



Središnja medicinska knjižnica

Šverko, Ana (2011) *Povezanost pojavnosti i proširenosti bubrežnog karcinoma i tkivne ekspresije citokroma P450 [The oxidation/antioxidant profile and cytochrome P450 in RCC].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1384>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

Doktorska disertacija izrađena je pri Kliničkom zavodu za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju Medicinskog i Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkom zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak" Medicinskog i Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinici za urologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC "Sestre milosrdnice" u Zagrebu i Zavodu za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu

Voditelj rada:

Prof. dr. sc. Miljenko Marotti

Želim izraziti najveću zahvalnost voditelju prof. dr. sc. Miljenku Marottiju na predloženoj temi, konstruktivnim savjetima i živopisnim diskusijama tijekom izrade disertacije.

Za izvođenje i tumačenje radiološke dijagnostike, prikupljanje i patohistološku analizu uzoraka tkiva bubrega zahvaljujem se na bezrezervnoj pomoći liječnicima i osoblju Kliničkog zavoda za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, Kliničkog zavoda za patologiju "Ljudevit Jurak" i Klinike za urologiju, KBC "Sestre milosrdnice" u Zagrebu. Najtoplije se zahvaljujem dr. sc. Tatjani Marotti na savjetima oko izvedbe eksperimentalnog rada, tumačenju rezultata te podršci i razumijevanju pri izradi ove disertacije.

Iznimno sam zahvalna svim članovima Laboratorija za modifikatore biološkog odgovora Instituta "Ruđer Bošković" na nesebičnom prijenosu znanja, stručnim savjetima, uputama te strpljivosti.

Srdačno se zahvaljujem članovima Laboratorija za oksidacijski stres i Laboratorija za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju te svima koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.

Ovaj rad posvećujem svojoj majci.

SADRŽAJ

1 UVOD	9
1.1 KARCINOM BUBREGA.....	9
1.1.1 Epidemiologija	9
1.1.2 Etiologija.....	9
1.1.3 Patogeneza	11
1.1.4 Klinička slika.....	11
1.1.5 Radiološka dijagnostika	12
1.1.6 Histološka dijagnostika	15
1.1.7 Liječenje	16
1.2 REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE I SLOBODNI RADIKALI	17
1.2.1 Antioksidacijska obrana od RKV	20
1.2.1.1 Superoksid dismutaza (SOD)	22
1.2.1.1.1 Bakar, cink superoksid dismutaza (CuZnSOD)	23
1.2.1.1.2 Mangan superoksid dismutaza (MnSOD)	23
1.2.1.2 Glutation peroksidaza (GPx)	24
1.2.1.3 Katalaza (KAT).....	25
1.2.2 Oksidacijski stres	25
1.2.2.1 Lipidna peroksidacija.....	27
1.2.2.1.1 Inicijacija	28
1.2.2.1.2 Propagacija.....	29
1.2.2.1.3 Terminacija.....	29
1.2.3 Bolesti povezane s djelovanjem slobodnih radikala	30
1.3 SUSTAV CITOKROMA P450	33
1.3.1 Uvod	33
1.3.2 Uloga P450 u metabolizmu lipida.....	35
1.3.3 P450 i oksidacijski/antioksidacijski procesi.....	35
1.3.4 Polimorfizam u sustavu P450	36
1.3.5 Učinci bolesti na ekspresiju i regulaciju P450	37
1.3.6 Sustav P450 i karcinogeneza	38
1.3.6.1 Egzogene i endogene tvari u karcinogenezi i njihova veza sa sustavom P450 .	39

1.3.6.2	Ekspresija P450 u novotvorinama	40
1.4	KRATKI OSVRT NA DOSADAŠNJA SAZNAJNA O EPIDEMIOLOGIJI I ETIOLOGIJI KARCINOMA BUBREGA.....	41
2	SVRHA ISTRAŽIVANJA	43
2.1	HIPOTEZA	43
2.2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	43
3	MATERIJALI I METODE.....	45
3.1	BOLESNICI	45
3.1.1	Kliničko-patološke karakteristike bolesnika s karcinomom bubrega	47
3.2	POSTUPCI PRIPREME I ANALIZE UZORAKA	48
3.2.1	Priprema tkiva bubrega	48
3.2.2	Određivanje aktivnosti AOE u homogenatu tkiva bubrega	50
3.2.2.1	Određivanje aktivnosti tSOD, CuZnSOD i MnSOD	50
3.2.2.2	Određivanje aktivnosti KAT	52
3.2.2.3	Određivanje aktivnosti GPx	53
3.2.3	Određivanje koncentracije proteina u homogenatu tkiva bubrega	54
3.2.4	Određivanje koncentracije TBARS u homogenatu tkiva bubrega	54
3.2.5	Određivanje koncentracije MDA u plazmi i homogenatima tkiva bubrega metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC).....	56
3.2.6	Određivanje ekspresije gena različitih izoformi P450 te MnSOD i CuZnSOD u homogenatima tkiva bubrega	57
3.2.6.1	Izolacija RNK iz tkiva bubrega.....	57
3.2.6.2	Određivanje koncentracije i kvalitete RNK.....	58
3.2.6.3	Reverzna transkripcija	59
3.2.6.4	Analiza ekspresije gena za P450.....	60
3.2.6.5	Analiza ekspresije gena za MnSOD i CuZnSOD.....	62
3.2.7	Western blot za MnSOD i CuZnSOD proteine.....	63
3.2.7.1	SDS elektroforeza (SDS-PAGE)	63
3.2.7.2	Prijenos proteina sa gela na membranu	65
3.2.7.3	Otkrivanje proteina specifičnim antitijelima	66
3.3	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	68

4	REZULTATI	69
4.1	UTJECAJ POVIŠENOG KRVNOG TLAKA NA LPO I AKTIVNOST AOE U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA.....	69
4.2	UTJECAJ PREKOMJERNE TJELESNE TEŽINE NA LPO I AKTIVNOST AOE U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA.....	70
4.3	LPO U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA ..	71
4.4	LPO U PLAZMI ZDRAVIH LJUDI I OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA.....	73
4.5	AKTIVNOST AOE U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA	74
4.5.1	Aktivnost tSOD	74
4.5.2	Aktivnost CuZnSOD i MnSOD	75
4.5.3	Aktivnost GPx	77
4.5.4	Aktivnost KAT	78
4.6	EKSPRESIJA GENA ZA CuZnSOD I MnSOD U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA.....	79
4.7	KOLIČINA CuZnSOD I MnSOD PROTEINA U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA.....	81
4.8	EKSPRESIJA GENA RAZLIČITIH P450 IZOFORMI U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA	83
4.8.1	Ekspresija gena u homogenatima zdravog tkiva	83
4.8.2	Ekspresija gena u homogenatima priležećeg tkiva	84
4.8.3	Ekspresija gena u homogenatima neoplastičnog tkiva	85
4.8.4	Učestalost promjene u ekspresiji P450 gena između homogenata zdravog, priležećeg i neoplastičnog tkiva bubrega	86
5	RASPRAVA	90
6	ZAKLJUČCI	99
7	KRATKI SADRŽAJ	102
8	SUMMARY	104
9	POPIS LITERATURE	105
10	ŽIVOTOPIS	120

POPIS OZNAKA I KRATICA

AOE - antioksidacijski enzimi

ATP - adenzin trifosfat

BMI - indeks tjelesne mase

CT - kompjutorizirana tomografija

CuZnSOD; SOD1 - bakar, cink superoksid dismutaza

CYP - citokrom

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ECSOD; SOD3 - izvanstanična superoksid dismutaza

FNA biopsija - aspiracijska biopsija tankom iglom

GPx - glutation peroksidaza

GSH - glutation

GSSG - glutation disulfid

HIF - hipoksija inducibilni faktor

H₂O₂ - vodikov peroksid

HNO₂ - dušična kiselina

HOCl - hipoklorna kiselina

HU - Hounsfieldove jedinice

IL-1 - interleukin-1

IL-2 - interleukin-2

IL-6 - interleukin-6

IFN- α - interferon α

IV - intravenski

KAT - katalaza

L• - lipidni radikal

LO• - alkoksilni radikal

LOO• - peroksilni radikal

LOOH - lipidni hidroperoksid

LPO - lipidna peroksidacija

MDA - malondialdehid

MnSOD; SOD2 - manganova superoksid dismutaza
MR - magnetska rezonancija
NADPH oksidaza - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaza
 NO^\bullet - dušični oksid
 NO_2^\bullet - dušični dioksid
 O_2^\bullet - superoksidni anion
 O_3 - ozon
 OH^\bullet - hidroksilni radikal
 ONOO^- - peroksinitrit
P450 - citokrom P450 monooksigenaza
PAH - policiklički aromatski ugljikovodici
PCR - lančana reakcija polimerazom
PET - pozitronska emisijska tomografija
RDV - reaktivne dušikove vrste
RKV - reaktivne kisikove vrste
RNK - ribonukleinska kiselina
RT-PCR - lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu
SEM - standardna pogreška
SOD - superoksid dismutaza
TBARS - tiobarbiturno reaktivne supstance
TNF- α - čimbenik nekroze tumora α
tSOD - ukupna superoksid dismutaza
UZV - ultrazvuk
VHL gen - Von Hippel Lindau gen
VHL sindrom - Von Hippel Lindau sindrom
WHO - Svjetska zdravstvena organizacija
8-OH-dG - 8-hidroksi-2-deoksigvanozin
 $^1\text{O}_2$ - singletni kisik
4-HNE - 4-hidroksi-2-nonenal

1 UVOD

1.1 KARCINOM BUBREGA

1.1.1 Epidemiologija

Karcinom bubrega čini 2-3% svih karcinoma¹. Najveća incidencija karcinoma bubrega zabilježena je u Zapadnim zemljama. U zadnja dva desetljeća opažen je godišnji porast incidencije od oko 2% u Europi i ostalim dijelovima svijeta, iako je u Danskoj i Švedskoj opaženo kontinuirano smanjenje incidencije^{2,3}. Prema podacima NCI's SEER Cancer Statistics Review od 2003.g. do 2007.g. stopa incidencije karcinoma bubrega i bubrežne nakapnice bila je 14.1/100 000 stanovnika, stopa smrtnosti 4.1/100 000 stanovnika, a srednja dob dijagnosticiranja 64 godine⁴. Do prije dvadesetak godina u Europi su opažene povećane stope smrtnosti od karcinoma bubrega. Nakon 90tih godina prošlog stoljeća stope smrtnosti se općenito stabiliziraju ili smanjuju⁵, ali u nekim europskim zemljama (Estonija, Grčka, Hrvatska, Irska, Slovačka) i nadalje pokazuju trend povećanja⁵.

