oružjem, odnosno okrenuti veliku produkciju H_2O_2 na štetu tumorskih ćelija. Dok je vodonik peroksid relativno stabilni modulator (pato)fizioloških metaboličkih puteva, njegov proizvod iz reakcije sa redoks aktivnim metalima - $OH\cdot$ je visoko reaktivno, neselektivno oksidujuće jedinjenje. Dakle ova druga strategija se oslanja na promociju Fentonove reakcije. Ovo se može ostvariti ili kroz unos slabo-heliranog gvožđa (npr. Fe-EDTA kompleks) koje je posebno redoks aktivno,¹⁵² ili aplikacijom askorbata koji se inače ponaša kao antioksidant, ali u prisustvu gvožđa promiviše Fentonovu reakciju.¹⁵³ Ovakav pristup bi mogao da šteti i zdravim ćelijama, ali s obzirom da one pokazuju mnogo manju produkciju H_2O_2 , dobro procenjena terapijska doza gvožđa i askorbata bi mogla da indukuje značajnu produkciju razarajućeg $OH\cdot$ radikala isključivo u ćelijama glioblastoma.

VII ZAKLJUČCI

- Promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, smanjena aktivnost SOD i CAT i povećana aktivnost GR u eritrocitima, kao i povećan nivo GSH u plazmi pacijenta obolelih od tumora u odnosu na zdrave kontrole, ukazuje da su eritrociti pacijenata obolelih od tumora izloženi povišenom nivou oksidacije tj. oksidativnom stresu.
- Aktivnost enzima GR u eritrocitima i koncentracija GSH u plazmi pacijenata sa glioblastomom statistički je značajno veća u odnosu na aktivnost kod pacijenata sa meningeomom, što ukazuje da su uslovi u krvi obolelih od glioblastoma u većoj meri pro-oksidativni u odnosu na pacijente obolele od meningeoma.
- Aktivnost enzima GR i GSH-Px, kao i nivo GSH u tkivu glioblastoma statistički su značajno niži u odnosu na tkivo meningeoma.
- Korelacionom analizom utvrdili smo da su pozitivne korelacije između aktivnosti GPx i GR, kao i aktivnosti SOD i nivoa GSH, koje su karakteristične za krv zdravih osoba, narušene u krvi pacijenata sa tumorom. Kod obolelih od meningeoma uočena je negativna korelacija između aktivnosti GSH-Px u krvi i nivoa GSH u tumoru. U slučaju glioblastoma, uočena je pozitivna korelacija aktivnosti SOD u eritrocitima sa aktivnošću ovog enzima u tkivu glioblastoma. Konačno, uočena je negativna korelacija između SOD i CAT aktivnosti u tkivu glioblastoma.

VIII LITERATURA

1. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition, Oxford University Press Inc., New York, 2007.
2. C. Jacob, P. G. Winyard, *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2009.
3. Nikolić-Kokić A, Blagojević D, Spasić M. Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes. *J Biochem Med*. 2013;29:189-95.
4. Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*. 2008;390:1-11.
5. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:718-44.
6. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev*. 2013;12:376-90.
7. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-84.
8. Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Saga T. Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: from early to terminal stages of cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19:2503-17.
9. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? *BMC Med*. 2011;9:62.
10. Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23:311-22.
11. López-Lázaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett*. 2007;252:1-8.
12. Lee DH, O'Connor TR, Pfeifer GP. Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG-->TT tandem mutations at methylated CpG

- dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:3566-73.
13. Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17:107-18.
 14. Martin RC, Li Y, Liu Q, Barker DF, Doll MA, Hein DW. Manganese superoxide dismutase expression as a function of genotype and lung cancer pathology. *Cancer Invest.* 2010;28:813-9.
 15. Laatikainen LE, Castellone MD, Hebrant A, Hoste C, Cantisani MC, Laurila JP, Salvatore G, Salerno P, Basolo F, Näsman J, Dumont JE, Santoro M, Laukkanen MO. Extracellular superoxide dismutase is a thyroid differentiation marker down-regulated in cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17:785-96.
 16. Satomi A, Murakami S, Hashimoto T, Ishida K, Matsuki M, Sonoda M. Significance of superoxide dismutase (SOD) in human colorectal cancer tissue: correlation with malignant intensity. *J Gastroenterol.* 1995;30:177-82.
 17. Galazis N, Olaleye O, Haoula Z, Layfield R, Atiomo W. Proteomic biomarkers for ovarian cancer risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and biomarker database integration. *Fertil Steril.* 2012;98:1590-601.
 18. 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;13:2571-6.
 19. Kim JJ, Chae SW, Hur GC, Cho SJ, Kim MK, Choi J, Nam SY, Kim WH, Yang HK, Lee BL. Manganese superoxide dismutase expression correlates with a poor prognosis in gastric cancer. *Pathobiology.* 2002-2003;70:353-60.
 20. Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 2001;61:8578-85.
 21. Glorieux C, Dejeans N, Sid B, Beck R, Calderon PB, Verrax J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2011;82:1384-90.
 22. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006;43:143-81.

23. Ferruzzi E, Franceschini R, Cazzolato G, Geroni C, Fowst C, Pastorino U, Tradati N, Tursi J, Dittadi R, Gion M. Blood glutathione as a surrogate marker of cancer tissue glutathione S-transferase activity in non-small cell lung cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. 2003;39:1019-29.
24. Sharma A, Rajappa M, Saxena A, Sharma M. Antioxidant status in advanced cervical cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiation. *Br J Biomed Sci*. 2007;64(1):23-7.
25. Dursun H, Bilici M, Uyanik A, Okcu N, Akyüz M. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in erythrocytes of patients with oesophageal and gastric cancer. *J Int Med Res*. 2006;34:193-9.
26. Ozdemirler G, Pabuççuoğlu H, Bulut T, Bugra D, Uysal M, Toker G. Increased lipoperoxide levels and antioxidant system in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998;124:555-9.
27. Esmek H, Cemek M, Sezer M, Sağlam H, Demir A, Melek H, Unlu M. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology*. 2008;13:112-6.
28. Cobanoğlu U, Demir H, Duran M, Şehitogullari A, Mergan D, Demir C. Erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11:1377-82.
29. Martín Mateo MC, Martín B, Santos Beneit M, Rabadán J. Catalase activity in erythrocytes from colon and gastric cancer patients. Influence of nickel, lead, mercury, and cadmium. *Biol Trace Elem Res*. 1997;57:79-90.
30. Saito T, Kurasaki M, Kaji H, Saito K. Deficiency of erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities in patients with malignant lymphoma and acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*. 1984;24:141-6.
31. Arslan A, Demir H, Arslan H. Investigating catalase and carbonic anhydrase enzyme activities and levels of certain trace elements and heavy metals in patients with primary and metastatic hepatic carcinoma. *J Cancer Ther*. 2013;4:1373-81.
32. Demirci S, Ozsaran Z, Celik HA, Aras AB, Aydin HH. The interaction between antioxidant status and cervical cancer: a case control study. *Tumori*. 2011;97:290-5.
33. Arsova-Sarafinovska Z, Matevska N, Eken A, Petrovski D, Banev S, Dzikova S, Georgiev V, Sikole A, Erdem O, Sayal A, Aydin A, Dimovski AJ. Glutathione

- peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int Urol Nephrol.* 2009;41:63-70.
34. Iynem AH, Alademir AZ, Obek C, Kural AR, Konukoğlu D, Akçay T. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant systems. *Int Urol Nephrol.* 2004;36:57-62.
35. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci.* 2010;2:12.
36. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417:1-13.
37. Bajčetić M. Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja kod dece sa dilatacionom kardiomiopatijom. Doktorska disertacija, Beograd, 2004, str. 15-20.
38. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.
39. Spasojević I, Jones DR, Andrades ME. Hydrogen peroxide in adaptation. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:596019.
40. Bindoli A, Rigobello MP. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:1557-93.
41. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, von Knethen A, Weigert A. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:595-637.
42. R. Žikić, A. Štajn, Z. Saičić, M. Spasić, S. Milovanović. Toksikološki Značaj Zaštite od Oksidacionih Oštećenja. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2000.
43. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32:595-603.
44. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull.* 1993;49:700-18.
45. Bonorden WR, Pariza MW. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: "Nutritional Toxicology", (Eds: F. N. Kotsonis, M. Mackey and J. Hjelle), 1994.
46. Brigelius R. Mixed disulfides: biological functions and increase in oxidative stress, In: "Oxidative Stress", (Ed: H. Sies), Academic Press, New York, 1985, pp. 243-271.

47. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res.* 1985;101:4-15.
48. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:79-110.
49. Tsuruga M, Matsuoka A, Hachimori A, Sugawara Y, Shikama K. The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin. Tilting of the distal histidine causes nonequivalent oxidation in the beta chain. *J Biol Chem.* 1998;273:8607-15.
50. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol.* 1997;20:II-11-7.
51. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1983;23:239-57.
52. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry.* 1975;14: 5299-303.
53. Uchida K, Kawakishi S. Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. *J Biol Chem.* 1994;269:2405-10.
54. Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:5006-10.
55. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:192-208.
56. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood.* 1997;90:4973-8.
57. Nagababu E, Chrest FJ and Rifkind JM. Hydrogen peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1620:211-7.
58. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990;51:283-97.
59. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 2008;275:3959-70.

60. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharm.* 2002;64:1019-26.
61. Savvides SN, Scheiwein M, Bohme CC, Arteel GE, Karplus PA, Becker K, Schirmer RH. Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxyxynitrite. *J Biol Chem.* 2002;277:2779-84.
62. Gondo H, Ideguchi H, Hayashi S, Shibuya T. Acute hemolysis in glutathione peroxidase deficiency. *Int J Hematol.* 1992;55:215-8.
63. Piccinini G, Minetti G, Balduini C, Brovelli A. Oxidation state of glutathione and membrane proteins in human red cells of different age. *Mech Ageing Dev.* 1995;78:15-26.
64. Backos DS, Franklin CC, Reigan P. The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:1005-12.
65. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279: L1005-28.
66. Paulsen CE, Carroll KS. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem Biol.* 2010;5:47-62.
67. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry.* 2010;49:835-42.
68. Wang Y, Yang J, Yi J. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16:649-57.
69. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:335-48.
70. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:177-81.
71. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 2005;11:1306-13.
72. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-6.
73. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.

74. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol.* 2004;26:82-97.
75. Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res.* 1999;84:253-6.
76. Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Liu W, Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T, Kohno M. Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria. *Eur J Pharmacol.* 1999;380:37-48.
77. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
78. P. Wen, D. Schiff. *Brain Tumors in Adults, An Issue of Neurologic Clinics.* Saunders, Philadelphia, 2007.
79. A. Drevelegas. *Imaging of Brain Tumors with Histological Correlations, 2nd edition.* Springer, New York, 2011.
80. A. H. Kaye, E. R. Laws Jr. *Brain Tumors: An Encyclopedic Approach, 3rd Edition,* Saunders, Philadelphia, 2011.
81. H. B. Newton. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy.* Academic Press, New York, 2005.
82. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18:1061-83.
83. Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, Yan H, Adamson DC. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13:701-18.
84. Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G; Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol.* 2002;64:259-73.
85. Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res.* 2009;29:5171-84.

86. Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D. Meningiomas. *Lancet*. 2004;363:1535-43.
87. J. H. Lee. *Meningiomas: Diagnosis, Treatment, and Outcome*. Springer, New York, 2008.
88. Deininger MH, Weller M, Streffer J, Mittelbronn M, Meyermann R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol*. 1999;98:240-4.
89. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res*. 2001;61:4375-81.
90. Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, Black PM. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res*. 2000;60(4):4926-31.
91. Kang KB, Wang TT, Woon CT, Cheah ES, Moore XL, Zhu C, Wong MC. Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;67:888-96.
92. Weaver KD, Yeyeodu S, Cusack JC Jr, Baldwin AS Jr, Ewend MG. Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor kappa B in human gliomas. *J Neurooncol*. 2003;61:187-96.
93. Ragel BT, Jensen RL, Gillespie DL, Prescott SM, Couldwell WT. Ubiquitous expression of cyclooxygenase-2 in meningiomas and decrease in cell growth following in vitro treatment with the inhibitor celecoxib: potential therapeutic application. *J Neurosurg*. 2005;103:508-17.
94. Lin CC, Kenyon L, Hyslop T, Hammond E, Andrews DW, Curran WJ Jr, Dicker AP. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human meningioma as a function of tumor grade. *Am J Clin Oncol*. 2003;26:S98-102.
95. Dokic I, Hartmann C, Herold-Mende C, Régnier-Vigouroux A. Glutathione peroxidase 1 activity dictates the sensitivity of glioblastoma cells to oxidative stress. *Glia*. 2012;60:1785-800.

96. Tanriverdi T, Hanimoglu H, Kacira T, Sanus GZ, Kemerdere R, Atukeren P, Gumustas K, Canbaz B, Kaynar MY. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and protein oxidation in patients with glioblastoma multiforme and transitional meningioma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133:627-33.
97. Liang BC, Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas. *Cancer Lett.* 1996;105:167-73.
98. Dickinson A, Yeung KY, Donoghue J, Baker MJ, Kelly RD, McKenzie M, Johns TG, St John JC. The regulation of mitochondrial DNA copy number in glioblastoma cells. *Cell Death Differ.* 2013;20:1644-53.
99. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? *BMC Med.* 2011;9:62.
100. Ria F, Landriscina M, Remiddi F, Rosselli R, Iacoangeli M, Scerrati M, Pani G, Borrello S, Galeotti T. The level of manganese superoxide dismutase content is an independent prognostic factor for glioblastoma. Biological mechanisms and clinical implications. *Br J Cancer.* 2001;84:529-34.
101. Gumustas K, Tanriverdi T, Kulaksiz I, Kafadar AM, Sanus GZ, Atukeren P, Kaynar MY. Cytochrome oxidase activity and ATP levels in high-grade gliomas and meningiomas. *Turk Neurosurg.* 2006;16: 64-8.
102. Galia A, Calogero AE, Condorelli R, Frassetto F, La Corte A, Ridolfo F, Bosco P, Castiglione R, Salemi M. PARP-1 protein expression in glioblastoma multiforme. *Eur J Histochem.* 2012;56:e9.
103. Nitta M, Kozono D, Kennedy R, Stommel J, Ng K, Zinn PO, Kushwaha D, Kesari S, Inda MD, Wykosky J, Furnari F, Hoadley KA, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK, D'Andrea A, Chen CC. Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PLoS One.* 2010;5:e10767.
104. Flügel A, Labeur MS, Grasbon-Frodl EM, Kreutzberg GW, Graeber MB. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Int J Dev Neurosci.* 1999;17:547-56.
105. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors. *Invest New Drugs.* 2003;21:21-32.

106. Miljković D, Spasojević I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19:2286-334.
107. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res*. 1995;55:727-30.
108. Bakshi A, Nag TC, Wadhwa S, Mahapatra AK, Sarkar C. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumours and peritumoral areas. *J Neurol Sci*. 1998;155:196-203.
109. Broholm H, Rubin I, Kruse A, Braendstrup O, Schmidt K, Skriver EB, Lauritzen M. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in human brain tumors. *Clin Neuropathol*. 2003;22:273-81.
110. Woźniak B, Woźniak A, Kasprzak HA, Drewa G, Mila-Kierzenkowska C, Drewa T, Planutis G. Lipid peroxidation and activity of some antioxidant enzymes in patients with glioblastoma and astrocytoma. *J Neurooncol*. 2007;81:21-6.
111. Cobbs CS, Samanta M, Harkins LE, Gillespie GY, Merrick BA, MacMillan-Crow LA. Evidence for peroxynitrite-mediated modifications to p53 in human gliomas: possible functional consequences. *Arch Biochem Biophys*. 2001;394:167-72.
112. Cobbs CS, Whisenhunt TR, Wesemann DR, Harkins LE, Van Meir EG, Samanta M. Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells. *Cancer Res*. 2003;63:8670-3.
113. Jacob KD, Noren Hooten N, Trzeciak AR, Evans MK. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev*. 2013;134:139-57.
114. Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Aviñó J, Perez P, Estrela JM. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:410-8.
115. Rao GM, Rao AV, Raja A, Rao S, Rao A. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. *Clin Chim Acta*. 2000;296:203-12.
116. Cooper AJL, Pulsinelli WA, Puffy TE. Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. *J Neurochem* 1980;35:1242-9.