1.1.2 Etiologija

Karcinom bubrega najčešće nastaje sporadično. Rizičnim čimbenicima u nastanku karcinoma bubrega smatraju se prekomjerna tjelesna težina, pušenje, povišeni krvni tlak, uznapredovala bolest bubrega, dugotrajna dijaliza, rad u industriji željeza, čelika i nafte, izloženost štetnim tvarima poput azbesta, kadmija, organskih otapala i određenih herbicida, ali određeni specifični karcinogeni do sada nisu utvrđeni. Rizik za nastanak karcinoma bubrega postoji i obzirom na polimorfizam gena za detoksikacijske enzime, primjerice gena za glutation S transferazu i

citokrom (CYP) P450⁶. Do sada je opisano nekoliko nasljednih sindroma povezanih s nastankom karcinoma bubrega⁷. Oni uključuju:

- Von Hippel Lindau sindrom (VHL sindrom) koji se povezuje s povećanim rizikom za nastanak karcinoma bubrega tipa svijetlih stanica, posebice u mlađoj životnoj dobi. VHL sindrom uzrokovan je mutacijama u VHL genu koji se nalazi na kromosomu 3p25.
- Nasljedni papilarni karcinom bubrega povezan s razvojem jednog ili više karcinoma bubrega papilarnog tipa, ali bez povećanog rizika za razvitak novotvorina u drugim dijelovima tijela. Utvrđene su promjene u nizu gena, najčešće u MET onkogenu.
- Sindrom nasljedne leiomiomatoze i karcinoma bubrega obilježen razvojem leiomioma maternice i kože te većim rizikom nastanka karcinoma bubrega papilarnog tipa. Genetski poremećaj je u fumarat hidrataza genu koji djeluje kao tumor supresor.
- Birt-Hogg-Dube sindrom karakteriziran razvojem dobroćudnih novotvorina kože uz povećani rizik za razvoj različitih vrsta novotvorina bubrega (uključivo razne tipove karcinoma i onkocitoma) te povećanom sklonosti nastanka dobroćudnih ili zloćudnih novotvorina u drugim tkivima. Gen povezan s ovim sindromom je folikulin koji djeluje kao tumor supresor.
- Konstitucionalnu translokaciju 3p kromosoma koja je vrlo rijetki poremećaj obilježen povećanom sklonosti nastanka karcinoma bubrega tipa svijetlih stanica.

Osobe koje u obitelji imaju pojedinca oboljelog od karcinoma bubrega (bez drugih nasljednih sindroma) također imaju 2-4 puta veći rizik za razvoj bolesti. Rizik je najveći kod braće i sestara. Nije utvrđeno je li povećani rizik posljedica zajedničke genetske podloge ili utjecaja okoline ili njihovog zajedničkog djelovanja. Iako ne postoji vjerodostojna pretpostavka potkrijepljena znanstvenim dokazima koja bi objasnila etiološku povezanost s patogenezom karcinoma bubrega, smatra se da rekreativno

vježbanje i "zdrav" način života mogu umanjiti rizik nastanka ove novotvorine⁸.

1.1.3 Patogeneza

Gubitak funkcije VHL gena zabilježen je u 60 do 80% slučajeva sporadičnog karcinoma bubrega tipa svijetlih stanica. VHL gen izražen je u raznim tkivima ljudi i nejasno je zašto su određeni organi podložni razvitku neoplazme kada je VHL gen mutiran, a većina ostalih organa nije. U sporadičnom karcinomu bubrega oba alela VHL gena su inaktivirana stečenim mutacijama, dok je u VHL sindromu jedna mutacija naslijeđena. VHL gen djeluje kao tumor supresor. Proteinski proizvod VHL gena sastoji se od 213 aminokiselina, a odgovoran je za ubikvitinaciju hipoksija inducibilnog faktora (HIF) i njegovu poslijedičnu razgradnju u proteasomu. Pretpostavlja se da HIF regulira 100 do 200 gena. U hipoksičnim uvjetima ili u slučaju poremećene funkcije VHL gena ili proteina dolazi do nakupljanja HIF koji se veže za specifične sekvence deoksiribonukleinske kiseline (DNK) te transkripcijski aktivira niz gena uključenih u prilagodbu na hipoksiju, uključujući gene povezane s eritropoezom, angiogenezom, unosom i metabolizmom glukoze, kontrolom pH vrijednosti i kontrolom izvanstaničnog matriksa⁹.

1.1.4 Klinička slika

Karcinom bubrega u ranom stadiju najčešće ne uzrokuje znakove ili simptome. Klasična trijada boli, makrohematurije i palpabilne mase danas je rijetka pojava (6-10% bolesnika)¹⁰. Paraneoplastični sindromi nalaze se u oko 30% bolesnika sa simptomatskim karcinomom bubrega i najčešće uključuju povišeni krvni tlak, kaheksiju, gubitak na tjelesnoj težini, povišenu tjelesnu temperaturu, anemiju, ubranu sedimentaciju eritrocita i drugo¹¹. U vrijeme postavljanja dijagnoze oko 50% bolesnika ima bolest

ograničenu na bubreg. Lokalno invazivna bolest (širenje zloćudne promjene izvan bubrega) nalazi se u oko 25% bolesnika, a ostalih 25% ima metastatsku bolest¹². Najčešće metastaze karcinoma bubrega nalaze se u plućima, jetri, kostima i mozgu. Pri dijagnosticiranju karcinoma bubrega važni koraci uključuju uzimanje anamneze, klinički pregled bolesnika, laboratorijske pretrage krvi i urina, citološki pregled urina, radiološke slikovne metode te u odabranim slučajevima biopsiju sumnjive promjene.

1.1.5 Radiološka dijagnostika

Danas se više od 50% karcinoma bubrega otkriva slučajno slikovnim metodama u tijeku dijagnostičke obrade raznih nespecifičnih simptoma^{13,14}. Najčešći način otkrivanja i karakterizacije novotvorina bubrega je putem ultrazvuka (UZV), kompjutorizirane tomografije (CT) ili magnetske rezonancije (MR). Slikovne dijagnostičke metode su nezamjenjive u karakterizaciji zloćudnih novotvorina bubrega i ukoliko postoji klinička sumnja na karcinom postižu točnost od preko 95%⁷. CT i MR smatraju se najprikladnijim slikovnim metodama za obradu i praćenje bolesnika s karcinomom bubrega te za određivanje TNM stadija bolesti. Prilikom CT i MR pregleda primjenjuje se intravenski (IV) kontrastno sredstvo kako bi se procijenila postkontrastna imbibicija promjene jer je ona važan kriterij za razlikovanje zloćudnih od dobroćudnih novotvorina¹⁵. Tijekom CT pretrage postkontrastna imbibicija promjene određuje se usporedbom apsorpcijskih vrijednosti u Hounsfieldovim jedinicama (HU) prije i nakon davanja IV kontrastnog sredstva, a značajnom imbibicijom smatra se porast koeficijenta apsorpcije od 20HU ili više¹⁶. Preporučeni protokol za CT pregled kod sumnje na karcinom bubrega obavezno uključuje nativnu (prije IV primjene kontrastnog sredstva) i parenhimsku fazu (nakon IV primjene kontrastnog sredstva) tijekom koje se zloćudna promjena najčešće imbibira slabije od bubrežnog parenhima. U protokol

se može uključiti i arterijska faza (za procjenu odnosa patološke promjene s krvnim žilama) te ekskrecijska faza (za procjenu odnosa patološke promjene s kanalnim sustavom bubrega)¹⁷. CT abdomena najčešće omogućava postavljanje radiološke dijagnoze karcinoma bubrega i pruža podatke o bubrežnoj i izvanbubrežnoj proširenosti bolesti, zahvaćanju venskih struktura (bubrežna vena, donja šuplja vena, desni atrij), funkciji i morfologiji kontralateralnog bubrega, stanju regionalnih limfnih čvorova te prisutnosti metastaza u ostalim abdominalnim strukturama i organima. MR abdomena koristi se kao jednakovrijedna, ali i dodatna metoda za procjenu bubrežnih novotvorina. MR pregled vršimo kada narav promjene i njezina proširenost nisu jasno određeni CT pregledom, a od velike je važnosti i za određivanje venskog širenja u nejasnim slučajevima^{18,19}. MR pregled je također indiciran u bolesnika s alergijom na IV primjenu jodnih kontrastnih sredstava²⁰, u trudnica²¹ i djece²². Karcinom bubrega može morfološki izgledati i kao cistična promjena, a zloćudni potencijal se određuje prema Bosniak klasifikaciji²³ (Tablica 1).

Tablica 1. Bosniak klasifikacija cističnih promjena bubrega.

Kategorija	Morfološke karakteristike promjene	Priroda promjene; terapijska preporuka
I	Jednostavna cista tankog zida, bez septa, kalcifikata ili solidnih dijelova. Cista je koeficijenata apsorpcije tekućine i postkontrastno se ne imbibira.	Dobročudna
II	Cista koja može sadržavati nekoliko tankih septa i nježnih kalcifikata u zidu ili septama. Promjena visokih, ali jednolično visokih koeficijenata apsorpcije < 3 cm, oštro ograničena i postkontrastno se ne imbibira.	Dobročudna
IIF	Ciste koje imaju više tankih septi. Cista sa minimalnom postkontrastnom imbibicijom tanke septe ili zida ciste. Cista sa minimalnim zadebljanjem septe ili zida ciste. Cista sa nodularnim i debelim kalcifikatima, ali bez postkontrastne imbibicije. Cista ne smije sadržavati mekotkivne elemente koji se postkontrastno imbibiraju. Intrarenalne promjene visokih koeficijenata apsorpcije koje se postkontrastno ne imbibiraju ≥ 3 cm. Ove promjene su općenito oštro ograničene.	Mali postotak promjena je zloćudan; praćenje
III	Neodređene cistične mase koje imaju zadebljale, nepravilne septe ili zidove i kod kojih se može opaziti postkontrastna imbibicija.	Zloćudne u > 50% slučajeva; operativni zahvat ili praćenje
IV	Promjene sa mekotkivnim elementima koji se postkontrastno imbibiraju.	Većina promjena su zloćudne; operativni zahvat

UZV abdomena može otkriti više od 85% novotvorina većih od 3 cm i do 60% novotvorina manjih od 2 cm¹⁷. UZV abdomena s IV primjenom kontrastnog sredstva može biti od pomoći u specifičnim slučajevima (poput kroničnog zatajenja bubrega sa relativnom kontraindikacijom za primjenu IV kontrastnog sredstva na bazi joda ili gadolinija)^{24,25}. Također, doppler UZV može se primjeniti za procjenu zahvaćanja venskih struktura neoplastičnim trombom²⁶. Važnost pozitronske emisijske tomografije (PET) i PET/CT u postavljanju dijagnoze i praćenju bolesnika s karcinomom bubrega još nije određena i za sada PET/CT ne ulazi u

standardnu obradu bolesnika^{27,28}. Ostale slikovne metode (poput native snimke urotakta, intravenske pijelografije, bubrežne arteriografije i venografije) u postavljanju dijagnoze karcinoma bubrega imaju ograničenu vrijednost. Za procjenu proširenosti osnovne bolesti u plućni parenhim najtočnija pretraga je CT toraksa, ali u bolesnika niskog rizika za metastatsku bolest najčešće se koristi standardna snimka torakalnih organa. Proširenost osnovne bolesti u kosti i mozak rutinski se ne određuje već se specifične slikovne pretrage rade u slučaju pojave kliničkih i laboratorijskih znakova i simptoma. Biopsija karcinoma bubrega sve se češće koristi u dijagnostici i praćenju bolesnika, a indicirana je u bolesnika sa metastazama prije početka sistemske terapije²⁹ te prije ablative terapije. Primjenjuje se aspiracijska biopsija tankom iglom (FNA biopsija) ili core biopsija čime se nastoji odrediti postoji li zloćudna bolest te kojeg je tipa i gradusa prema Fuhrmanu. Pozitivna predvidiva vrijednost slikovnih metoda toliko je visoka da nalaz biopsije ne mijenja terapijski pristup³⁰. Rezultati istraživanja pokazuju da core biopsija najčešće ima visoku osjetljivost i specifičnost za otkrivanje zloćudne bolesti, iako u 10-20% slučajeva core biopsijom nije moguće postaviti dijagnozu karcinoma bubrega^{31,32}.

Za određivanje proširenosti bolesti odnosno stadija zloćudne novotvorine bubrega kliničari najčešće koriste TNM sustav kojeg održava American Joint Committee on Cancer i International Union for Cancer Control. Proširenost zloćudne novotvorine u vrijeme dijagnosticiranja najznačajniji je čimbenik za određivanje načina i procjenu ishoda liječenja³³, ali važne prognostičke podatke sadrži i tip karcinoma bubrega te nuklearni gradus prema Fuhrmanu³⁴.

1.1.6 Histološka dijagnostika

Histološka dijagnoza karcinoma bubrega postavlja se nakon kirurškog odstranjenja ili biopsije promjene. Karcinom bubrega je najčešća solidna

promjena unutar bubrega, a obuhvaća različite tipove karcinoma sa specifičnim histopatološkim i genetskim karakteristikama³⁵. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) postoji najmanje 3 glavna histološka tipa karcinoma bubrega: svijetlih stanica (80-90%), papilarni (10-15%) i kromofobni (4-5%)³⁴. Papilarni tip karcinoma bubrega može se nadalje podijeliti u dva različita podtipa, tip 1 i tip 2 koji imaju različiti klinički tijek. Sva tri glavna histološka tipa karcinoma bubrega čine oko 85-90% zloćudnih novotvorina bubrega. Ostalih 10-15% uključuje razne rijetke sporadične i obiteljske karcinome te skupinu neklasificiranih karcinoma³⁴.

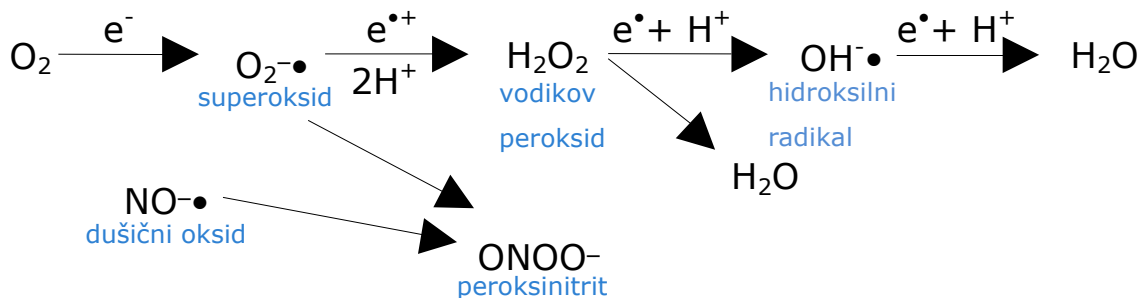
1.1.7 Liječenje

Glavni oblik liječenja karcinoma bubrega je operativno odstranjenje novotvorine. Operativno odstranjenje zloćudne promjene može imati povoljnih učinaka čak i u bolesnika s metastatskim širenjem. Operativni zahvat može se učiniti kao radikalna nefrektomija (odstranjenje bubrega, nadbubrežne žlijezde te masnog tkiva uz bubreg) ili parcijalna nefrektomija (odstranjenje zloćudne novotvorine s dijelom okolnog bubrežnog tkiva). Preostale mogućnosti liječenja uključuju krioterapiju, radiofrekventnu ablaciju, ablaciju mikrovalovima, laserom ili UZV valovima visoke energije, arterijsku embolizaciju, radioterapiju, kemoterapiju. Ciljana terapija često se koristi kao početna terapija u liječenju uznapredovalog karcinoma bubrega, a uključuje lijekove koji zaustavljaju angiogenezu ili ciljaju druge važne stanične faktore rasta. Ciljana terapija može usporiti rast karcinoma bubrega ili smanjiti neoplastičnu masu, ali za sada nije dokazano da može dovesti do izliječenja bolesnika. Najvažniji lijekovi koji se koriste u imunoterapiji karcinoma bubrega su citokini od kojih se najčešće koriste interleukin-2 (IL-2) i interferon- α (IFN- α). Oba navedena citokina u 10-20% bolesnika uzrokuju smanjenje veličine zloćudne novotvorine za više od 50%²⁷.

1.2 REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE I SLOBODNI RADIKALI

Prije 2×10^6 godina pojavom prvih modrozelenih algi povećala se količina kisika u atmosferi. Prisustvo kisika u atmosferi dalo je životu na Zemlji prednosti i nedostatke. Jedna od prednosti aerobnih organizama je stvaranje i iskorištavanje znatno veće količine energije za obavljanje životnih funkcija u odnosu na anaerobne organizme. Međutim, aerobni metabolizam povezan je sa toksičnim djelovanjem kisika oksidacijom osnovnih bioloških molekula. Naime, tijekom metabolizma kisika u organizmu stvaraju se kao proizvodi reaktivne kisikove vrste (RKV) koje uključuju niz kemijski reaktivnih molekula. RKV čine slobodni radikali, ioni i peroksidi, bilo organski ili anorganski. Biološki važni pripadnici RKV su superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) i hidroksilni radikal (OH^{\cdot}). RKV sačinjavaju i reaktivne molekule koje nisu slobodni radikali, poput vodikovog peroksida (H_2O_2), ozona (O_3), singletnog kisika (1O_2) i hipoklorne kiseline ($HOCl$). Ukoliko se nespareni elektron nalazi na atomu dušika govori se o reaktivnim dušikovim vrstama (RDV) poput dušičnog oksida (NO^{\cdot}) ili dušičnog dioksida (NO_2^{\cdot}). U RDV ubrajaju se i reaktivne molekule kao dušična kiselina (HNO_2) i peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) koje nisu radikali. Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona koji su odgovorni za nestabilnost i reaktivnost svih radikala. Prema naboju radikali mogu biti pozitivni, negativni ili neutralni. Iako je većina slobodnih radikala organske, mogu biti i neorganske prirode. Jednom stvoreni slobodni radikal može izazvati niz lančanih reakcija reagirajući s drugim manje reaktivnim vrstama. Zbog visoke kemijske reaktivnosti slobodni radikali lako stupaju u reakciju međusobno ili sa drugim molekulama pri čemu nespareni elektroni stvaraju kemijske veze, oslobađa se energija, a sustav prelazi u niže energetske stanje. Uz mogućnost stvaranja kovalentne veze, slobodni radikali mogu reagirati s biomolekulama i na brojne druge načine. Karakteristične reakcije slobodnih radikala su: davanje elektrona (s reducirajućeg radikala), primanje elektrona (na oksidirajući radikal), oduzimanje vodika, reakcija adicije, reakcija

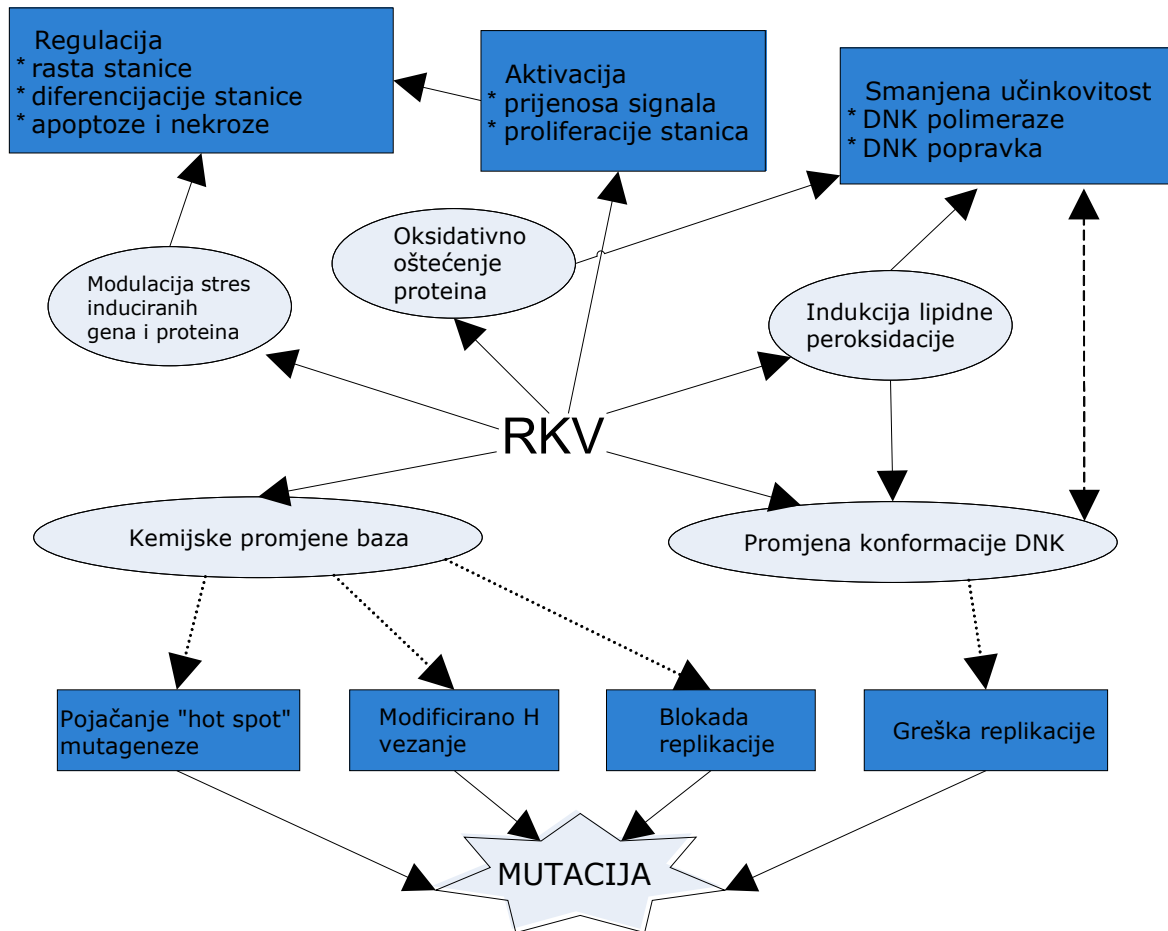
poništanja, reakcija disproporcionalnosti (Slika 1). Enzimi koji su sposobni stvarati RKV su brojni, a uključuju citokrome P450 (P450), različite oksidaze, peroksidaze, lipooksigenaze i dehidrogenaze. Djelovanje slobodnih radikala je zbog njihove vrlo velike reaktivnosti ograničeno na supstrate iz najbliže okoline. Srednji polumjer difuzije slobodnih radikala vrlo je malen (manji od 100 nm), a poluživot u biološkim sustavima najčešće nekoliko mikrosekundi.



Slika 1. Put redukcije kisika i nastanka slobodnih radikala.