117. Parkins CS, Hill SA, Stratford MR, Dennis MF, Chaplin DJ. Metabolic and clonogenic consequences of ischaemia reperfusion insult in solid tumours. *Exp Physiol*. 1997;82:361-8.
118. Aggarwal S, Subberwal M, Kumar S, Sharma M. Brain tumor and role of beta-carotene, a-tocopherol, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *J Cancer Res Ther*. 2006;2:24-7.
119. Yilmaz N, Dulger H, Kiyamaz N, Yilmaz C, Bayram I, Ragip B, Oğer M. Lipid peroxidation in patients with brain tumor. *Int J Neurosci*. 2006;116:937-43.
120. Bajčetić M, Otašević B, Prekajski NB, Spasić S, Spasojević I. Antioxidative system in the erythrocytes of preterm neonates with sepsis: the effects of vitamin E supplementation. *Ann Clin Biochem*. 2013; doi: 10.1177/0004563213503317.
121. Tuna M, Polat S, Ildan F, Göçer AI, Erman T, Tamer L, Hacıyakupoglu S. The relationships among ultrastructural angiogenic features, Na⁺ K⁺, Ca⁺², Mg⁺² ATP-ase activities and SOD concentration in the microvasculature of intracranial meningiomas and glial tumors. *Neurol Res*. 2002;24:286-90.
122. Pu PY, Lan J, Shan SB, Huang EQ, Bai Y, Guo Y, Jiang DH. Study of the antioxidant enzymes in human brain tumors. *J Neurooncol*. 1996;29:121-8.
123. R. Del Maestro, W. McDonald, R. Anderson. Superoxide dismutases, catalase and glutathione peroxidase in experimental and human brain tumors. In: *Oxygen Radicals and Their Scavenger Systems*. Vol 2. (Eds: Greenwald RA, Cohen G), Elsevier, New York 1983, pp 28-35.
124. Atukeren P, Kemerdere R, Kacira T, Hanimoglu H, Ozlen F, Yavuz B, Tanriverdi T, Gumustas K, Canbaz B. Expressions of some vital molecules: glioblastoma multiforme versus normal tissues. *Neurol Res*. 2010;32:492-501.
125. Zengin E, Atukeren P, Kokoglu E, Gumustas MK, Zengin U. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in different types of intracranial tumors within their relative peritumoral tissues. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111:345-51.
126. Matsumoto Y, Sasaoka N, Tsuchida T, Fujiwara T, Nagao S. Quantitative analysis of glutathione and glutathione S-transferase in human brain tumors, C6 rat glioma cells and drug resistant C6 cells. *No Shinkei Geka*. 1992;20:1069-74.

127. Strange RC, Fryer AA, Matharoo B, Zhao L, Broome J, Campbell DA, Jones P, Pastor IC, Singh RV. The human glutathione S-transferases: comparison of isoenzyme expression in normal and astrocytoma brain. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1139:222-8.
128. Kudo H, Mio T, Kokunai T, Tamaki N, Sumino K, Matsumoto S. Quantitative analysis of glutathione in human brain tumors. *J Neurosurg*. 1990;72:610-5.
129. Prabhu A, Sarcar B, Kahali S, Yuan Z, Johnson JJ, Adam KP, Kensicki E, Chinnaiyan P. Cysteine catabolism: a novel metabolic pathway contributing to glioblastoma growth. *Cancer Res*. 2013;doi: canres.1423.2013.
130. Lee HC, Kim DW, Jung KY, Park IC, Park MJ, Kim MS, Woo SH, Rhee CH, Yoo H, Lee SH, Hong SI. Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *Int J Mol Med*. 2004;13:883-7.
131. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61:215-25.
132. Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies: I. spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J Biol Chem*. 1932;98:719-33.
133. Tsuchihashi M. Zur Kenntnis der Blutkatalase. *Biochem Z*. 1923;140:65-74.
134. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247:3170-5.
135. E. Beutler. Catalase: A Manual of biochemical methods. In: *Red Cell Metabolism* (Ed: Beutler E), Grune and Stratton, New York 1982, pp. 105-6.
136. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70:74-7.
137. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*. 1974;30:665-8.