Većinu slobodnih radikala u organizmu čine RKV. Izvori RKV u stanicama mogu biti endogeni i egzogeni. RKV i slobodni radikali neprestano se endogeno stvaraju u organizmu tijekom metaboličkih procesa, prvenstveno u procesima fosforilacije. Karakteristični egzogeni načini stvaranja slobodnih radikala su djelovanje ultravioletnog i ionizirajućeg zračenja, ozon, stres, određeni lijekovi (poput kemoterapeutika), opijati, alkohol, herbicidi, kemijski onečišćivači (sastojci smoga, duhanski dim), a može biti i hrana (posebice masna hrana, hrana koja sadrži užeglu mast, sušeno meso)³⁶. Niske razine RKV su blagotvorne ili čak nužne u procesima kao što su fagocitoza, regulacija enzimske aktivnosti u mitohondrijima, modulacija aktivnosti redoks osjetljivih transkripcijskih faktora i neophodne su u određenim procesima kao što su prenošenje unutarstaničnih poruka, proliferacija, apoptoza, imunost, embriogeneza³⁷. Premda su slobodni radikali u organizmu obično prisutni u vrlo niskoj

koncentraciji (10^{-5} - 10^{-9} mola), u višim koncentracijama pokazuju i toksične učinke. Visoka razina RKV u stanici dovodi do stanja oksidacijskog stresa koji može biti uzrok različitim metaboličkim poremećajima i oštećenju bioloških makromolekula - DNK, proteina i lipida^{38,39,40}. Oštećenje bioloških makromolekula može dovesti do promjena u staničnoj strukturi i funkciji, a time pridonijeti oštećenju obrambenog sustava i sustava za popravak organizma što dovodi do daljnje neravnoteže u redoks sustavu i gubitka homeostaze. Prema tome, RKV u stanicama mogu imati dvojako djelovanje. Primjerice, RKV mogu djelovati kao sekundarni glasnici u unutarstaničnom signalnom nizu koji omogućava zadržavanje onkogenog genotipa i indukciju onkogenog fenotipa, ali isto tako mogu djelovati antikarcinogeno poticanjem starenja i/ili apoptoze (Slika 2). Podaci iz literature pokazuju da se do 4% ukupnog kisika uključenog u proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijima troši na stvaranje RKV^{41,38} pa se mitohondriji smatraju glavnim izvorom njihova nastajanja. RKV se neprekidno stvaraju u mitohondrijskom dišnom lancu, preko ciklooksigenaznog puta te staničnih enzima kao što su nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaža (NADPH oksidaža), lipooksigenaza i enzimski sustav citokroma P450^{42,43,44}. Jedan od važnih izvora nastanka RKV je i citoplazma zbog prisustva riboflavina, ksantin oksidaze te prijelaznih metala (željezo, bakar). Plazmatske membrane stvaraju superoksidni anion putem NADPH oksidaze dok glatka endoplazmatska mrežica stvara RKV preko reakcija koje uključuju P450 enzime. Endogena reakcija granulocita na patogene organizme također može biti izvor nastanka RKV i slobodnih radikala. Primjerice, kao odgovor na patogeni organizam granulociti izlučuju enzim mijeloperoksidazu koja katalizira reakciju u kojoj se stvara značajna koncentracija HOCl i uništava patogeni organizam. Osim toga, pri kontaktu s patogenim organizmom u fagocitnim stanicama odvija se "respiratorni prasak" karakteriziran povećanom potrošnjom kisika i stvaranjem RKV za čije je stvaranje direktno odgovoran membranski sustav NADPH oksidaze⁴⁵.

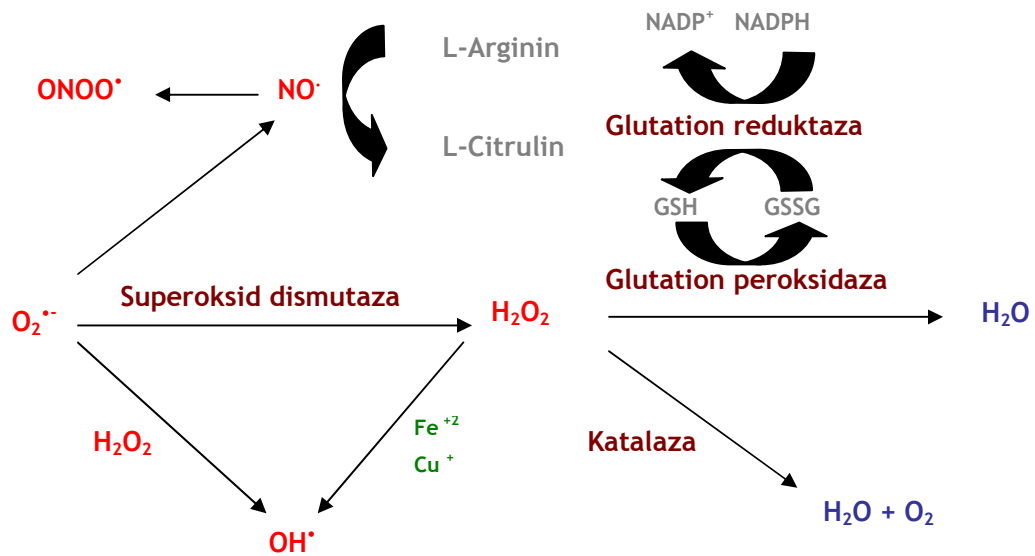


Slika 2. Učinak RKV na stanice.

1.2.1 Antioksidacijska obrana od RKV

Održavanje homeostaze oksidacijsko/antioksidacijskog stanja je preduvjet aerobnog života. Tijekom evolucije razvilo se više mehanizama zaštite od djelovanja RKV koji obuhvaćaju regulaciju stvaranja RKV, poništavanje djelovanja RKV (antioksidansi) ili pak popravak nastalih oštećenja. Antioksidacijski sustav enzima predstavlja prvu liniju antioksidacijske zaštite dok neenzimski "čistači" čine drugu liniju obrane organizma. Antioksidansi su tvari koje sprječavaju oksidacijske procese i smanjuju ili onemogućavaju oksidaciju supstrata čak i ako su prisutni u značajno nižim koncentracijama od oksidiranog supstrata^{46,47}. Prije se smatralo da

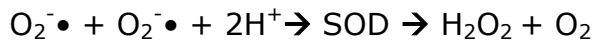
antioksidansi značajno utječu na procese u oboljelom organizmu jer se pretpostavljalo da slobodni radikali ili RKV pridonose progresiji bolesti⁴⁸. Danas sve više istraživanja ukazuje na povećano stvaranje slobodnih radikala kao posljedicu oštećenja bolesnog tkiva ili djelovanja toksina⁴⁹ te da RKV mogu imati i zaštitnu ulogu⁵⁰. Pod pretpostavkom da RKV ponekad mogu imati zaštitnu ulogu, primjena antioksidansa može biti čak i štetna⁵¹. Važno je napomenuti da postoje i uvjeti u kojima određeni antioksidansi mogu djelovati prooksidativno, a što prvenstveno ovisi o njihovoj koncentraciji⁵². Antioksidacijski sustav enzima (Slika 3) vrlo je složen i sastoji se od primarnih enzimskih antioksidacijskih sustava kao što su superoksid dismutaza (SOD, katalizira dismutaciju $O_2^- \bullet$), glutathion peroksidaza (GPx, odstranjuje H_2O_2 i sprječava stvaranje $OH^- \bullet$) i katalaza (KAT, odstranjuje H_2O_2 razgradnjom u vodu i kisik) te sekundarnih enzimskih antioksidacijskih sustava (glutathion reduktaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, glutathion, glutaredoksin, peroksiredoksin i tioredoksin). U biološkim sustavima antioksidansi odstranjuju slobodne radikale najčešće katalitičkim putem, kao čistači ili u obliku proteina koji umanjuju valjanost prooksidansa, primjerice iona metala ili dr. Antioksidansi mogu pomoći i antioksidacijsku regeneraciju. Primjerice koenzim Q10 regenerira vitamin E, lipoična kiselina regenerira vitamin E, vitamin C, koenzim Q10 i glutathion čime se sprječava oštećenje lipidnog sloja staničnih membrana. Iako se većina antioksidansa stvara endogeno, neki se primjenjuju egzogeno kao dodaci hrani ili im je hrana izvor. Egzogeni antioksidansi su vitamin E, vitamin C, β -karoten (prethodnik vitamina A), likopen iz rajčice te flavonoidi iz voća, vina ili čaja. Vitamin C odstranjuje RKV, RDV i jedan je od glavnih antioksidansa u plazmi. Inhibitor lančane reakcije slobodnih radikala u procesu lipidne peroksidacije (LPO) je vitamin E dok vitamin A vrlo učinkovito uklanja singletni kisik (1O_2)⁵².



Slika 3. Sustav antioksidacijskih enzima.

1.2.1.1 Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza (EC 1.15.1.1) je protein (metaloenzim) neophodan u zaštiti od toksičnog djelovanja RKV koji se stvaraju tijekom metabolizma. Nalazi se u prokariotskim i eukariotskim stanicama⁵³. SOD razgrađuje visoko reaktivni slobodni radikal $O_2^{\bullet-}$ u manje reaktivni H_2O_2



U ljudi se pojavljuju tri oblika SOD: citosolna s dinuklearnim kofaktorom bakar, cinkom (CuZnSOD; SOD1), mitohondrijska s mononuklearnim kofaktorom manganom (MnSOD; SOD2) i izvanstanična SOD (ECSOD; SOD3). Navedeni enzimi razlikuju se po građi, smještaju unutar stanice, rasprostranjenosti i aktivnosti u tkivima kao i mehanizmima koji djeluju na njihovu ekspresiju. Transkripcijska regulacija sve tri izoforme SOD je strogo kontrolirana ovisno o unutar i vanstaničnim uvjetima. SOD su enzimi od iznimnog farmakološkog značaja zbog sprječavanja patoloških stanja uzrokovanih oksidacijskim oštećenjem. Aktivnost SOD određuje se

najčešće spektrofotometrijski, no može se odrediti i metodom pulsirajuće radiolize kao i imunohistokemijskim metodama.

1.2.1.1.1 Bakar, cink superoksid dismutaza (CuZnSOD)

Enzim nastaje transkripcijom gena koji se u čovjeka nalazi na 21. kromosomu. CuZnSOD sadrži homodimer koji je sastavljen od dvije identične podjedinice od kojih svaka u aktivnom mjestu sadrži metal bakra i cinka, a podjedinice su povezane sa uobičajenim ligandom (His 61). Bakar u aktivnom mjestu enzima omogućava odvijanje katalitičke aktivnosti, a cink stabilizaciju prostorne konformacije. Enzim je nađen u svim tkivima čovjeka, u plazmi, eritrocitima, a značajnu aktivnost pokazuje u bubrezima, nadbubrežnoj žlijezdi, jetri i srcu. Stoga su i mnoge bolesti povezane s promjenom funkcije ovog enzima koji je vrlo stabilan i otporan na djelovanje proteaza. CuZnSOD je konstitutivno eksprimiran, ali se može inducirati raznim fiziološkim i ne fiziološkim stanjima (mehanički, kemijski i biološki poticaji) pri čemu dolazi do značajnog povećanja razine CuZnSOD mRNA. Transkripcija CuZnSOD gena može biti i potisnuta u uvjetima hipoksije ili nakon djelovanja antitumorskih lijekova poput mitomicina C.

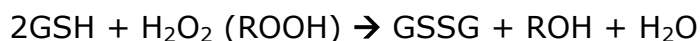
1.2.1.1.2 Mangan superoksid dismutaza (MnSOD)

Gen za MnSOD smješten je u čovjeka na 5. kromosomu. MnSOD je homotetramer koji sadrži 2 do 4 atoma mangana u aktivnim mjestima enzimskih podjedinica i prisutan je kod svih aerobnih organizama. MnSOD je eksprimiran u različitim tipovima stanica kao i različitim tkivima (bubrezima, nadbubrežnoj žlijezdi, srcu i jetri), a ekspresija ovisi o unutarstaničnim i vanjskim čimbenicima. Primjerice, ekspresija je potaknuta citokinima (TNF- α , IFN γ , IL-1, IL-4, IL-6) koji su snažni aktivatori transkripcije MnSOD. Antitumorski lijekovi kao što su vinkristin, taksol ili vinblastin također mogu putem aktivacije protein kinaze C

potaknuti ekspresiju MnSOD⁵⁴. Međutim, ekspresija MnSOD u mnogim novotvorinama može biti i značajno smanjena. MnSOD ekspresija nije regulirana samo na razini transkripcije, nego i na razini translacije putem MnSOD RNK vezujućeg proteina⁵⁵.

1.2.1.2 Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza (EC 1.11.1.9) je tetramer sa četiri podjedinice od kojih svaka sadrži po jedan atom selena u obliku selenocisteina, a koji tvori aktivno mjesto enzima. Enzim u prisustvu reduciranog glutathiona (supstrat) najčešće katalizira reakciju redukcije H₂O₂ uključujući i lipidni hidroperoksid.



Sustav glutathion peroksidaze odgovoran je za razgradnju najvećeg dijela H₂O₂ u stanici. Glutation reduktaza uz pomoć NADPH regulira reducirani



Tkiva s najvećom koncentracijom GPx su jetra i bubrezi, u umjerenj količini prisutna je u srcu, plućima i mozgu, a u maloj količini u mišićima. Unutar stanice aktivnost GPx u jezgri nije zabilježena dok je visoka aktivnost prisutna u mitohondrijima i citosolu.

Do sada je opisano 7 oblika GPx: citosolna GPx (GPx-1), gastrointestinalna GPx (GPx-2), izvanstanična GPx (GPx-3), fosfolipidna hidroperoksid GPx (GPx-4), epididimis sekrecijska GPx (GPx-5), GPx-6, GPx-7. Različite izoforme enzima različito su raspoređene po tkivima. Do sada nije otkriveno zbog čega postoji toliko oblika GPx, no budući hidroperoksidi imaju, osim toksične i korisnu ulogu kao molekule uključene u prijenos unutarstaničnih poruka⁵⁶ ovi enzimi vjerojatno imaju ulogu u održavanju odgovarajuće fiziološke razine hidroperoksida kako bi stanice mogle nesmetano obavljati svoje funkcije^{57,58}.

1.2.1.3 Katalaza (KAT)

Gen za katalazu (EC 1.11.1.6) se u čovjeka nalazi na 11. kromosomu. Katalaza je antioksidacijski enzim (AOE) sastavljen od četiri podjedinice od kojih svaka u aktivnom mjestu sadrži željezo. Takvo aktivno mjesto enzima omogućuje detoksikaciju raznih alkohola, fenola kao i H₂O₂. Poznata su tri izoenzimski oblika (A, B, C) koji nastaju posttranslacijskom modifikacijom ishodišnog proteina. Osnovna uloga KAT je razgradnja H₂O₂ putem katalaznog

$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ i/ili peroksidaznog oblika reakcije

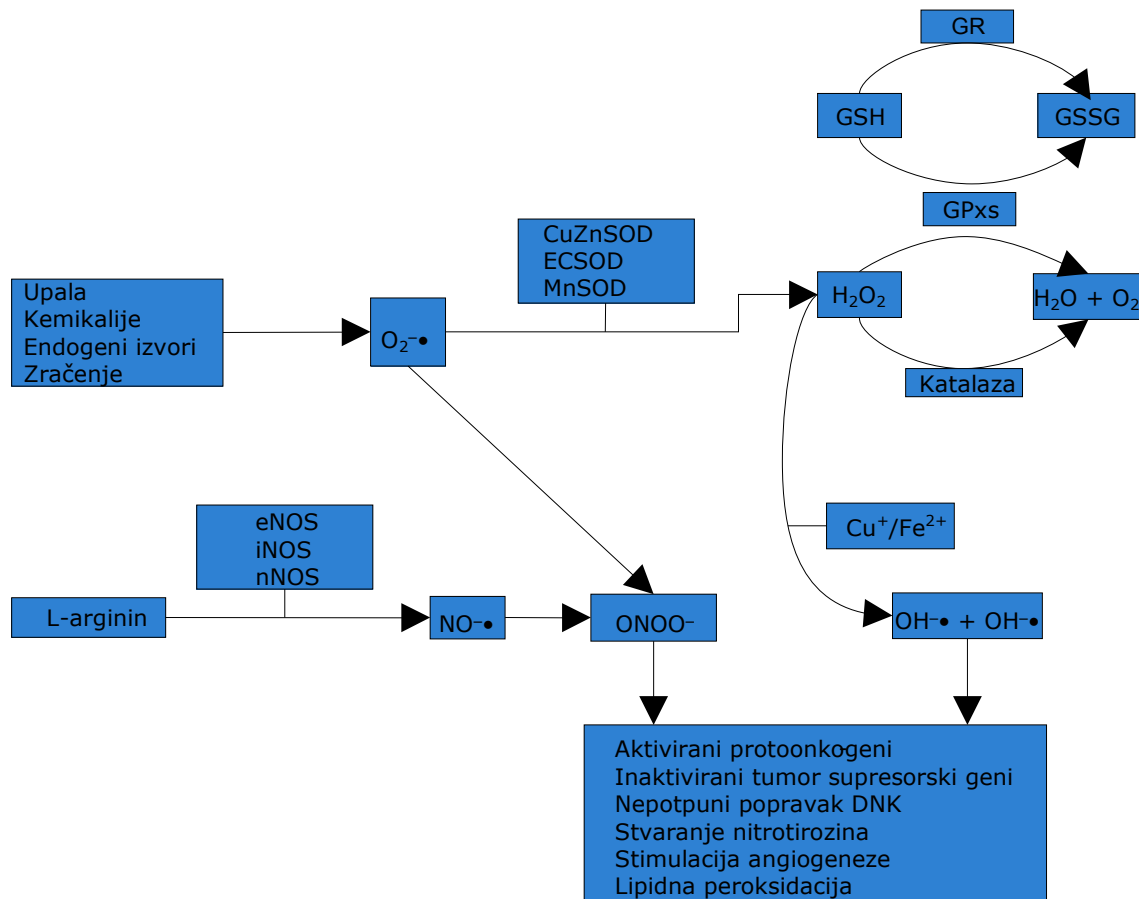
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{R}$ (R je H-donirajući supstrat).

Glavnu ulogu u odstranjivanju malih količina H₂O₂ ima GPx. Katalazna aktivnost očituje se tek pri većim koncentracijama H₂O₂ što upućuje da je KAT isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa. Najveća koncentracija KAT nalazi se u jetri i eritrocitima dok je manja koncentracija nađena u skeletnim mišićima, srcu, slezeni i mozgu. U stanici enzim ima najveću koncentraciju u peroksisomima, prisutan je u citosolnoj frakciji, a u mitohondrijima je prisutan u malim koncentracijama ili ga uopće nema. KAT je eksprimirana konstitutivno, međutim još nije poznato da li je ekspresija KAT inducirana oksidansima ili citokinima.

1.2.2 Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u oksidacijsko /antioksidacijskom statusu organizma u korist oksidacijskog stanja koje može dovesti do oštećenja tkiva i organa⁵⁹. Aerobni život obilježen je stalnim stvaranjem oksidansa čija je razina pod neprekinutim nadzorom antioksidacijskih zaštitnih mehanizama. Antioksidacijska zaštita odvija se u organizmu trajno čime se sprječava nakupljanje oksidacijskih oštećenja i održava ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidansa. Međutim, kada se ravnoteža u oksidacijsko/antioksidacijskom statusu

organizma pomakne u korist oksidansa, u organizmu nastaje stanje oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres nastaje ili zbog povećanog nastanka slobodnih radikala ili smanjene antioksidacijske zaštite. Stanice mogu do određene razine podnijeti stanje oksidacijskog stresa povećanjem sinteze antioksidansa. Duže trajanje stanja oksidacijskog stresa može, među ostalim, dovesti do inaktivacije proteina, aktivacije određenih gena, oksidacijskog oštećenja staničnih struktura i tkiva što omogućuje razvoj novotvorina i drugih bolesti^{42,60}. Na molekularnoj razini slobodni radikali mogu modificirati proteine, oštetiti DNK i transkripciju gena te započeti lančanu reakciju peroksidacije lipida (Slika 4). U slučaju oštećenja proteina nastaju oksidirani oblici koji se najčešće brzo uklanjaju kao funkcionalno neaktivni, ali se mogu i postepeno nakupljati te pridonijeti oštećenjima koja se povezuju s različitim bolestima poput šećerne bolesti, ateroskleroze, raznih neurodegenerativnih bolesti³⁸. RKV mogu oksidirati DNK baze. Oksidirani oblik DNK nastao djelovanjem RKV ima za posljedicu nastanak mutacija i mogućnost razvoja zloćudnih novotvorina te drugih bolesti. Oksidacijskim promjenama naročito je podložna mitohondrijska DNK jer nije zaštićena histonima (što je slučaj sa jezgrinom DNK), a nalazi se u okruženju koje se smatra glavnim izvorom RKV⁶¹. Lipidi su sastavni dio staničnih membrana i imaju važnu strukturalnu i funkcionalnu ulogu u stanici. Reakcijom RKV s lipidima započinje proces LPO koji mijenja i oštećuje lipidnu molekularnu strukturu. Osim toga, LPO je glavni izvor ostalih citotoksičnih proizvoda, primjerice malondialdehida (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE) koji su biološki aktivni i mogu djelovati na razne stanične komponente i enzime.

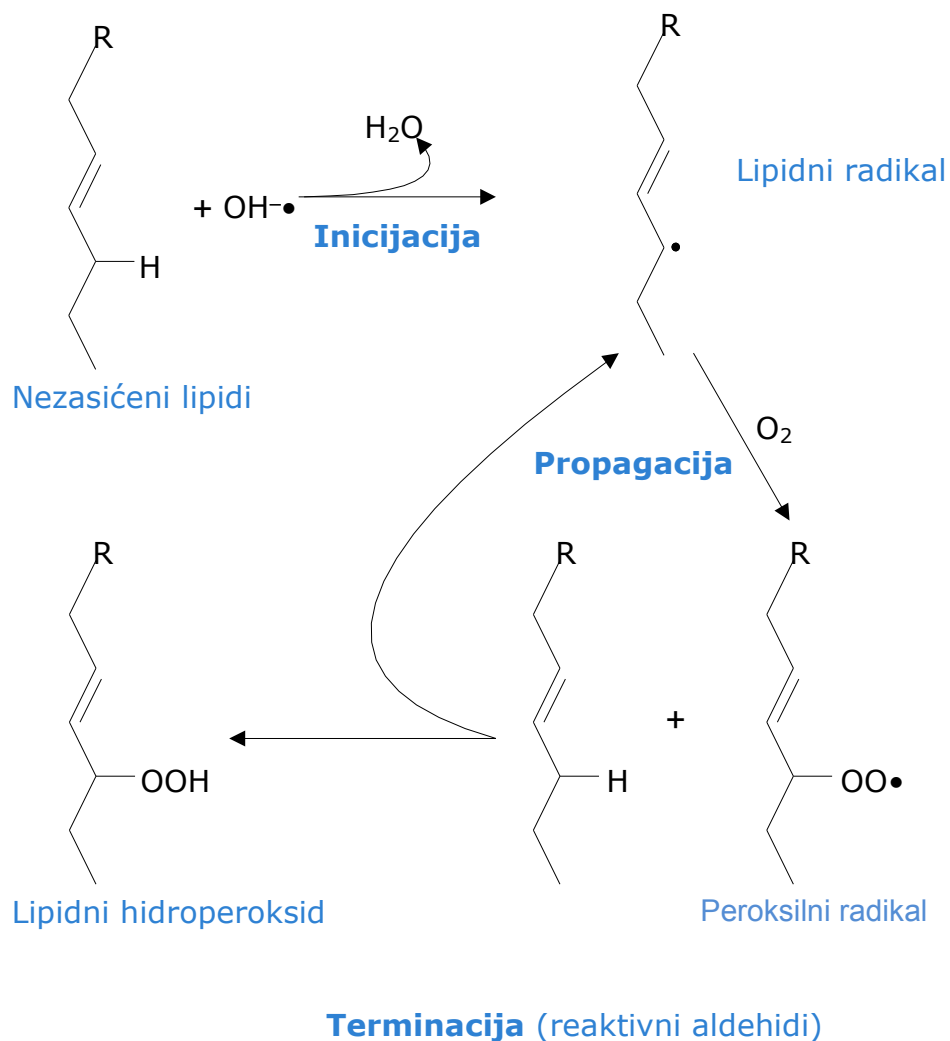


Slika 4. Učinci prooksidacijskog stanja.