138. Rossi MA, Cecchini G & Dianzani MU. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase in two different hepatomas and in normal liver. *Int Res Commun Sys Med Sci.* 1983;11:805.
139. de Waziers I, Albrecht R. The effects of vitamin A nutritional status on glutathione, glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in rat intestine. *Experientia.* 1987;43:394-5.
140. Takada Y, Noguchi T, Okabe T, Kajiyama M. Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res.* 1982;42:4233-5.
141. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
142. Tamura M, Oshino N, Chance B. Some characteristics of hydrogen- and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *J Biochem.* 1982;92:1019-31.
143. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981;77:373-82.
144. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18:1061-83.
145. Xia S, Rosen EM, Laterra J. Sensitization of glioma cells to Fas-dependent apoptosis by chemotherapy-induced oxidative stress. *Cancer Res.* 2005;65:5248-55.
146. Woźniak A, Masiak R, Szpinda M, Mila-Kierzenkowska C, Woźniak B, Makarewicz R, Szpinda A. Oxidative stress markers in prostate cancer patients after HDR brachytherapy combined with external beam radiation. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:789870.
147. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, Colado Simão AN, Cecchini AL, Cecchini R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 May;133(1):89-97.

148. Burlakova EB, Zhizhina GP, Gurevich SM, Fatkullina LD, Kozachenko AI, Nagler LG, Zavarykina TM, Kashcheev VV. Biomarkers of oxidative stress and smoking in cancer patients. *J Cancer Res Ther.* 2010;6:47-53.
149. Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1923-40.
150. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(6):593-7.
151. O'Loghlen A, Pérez-Morgado MI, Salinas M, Martín ME. N-acetyl-cysteine abolishes hydrogen peroxide-induced modification of eukaryotic initiation factor 4F activity via distinct signalling pathways. *Cell Signal.* 2006;18:21-31.
152. Spasojević I, Mojović M, Stević Z, Spasić SD, Jones DR, Morina A, Spasić MB. Bioavailability and catalytic properties of copper and iron for Fenton chemistry in human cerebrospinal fluid. *Redox Rep.* 2010;15:29-35.
153. Spasojević I, Stević Z, Nikolić-Kokić A, Jones DR, Blagojević D, Spasić MB. Different roles of radical scavengers--ascorbate and urate in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Redox Rep.* 2010;15:81-6.

SPISAK SKRAĆENICA

ROS – reaktivne vrste kiseonika
AOS – antioksidativni sistem
RNS – reaktivne vrste azota
SOD – superoksid dismutaza
EC SOD – ekstracelularna superoksid dismutaza
CAT - katalaza
GSH-Px – glutation peroksidaza
GR – glutation reduktaza
GSH – glutation
GST – glutation S transferaza
CNS – centralni nervni sistem
O₂⁻ – super oksid radikal
OH – hidroksil
RO₂ – peroksil
RO – alkosil
HO₂ – hidroperoksil
H₂O₂ – vodonik peroksid
HOCL – hipohlorna kiselina
O₃ – ozon
¹O₂ – singlet kiseonik
DNK – deoksiribonukleinska kiselina
NO – azot monoksid
NO₂ – azot dioksid
HNO₂ – azotosta kiselina
N₂O₃ – azot trioksid
N₂O₄ – azot tetraoksid
NO₂⁺ – nitronijum (nitril) jon
ONOO – peroksinitrit
ONOOH – peroksiazotna kiselina