1.2.2.1 Lipidna peroksidacija

Slobodni radikali nastali u krvi i tkivima mogu izazvati oksidaciju na višestruko nezasićenim masnim kiselinama koje sadrže visoko reaktivne dvostruke veze. Time započinje proces LPO. Zasićene masne kiseline su kemijski stabilne dok kod nezasićenih masnih kiselina brzina oksidacije raste s povećanjem stupnja nezasićenosti. Lipidi u biološkim sustavima sadrže višestruko nezasićene masne kiseline u obliku fosfolipida, estera, triacilglicerola, kolesterola, slobodnih masnih kiselina tako da se LPO potaknuta slobodnim radikalima nesmetano odvija i u fiziološkim uvjetima⁶². LPO zahvaća sve biološke membrane gdje 30-80% masenog udjela čine lipidi, a preostali dio čine ugljikohidrati (0-10%) te proteini

(20-60%). U životinjskim stanicama peroksidirane membrane gube svoju propusnost, postaju rigidne i nefunkcionalne⁶³. Proces LPO pokrenut slobodnim radikalima odvija se lančanom reakcijom u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 5).



Slika 5. Faze lipidne peroksidacije.

1.2.2.1.1 Inicijacija

Reakciju inicijacije najčešće pokreće (OH^\bullet), no može se pokrenuti i pomoću peroksilnog radikala (LOO^\bullet), alkoksilnog radikala (LO^\bullet) te

lipidnog radikala ($L\bullet$)⁶⁴. Inicijaciju LPO može potaknuti i singletni kisik te ionizirajuće zračenje.

1.2.2.1.2 Propagacija

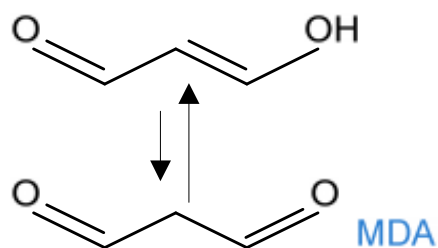
Lipidni radikal, proizvod oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina može brzo reagirati s kisikom tvoreći tako peroksilni radikal. Oduzimanjem vodika iz druge nezasićene masne kiseline, peroksilni radikal stvara lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi lipidni radikal. Nastali lipidni hidroperoksid stvara nove radikale što rezultira dodatnim grananjem lančane reakcije. Ovaj ciklus koji nazivamo propagacijom može se ponavljati. Uz dovoljno kisika i neoksidiranih lipida mala količina slobodnih radikala nastala u fazi inicijacije dovest će do obnavljanja lipidnih hidroperoksida koji s prijelaznim metalima pospješuju proces LPO.

1.2.2.1.3 Terminacija

Proces LPO završava u fazi terminacije. Terminacija LPO može nastati u reakciji sa slobodnim radikalima ili djelovanjem antioksidansa.

Tijekom procesa LPO nastaje niz različitih spojeva. Primarni proizvodi LPO se razgrađuju i daju niz sekundarnih proizvoda poput aldehida, molekula s epoksi, alkoholnom ili keto skupinom te molekula s kombinacijom ovih skupina. Glavni proizvodi LPO u biološkim uzorcima su MDA, 4-HNE te srodni α - i β -nezasićeni aldehidi. Ti spojevi imaju i naziv "drugi toksični glasnici" jer mogu potaknuti nastanak novih slobodnih radikala. Iako su manje reaktivni od slobodnih radikala, reaktivni aldehidi su vrlo štetni uslijed dugog vremena raspada i širenja krvotokom³⁶. MDA (Slika 6) prolazi kroz staničnu membranu i može izazvati oštećenja na udaljenim mjestima od mjesta stvaranja. Djelovanjem na stanične membrane uzrokuje nastanak lipofuscina (žutosmeđi pigment koji se nakuplja tijekom starenja)⁶⁵. Osim s lipidima, MDA može reagirati i s proteinima mijenjajući njihova biokemijska svojstva. Smatra se da MDA može reagirati i s nekim

nukleozidima. Najviše MDA nalazi se u mikrosomima jetre gdje nastaje peroksidacijom nezasićenih masnih kiselina s dvije ili više dvostrukih veza (poput linolenske ili arahidonske kiseline). MDA se vrlo brzo metabolizira u tkivu sisavaca pri čemu može nastati malonska kiselina koja je kompetitivni inhibitor sukcinat dehidrogenaze u mitohondriju⁶⁵.



Slika 6. Struktura malondialdehida.

4-HNE je reaktivni aldehyd mjerljiv i u fiziološkim uvjetima, specifičan jer se može vezati za proteine s kojima tvori stabilne i biološki aktivne konjugate. Njegova prisutnost, kao i prisutnost MDA, zapažena je u nizu patoloških stanja kao što su novotvorine, ateroskleroza, šećerna bolest, razne neurodegenerativne i autoimune bolesti, ali i tijekom starenja⁶⁶.

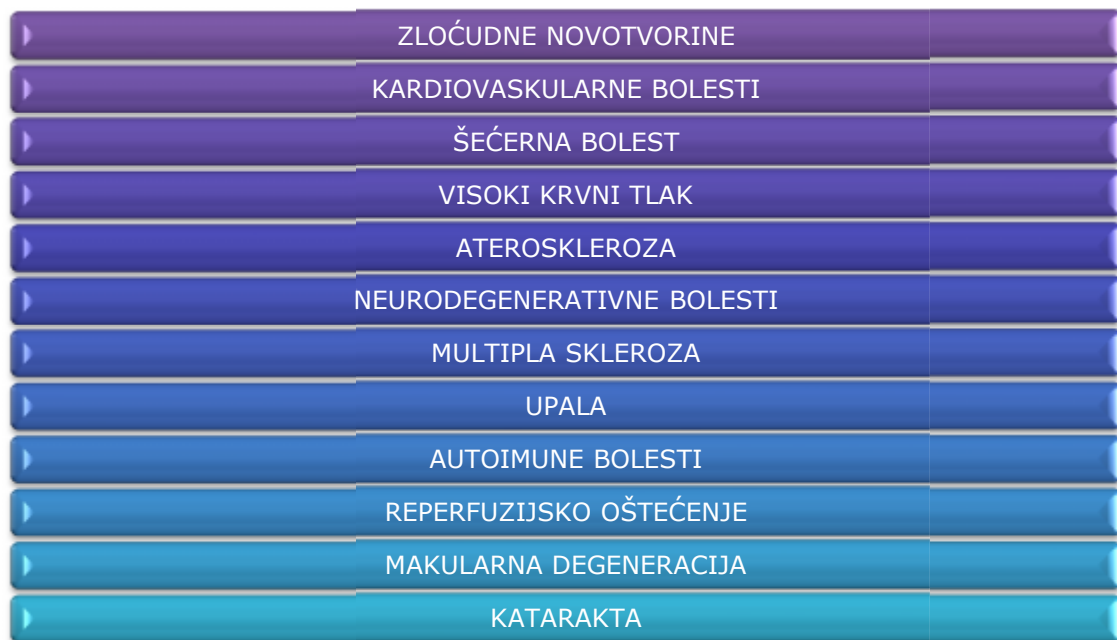
1.2.3 Bolesti povezane s djelovanjem slobodnih radikala

Oksidacijski stres uzrokuje oštećenja osnovnih bioloških molekula i povezan je s nastankom niza bolesti (Slika 7). Međutim, to ne znači da je oksidacijski stres glavni uzrok bolesti. Porast razine slobodnih radikala može biti i sekundaran u procesu razvitka bolesti. Proizvodi LPO mogu oštetiti proteine membrana koja zbog toga postaje fluidnija ili čak izgubi cjelovitost. Poznato je da LPO i oksidacija proteina mogu promijeniti funkcije stanice djelovanjem na membrane mitohondrija, endoplazmatsku mrežicu ili sarkolemu. RKV izazvano oštećenje proteina može utjecati na promjene u aktivnosti enzima, oštećenje transportnih puteva kroz

stanične membrane i međudjelovati s receptorima što narušava fiziološko stanje u stanicama. Oksidacija proteina može biti uzrok nastanku autoantitijela, time i autoimunih procesa. Slobodni radikali mogu oštetiti DNK izravno i posredno, primjerice smanjenjem sinteze proteina koji sudjeluju u popravku DNK. Konačno, pretpostavka starenja djelovanjem slobodnih radikala predlaže da starenje nastaje uslijed nakupljanja oštećenja u stanicama djelovanjem slobodnih radikala, posebice nakupljanja oštećenja mitohondrijske DNK.

Proces LPO u kojem slobodni radikali kemijski reagiraju s nezasićenim masnim kiselinama staničnih membrana i lipoproteinima može dovesti do oštećenja krvnih žila, ateroskleroze, bolesti srca, šećerne bolesti i dr. Toksičnost oksidacijskih proizvoda, narušena ravnoteža kalcijevih iona, mutacije mitohondrijske DNK i smanjenje stanične energije (adenozin trifosfat, ATP) doprinosi patogenezi oštećenja srca (smanjenje kontraktilnosti, aritmije i dr.)⁶⁷. Oksidacijske promjene i razgradnja lipoproteina u stijenci krvnih žila mogu započeti upalni proces koji je bitan za razvoj ateroskleroze. Ozon, dušikov dioksid, sumporni dioksid kao i drugi toksini prisutni u zagađenom zraku, a osobito pušenje cigareta mogu udisanjem oštetiti pluća⁶⁸. Pušenje cigareta može povećati razinu slobodnog željeza u krvi i započeti reakcije nastanka slobodnih radikala. U kroničnim plućnim bolestima (astma, azbestoza, cistična fibroza) nađena je povećana razina pokazatelja oksidacijskog stresa. Iako navedeni pokazatelji nisu uzrok nastalih patoloških procesa, oni doprinose daljnjem razvitku bolesti. Mozak je posebice osjetljiv na hipoksiju i oksidacijska oštećenja zbog velike potrošnje kisika po gramu tkiva, visokog sadržaja lipida i niske razine antioksidansa⁴⁶. Neurotransmiteri su također podložni oksidacijskim promjenama. Oksidacijski stres putem produkata LPO koji su vrlo toksični za proteine i DNK može oštetiti neurone i stanice glije, slično ostalim tkivima u organizmu. Postoji niz pokazatelja da RKV sudjeluju u patogenezi ishemičnog, toksičnog i imunološki posredovanog oštećenja bubrega. RKV uzrokuju LPO membrana staničnih tvorbi i

membrana stanice te time poremećaj strukturne cjelovitosti, sposobnosti stvaranja energije i transporta u stanici, posebice u proksimalnom tubulu bubrega. U eksperimentalno izazvanom imunološki posredovanom glomerulonefritisu RKV se stvaraju putem polimorfonuklearnih leukocita i monocita iz krvi, ali i putem glomerularnih, pretežno mezangijskih stanica. Stvaranje RKV dovodi do morfoloških oštećenja i promjene glomerularne propusnosti za proteine. Također, RKV dovode do smanjenja glomerularnog protoka krvi i glomerularne filtracije putem otpuštanja vazokonstriktorskih spojeva (prostaglandina, tromboksana i aktivirajućeg faktora trombocita), a moguće i putem inaktivacije dušičnog oksida koji djeluje vazodilatatorno⁶⁹.



Slika 7. Patološka stanja povezana s djelovanjem slobodnih radikala.

1.3 SUSTAV CITOKROMA P450

1.3.1 Uvod

Sustav citokroma P450 čine enzimi koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika, uključujući i karcinogene i lijekove, ali imaju i vrlo važnu ulogu kao endogeni čimbenici u metabolizmu lipofilnih spojeva kao što su kolesterol i steroidni hormoni. U eukariotskim stanicama P450 proteini su prisutni kao membranski hemoproteini od kojih svaki sadrži oko 500 aminokiselina sa željezo protoporfirinom IX kao prostetičkom skupinom. Ono što razlikuje P450 od ostalih hemoproteina je tiolna skupina iz cisteina koja je ligand za željezo u hemu dok je u ostalih hemoproteina to dušik iz imidazolne skupine histidina. P450 proteini prvi puta se spominju 1958.g. u radovima Martina Klingenberga⁷⁰. Do danas je sekvencionirano i klonirano oko 1000 gena za različite P450 proteine, a Coon i sur.⁷¹ su opisali najmanje 40 tipova reakcija koje kataliziraju proteini sustava P450. Nomenklatura P450 temelji se na imenovanju sa CYP iza kojeg slijedi broj koji označava gensku obitelj (više od 40% identičnosti u slijedu aminokiselina), slovo koje označava podobitelj (više od 55% identičnosti u slijedu aminokiselina) i broj gena. Geni koji su označeni istim brojem moraju imati istu funkciju i 97% identičnosti u slijedu aminokiselina.

P450 proteini su široko rasprostranjeni u živim organizmima, a njihov broj se razlikuje ovisno o vrsti. Izolirani su iz gotovo svih organa ljudskog tijela: jetre, tankog crijeva, bubrega, nadbubrežnih žlijezdi, pluća, mozga, prostate, testisa, maternice i placente, ali različita tkiva eksprimiraju različite izoforme P450 u različitim količinama. Iako su P450 proteini rasprostranjeni ubikvitarno, u oksidaciji supstrata P450 proteini jetre imaju važnu ulogu, najvećim djelom uslijed konstitucionalne ekspresije i znatno veće količine u odnosu na ostale organe (Tablica 2).

Tablica 2. Relativna količina (omjer mRNK P450/ β aktin) mRNK za P450 proteine u jetri i bubregu⁷².

P450	JETRA	BUBREG
CYP1A1	0,0594	0,000239
CYP1A2	4,77	0,000021
CYP1B1	0,00578	0,0139
CYP2C9	3,11	0,00295
CYP2C19	0,187	0,0000148
CYP2D6	0,559	0,00607
CYP2E1	53,8	0,0115
CYP3A4	2,32	0,00688

Postoje P450 proteini relativno visoke specifičnosti koji kataliziraju metabolizam ograničenog broja supstrata (kao što su steroidni spojevi ili masne kiseline) dok drugi P450 proteini imaju vrlo veliki raspon supstrata na koje djeluju. Oksidacijom lijekova posredstvom različitih izoformi P450 proteina mogu nastati različiti metaboliti. Neki lijekovi se pretežito oksidiraju posredstvom jednog specifičnog P450 proteina te su stoga u metabolizmu takvih lijekova izrazito važni procesi indukcije i inhibicije enzima. Većina proizvoda P450 oksidacije je farmakološki inaktivna, ali postoje i oksidirani oblici koji su farmakološki aktivni (npr. diazepam se oksidira u nordiazepam i oksazepam koji također imaju sedativno djelovanje). Proizvodi djelovanja P450 proteina ponekad mogu biti reaktivni metaboliti s citotoksičnim djelovanjem (paracetamol).

Usprkos uvriježenoj činjenici da u ljudi spol ne utječe na ekspresiju P450 (za razliku od miševa i štakora) Parkinson i sur.⁷³ utvrdili su da se neke izoforme P450 proteina, uz veliku interindividualnu različitost u ekspresiji (čak više od 40 puta) razlikuju u ekspresiji i među spolovima. To se

prvenstveno odnosi na CYP1A1 (manja ekspresija u žena) i CYP3A4 (veća ekspresija u žena). Neke kliničke studije provedene u ljudi različitih rasa (bijelaca, hispanika i afrikanaca) pokazale su da žene imaju nižu CYP1A1 aktivnost od muškaraca, iako mišljenja o spolnoj razlici u aktivnosti P450 proteina još nisu usklađena. U starijoj životnoj dobi se aktivnost pojedinih izoformi P450 proteina poput CYP1A2, CYP2D6 i CYP2E1 smanjuje⁷³.

1.3.2 Uloga P450 u metabolizmu lipida

U posljednje vrijeme naša saznanja o ulozi lipida u biološkim sustavima značajno su se promijenila. Pored nedvojbene uloge lipida kao gradbenih čimbenika staničnih membrana, niz istraživanja ukazao je na njihovu ulogu posrednika u transmembranskom prijenosu poruka, staničnoj diferencijaciji, diobi i apoptozi. Funkcionalna uloga P450 proteina u metabolizmu arahidonske kiseline otkrivena je prvi puta 1976.g. u istraživanju koje je pokazalo da agregacija ljudskih trombocita može biti spriječena P450 inhibitorima⁷⁴.

1.3.3 P450 i oksidacijski/antioksidacijski procesi

Indukcija ekspresije gena za pojedine P450 proteine povezuje se sa biljezima oksidacijskog oštećenja u stanicama. Neki P450, posebice CYP2E1, CYP1A1 i CYP1A2 stvaraju reaktivne vrste u odsutnosti supstrata i tako mogu stvoriti stanje oksidacijskog stresa u stanicima⁷⁵. Pojačana aktivacija P450 izoformi dovodi do stvaranja RKV što modulira oksidacijsko/antioksidacijski status stanice te ovisno o spolu i starosti može utjecati na pojavu spontanih tumora. P450 tijekom oksido-redukcijskih procesa stvaraju radikale $O_2^- \cdot$ i H_2O_2 . Stupanj oksido-redukcije razlikuje se kod pojedinih izoformi P450 proteina, a CYP2E1 smatra se najaktivnijim u navedenom procesu. U ljudi upalni procesi i infekcije utječu na ekspresiju različitih izoformi P450 i u jetri i u

ekstrahepatičkim organima poput bubrega ili mozga⁷⁶. Upalni citokini najčešće smanjuju ekspresiju gena za P450 proteine pri čemu nastaje manje produkata arahidonske kiseline te se smanjuje protuupalno djelovanje⁷⁶. P450 proteini utječu i na aktivnost nekih AOE. Primjerice, u stanicama u kojima je pojačano eksprimiran CYP2E1 smanjena je aktivnost GPx za 30%⁷⁷.

1.3.4 Polimorfizam u sustavu P450

Polimorfizam postoji kada se u populaciji određene vrste javljaju dva ili više različitih fenotipova. Polimorfizam se može opaziti na razini gena za enzim (genotip) ili funkcije enzima (fenotip). Genetske razlike mogu uzrokovati povišenu ili sniženu aktivnost enzima, potpunu inhibiciju enzima, ali mogu biti i bez učinka na aktivnost. Pri istraživanju lijekova posebna pažnja pridaje se lijekovima s "uskim terapijskim prozorom" tj. lijekovima kod kojih male razlike u dozi imaju ili terapijski ili toksični učinak. Farmakološko, odnosno toksikološko djelovanje lijeka ovisi o njegovom metabolizmu, a polimorfizam je vjerojatno glavni uzrok interindividualnim i interetničkim razlikama u metabolizmu i toksičnosti lijekova. Farmakogenetski polimorfizam nastaje kada se alelna varijanta pojavljuje u frekvenciji većoj od 1% u zdravoj populaciji, a uzrokuje različiti odgovor na lijek. U sustavu P450 proteina opisan je fenotipski ili genotipski polimorfizam kod CYP1A1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP2E1. CYP3A4 ima veliku interindividualnu varijabilnost, ali za sada ne postoje podaci koji bi ukazivali na mogući genetski polimorfizam tog citokroma. Čini se da je tijekom evolucije najviše izmijenjen CYP2D6, a najmanje CYP2E1. Podaci o povezanosti polimorfizma sustava P450 i karcinogeneze su oskudni⁷⁸. Citokromi koji se povezuju s karcinogenezom poput CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1 i CYP3A4 su tijekom evolucije relativno malo izmijenjeni i manje funkcionalno polimorfni, za razliku od CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 kod kojih su opisani klinički najznačajniji

polimorfizmi. Polimorfizam CYP1B1 gena povezuje se s povećanim rizikom za razvoj različitih novotvorina⁷⁹. Polimorfizam CYP2D6 ovisi o rasnoj pripadnosti, tako 5-10% populacije bijelaca slabo odgovara na lijekove koji se metaboliziraju putem CYP2D6 dok je taj postotak u azijske rase 0-1%, a u afrikanaca vrlo individualan i iznosi od 0-19%. Fenotipske studije CYP2C19 pokazale su da je polimorfan u 2-6% bijelaca i 1.5-7.5% afrikanaca. Iako je polimorfizam CYP2C19 znatno slabije istražen od CYP2D6 (dijelom zato što je manji broj lijekova podložan metabolizmu sa CYP2C19), CYP2C19 je osobit jer 20% azijata nema taj enzim. Za CYP1A1 fenotipski polimorfizam opisan je u 10% bijelaca čiji limfociti pokazuju znatno višu CYP1A1 aktivnost kada se izlože poticaju.

1.3.5 Učinci bolesti na ekspresiju i regulaciju P450

Povezanost sustava P450 sa oboljenjima jetre utvrđena je prije niz godina⁸⁰, ali tek prije 10-tak godina ispitivanja su pokazala i molekularnu osnovu promjena koje se uglavnom odnose na smanjenje ukupne količine P450 proteina u jetri. Promjene količine P450 proteina u ekstrahepatičkim tkivima pokazale su se također značajnima u oboljenjima poput ateroskleroze, povišenog krvnog tlaka, karcinoma. Potrebno je razlikovati promjene u ukupnoj količini P450 proteina od promjena u pojedinim izoformama P450. U ljudi su značajne promjene ukupne količine P450 proteina opažene samo u uznapredovalim stadijima oboljenja jetre, a najčešće su opažene u CYP1A1 i CYP1A2 na razini smanjene transkripcije, translacije i aktivnosti proteina. CYP3A4 je kvantitativno najvažniji enzim u ljudskoj jetri. Značajan je u oksidaciji lijekova jer je odgovoran za metabolizam oko 50% lijekova koji se primjenjuju u kliničkoj praksi^{81,82}. U bolesnika s cirozom jetre smanjena je i količina i aktivnost CYP3A4. Endogena regulacija CYP2E1 slična je glukoneogenim enzimima, a uključuje smanjenu ekspresiju gena u dobro uhranjenom organizmu te povišenu ekspresiju u gladovanju i šećernoj bolesti^{83,84}. Kontrola

ekspresije CYP2E1 je vrlo složena i uključuje transkripcijsku, translacijsku i posttranslacijsku razinu. Primjerice, primjena inzulina u diferenciranim Fao hepatoma stanicama kod kemijski izazvane šećerne bolesti uzrokuje smanjenje razine CYP2E1 proteina ograničavanjem brzine transkripcije (30%) i ubrzanjem obrtaja mRNA⁸⁵. Poznato je da upalni posrednici poput endotoksina (lipopolisaharid), čimbenika nekroze tumora α (TNF- α), interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) i interferona smanjuju ekspresiju niza P450 poput CYP1A1, CYP2B, CYP3A, CYP2C11 i drugih^{86,87}. IL-2 u kulturi hepatocita čovjeka smanjuje aktivnost CYP3A izoforme⁸⁸. Neki hormoni također značajno utječu na ekspresiju P450. Hormon rasta smanjuje ekspresiju CYP3A2 u jetri štakora⁸⁹ dok u kulturi hepatocita čovjeka povećava ekspresiju CYP3A4⁹⁰.