ROONO - alkil peroksinitrit
NO⁻ - nitroksil anjon
NO⁺ - nitrozil katjon
NO₂Cl - nitril hlorid
SH – tiolne grupe (-SOH, -SO₂H, -SO₃H)
Fe – gvožđe
Cu – bakar
Mn – mangan
Se – selen
CCl₃ – trihlor metil radikal
-R-S - tiol radikali
NOS – azot monoksid sintaza
nNOS – neuralna azot monoksid sintaza
eNOS – endotelijalna azot monoksid sintaza
iNOS – inducibilna azot monoksid sintaza
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
G-6-PD – glukozo – 6 - dehidrogenaza
6-PGD – 6 – fosfat – glukonat dehidrogenaza
DJ-1 - DJ-1 protein senzor
KEAP1 - Kelch-like ECH-associated protein 1
MAPK – protein-kinaza aktivatori mitoze
ONOO⁻ - anjon peroksinitrita
BCNU – karmustin
CCNU – lomustine
COX - ciklookigenaza
NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
mtDNK - mitohondrijska DNK
ADP-Riboza - glikohidrolaza
PARP-1 - Poly-ADP-ribose-polymerase 1

BIOGRAFIJA

Dr Vojislav M. Bogosavljević je rođen 01.01.1971. godine u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je 1989. godine, a diplomirao je 1994. godine, sa srednjom ocenom 9,77. Poslediplomske studije iz neurohirurgije upisao je u oktobru 1994. godine. Po završetku opšteg lekarskog staža, u aprilu 1996. započeo je specijalizaciju iz neurohirurgije, a specijalistički ispit je položio u aprilu 2002. godine, sa odličnim uspehom.

Magistarsku tezu "Analiza preživljavanja pacijenata lečenih zbog glioblastoma multiforme" odbranio je u julu 1999. godine. Od septembra 2000. godine zaposlen je na neodređeno vreme kao specijalista neurohirurgije u Klinici za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije.

Izabran je u zvanje kliničkog asistenta Medicinskog fakulteta u Beogradu, za nastavni predmet Hirurgija sa anesteziologijom - nastavna baza Klinika za neurohirurgiju KCS, aprila 2012. godine. Autor je i koautor u 75 stručnih radova i publikacija, od čega je 5 radova objavljeno in extenso u časopisima indeksiranim u CC/SCI bazi podataka.

Član je Udruženja neurohirurga Srbije - Serbian Assosiation of Neurological Surgeons (UNS), Neurohirurške Sekcije Srpskog Lekarskog Društva i European Association of Neurological Surgery (EANS).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Dr Vojislav Bogosavljević

broj upisa 4600/7

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

PROMENE AKTIVNOSTI ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U KRVU I TKIVU

BOLESNIKA SA GLIOBLASTOMOM I MENINGEOMOM

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 01.10.2014. godine

Potpis doktoranda



Dr Vojislav Bogosavljević

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : Dr Vojislav Bogosavljević

Broj upisa : 4600/7

Studijski program _____

Naslov rada : **PROMENE AKTIVNOSTI ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U
KRVI I TKIVU BOLESNIKA SA GLIOBLASTOMOM I MENINGEOMOM**

Mentor : Prof.dr Miodrag Rakić, komentor Prof.dr Milica Bajčetić

Potpisani : Dr Vojislav Bogosavljević

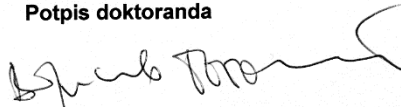
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.10.2014. godine


Dr Vojislav Bogosavljević

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

PROMENE AKTIVNOSTI ENZIMA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U KRV I TKIVU BOLESNIKA SA GLIOBLASTOMOM I MENUNGEOMOM

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

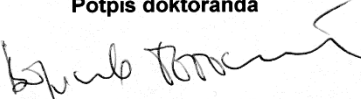
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 01.10.2014. godine

Potpis doktoranda


Dr Vojislav Bogosavljević

1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.