1.3.6 Sustav P450 i karcinogeneza

Sustav P450 ima važnu ulogu u karcinogenezi jer djeluje na veliki broj supstrata. Neki P450 su prisutni u populaciji u genotipskim varijantama s odgovarajućim fenotipskim promjenama o čemu ovisi osjetljivost pojedinca na karcinogene i terapiju protutumorskim lijekovima. Većina se kemijskih prokarcinogena, kako egzogenih (ksenobiotici) tako i endogenih (steroidni hormoni), biotransformira u aktivne oblike kako bi postali karcinogeni, a ulogu biotransformatora imaju upravo P450 proteini. Najvažnije izoforme u metaboličkoj aktivaciji prokarcinogena su CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1 i CYP3A4. Sustav P450 uključen je i u biotransformaciju citostatika koji se koriste u terapiji zloćudnih novotvorina, a može smanjiti ili povećati učinkovitost lijeka. Podložnost razvoja novotvorina i polimorfizam u sustavu P450 ispitivana je u nizu istraživanja. Iako postoje podaci koji ukazuju na određeni stupanj povezanosti, za sada nema čvrstih dokaza o uzročno-posljedičnoj vezi između ksenobiotika, polimorfizma u sustavu P450 i razvitka karcinoma⁸¹.

1.3.6.1 Egzogene i endogene tvari u karcinogenezi i njihova veza sa sustavom P450

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) čiji je prototip benzopiren visoko su toksični organski zagađivači. PAH metaboličkom aktivacijom postaju izrazito mutageni, karcinogeni i teratogeni, kako u ljudi tako i u životinja. Glavni metabolički put aktivacije PAH posredovan je sustavom P450. CYP1A1 uključen je u metaboličku aktivaciju benzopirena transformacijom u epoksid. Benzopiren epoksid može se dalje oksidirati s epoksid hidrolazama oblikujući benzopirenske dihidrodiole. CYP1A1 u daljnjem slijedu reakcija katalizira nastanak dihidrodiol epoksida koji je izrazito karcinogen^{91,92}.

Za bioaktivaciju PAH u ekstrahepatičkim tkivima potrebna je aktivacija P450 proteina i to naročito CYP1A1 i CYP1B1⁹³. Istraživanjem četrnaest P450 izoformi otkriveno je da CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 i CYP2C19 kataliziraju PAH značajno sporije nego CYP1A1 dok su drugi proteini kao CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7 i CYP4A11 bili gotovo inaktivni u aktivaciji PAH⁹¹. Dim cigarete sadrži brojne PAH, a ustanovljeno je da pušači imaju gen za CYP1A1 šest puta više eksprimiran od gena za CYP1B1, ali da su oba gena eksprimirana u samo 10% nepušača. CYP2E1 može metabolizirati etil-, metil-, butil- i benzil nitrozamine, od kojih su neki također sastavni dio dima cigareta. Druga skupina kemijskih karcinogena, heterociklički amini, također podliježu bioaktivaciji putem hidrolize posredovane P450 proteinima. U bioaktivaciju su prvenstveno uključeni CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, iako u procesu sudjeluju i CYP3A4 te CYP3A5.

Endogena tvar koja se najčešće povezuje s karcinogenezom je prirodni estrogen (estron, estradiol, estriol). Oksidoredukcijskim procesima tijekom metabolizma estrona mogu nastati tri metabolita: 2-hidroksi estron, 4-hidroksi estron i 16 α -hidroksi estron. Djelovanjem CYP1A1 nastaje 2-hidroksi metabolit koji nije povezan s karcinogenezom. Nastanak 16 α -hidroksi estrona u ljudi pod utjecajem je CYP3A4 i CYP3A5. 16 α -hidroksi

estron je mutageni metabolit jer se kovalentno veže za DNK i time uzrokuje genotoksično oštećenje^{94,95}. Nastanak 4-hidroksi metabolita estrogena katalizira CYP1B1, a povezuje se s karcinomom dojke^{96,97}.

1.3.6.2 Ekspresija P450 u novotvorinama

Razlika u količini i prisutnoj izoformi P450 proteina u zdravom i neoplastičnom tkivu mogla bi imati važnu ulogu u liječenju bolesnika. Povećana količina P450 proteina u neoplastičnom tkivu u odnosu na zdravo tkivo mogla bi omogućiti povećanu osjetljivost i selektivnost na lijekove koji se metaboliziraju putem specifičnog P450 proteina, a što podupiru i in vitro istraživanja na MCF-7 staničnim linijama karcinoma dojke u ljudi. Transfekcija MCF-7 stanične linije sa CYP2B1 povećala je osjetljivost karcinomskih stanica na ciklofosfamid i ifosfosfamid⁹⁸. Murray je 1997.g. pokazao prisutnost CYP1A u 51%, a CYP3A u 28% neoplastičnih tkiva bolesnika oboljelih od karcinoma želuca, a u zdravom tkivu njihovo prisustvo nije dokazano⁹⁹. U karcinomu dojke se prema pojedinim autorima ekspresija gena za CYP1B1 javlja isključivo u neoplastičnom tkivu dok je prema drugim autorima otkrivena i u neoplastičnom i u zdravom tkivu^{100,101}. McFayden je 2004.g. utvrdio prisutnost CYP1B1 u neoplastičnom tkivu 70% bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega, a pritom gen nije bio eksprimiran u zdravom tkivu bubrega¹⁰². Istraživanje aktivnosti CYP1A1 u tkivu karcinoma bubrega i makroskopski zdravom tkivu uz karcinom pokazala su da je aktivnost CYP1A1 u zdravom tkivu uz slabo diferencirani ili metastatski prošireni karcinom znatno viša nego u zdravom tkivu diferenciranog karcinoma bubrega bez metastaza. Prema tome, bolesnici oboljeli od agresivnijih oblika karcinoma bubrega imaju značajno višu aktivnost CYP1A1 nego bolesnici s manje agresivnim oblikom karcinoma¹⁰³.

1.4 KRATKI OSVRT NA DOSADAŠNJA SAZNAJJA O EPIDEMIOLOGIJI I ETIOLOGIJI KARCINOMA BUBREGA

U zadnja dva desetljeća zapažen je godišnji porast incidencije karcinoma bubrega od oko 2% u Europi i ostalim dijelovima svijeta². Opaženi porast djelomično je posljedica napretka slikovnih dijagnostičkih metoda kao što su UZV, CT ili MR, ali vjerojatno i načina života. Slikovne dijagnostičke metode naročito su značajne u ranom otkrivanju i procjeni proširenosti karcinoma bubrega, a što je usko povezano s odabirom optimalne terapije. Prema posljednjim objavljenim podacima Registra za rak u Hrvatskoj je 2008.g. stopa incidencije karcinoma bubrega bila 13,4/100 000 stanovnika (17,3/100 000 muškaraca i 9,9/100 000 žena)¹⁰⁴. Karcinom bubrega je dvostruko učestaliji u muškaraca u odnosu na žene¹⁰⁵, s najvišom incidencijom između 60 i 70 godine starosti¹¹.

Poznato je da su novotvorine uzročno-posljedično povezane s promjenama u oksidacijsko/antioksidacijskom potencijalu u ciljnom organu¹⁰⁶. Povezanost povišene LPO i incidencije karcinoma bubrega proizlazi iz dvije činjenice: prvo, LPO je pokazatelj oksidacijskog statusa i drugo, učestalost karcinoma bubrega veća je u osoba prekomjerne tjelesne težine i osoba s povišenim krvnim tlakom, a što je najčešće praćeno s poremećajem u metabolizmu lipida.

Hipoteza o povezanosti karcinogeneze i sustava P450 zasniva se na činjenici da niz kemijski prokarcinogenih tvari trebaju metaboličku aktivaciju posredovanu oksidacijskim enzimima (iz sustava citokroma P450) kako bi se transformirali u potencijalno karcinogeni oblik. Također, polimorfizam u sustavu P450 sve se više napominje kao jedan od etioloških čimbenika povezanih s karcinogenezom. Poznato je da su karcinomi bubrega dva puta učestaliji u muškaraca nego u žena⁷, a u sustavu P450 pojedini proteini različito su eksprimirani u muškaraca i žena. Ti isti proteini uključeni su u oksidacijske procese i procese farmakodinamike i farmakokinetike pojedinih lijekova, što su također

spolno ovisni procesi. Te se spolno vezane različitosti ne mogu pripisati hormonima jer postoje i u starijoj životnoj dobi.

2 SVRHA ISTRAŽIVANJA

2.1 HIPOTEZA

Hipoteza istraživanja je da različita pojavnost karcinoma bubrega u žena i muškaraca proizlazi iz spolno vezane razlike u oksidacijsko /antioksidacijskom statusu i razlike u ekspresiji (time i katalitičkoj aktivnosti) u sustavu proteina P450.

2.2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na temelju postavljene hipoteze ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti utjecaj prekomjerne tjelesne težine i visokog krvnog tlaka na stupanj oksidacije lipida (TBARS i MDA) i aktivnost AOE u homogenatima neoplastičnog, priležećeg i zdravog tkiva bubrega u bolesnika oba spola.
2. Odrediti stupanj oksidacije lipida (TBARS i MDA) i aktivnost AOE (SOD, KAT i Gpx) u homogenatima neoplastičnog, priležećeg i zdravog tkiva bubrega kako bi utvrdili razlikuje li se oksidacijsko/antioksidacijski kapacitet u bolesnika u ovisnosti o spolu.
3. Odrediti odnose između MnSOD i CuZnSOD u homogenatima neoplastičnog i zdravog tkiva bubrega u oba spola te odrediti odvijaju li se promjene na transkripcijskoj ili translacijskoj razini, odnosno na nivou aktivnosti enzima.
4. Odrediti mogu li se promjene oksidacijskog statusa utvrditi i u plazmi.

5. Odrediti ekspresiju gena za nekoliko izoformi P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP1B1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP2E1) u homogenatima neoplastičnog, priležećeg i zdravog tkiva bubrega u oba spola te odrediti u kojim izoformama i kojim vrstama tkiva dolazi do promjene u ekspresiji gena za P450.

6. Utvrditi mogu li se zapažene razlike usporediti s razlikom u pojavnosti karcinoma bubrega u ovisnosti o spolu.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 BOLESNICI

Istraživanjem je obuhvaćeno 30 bolesnika (15 žena i 15 muškaraca) oboljelih od karcinoma bubrega, primljenih u Kliničku bolnicu "Sestre milosrdnice" u Zagrebu i 44 zdrave osobe (kontrolna skupina: 21 žena i 23 muškarca), studenti Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Svi bolesnici i zdrave osobe dobrovoljno su pristali sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju te su svojevrijem ispunili anketu kojom je utvrđen dio zdravstvenog statusa i pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Suglasnost za provedbu istraživanja dobivena je od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva KB "Sestre milosrdnice". Od bolesnika s karcinomom bubrega dobiveno je tkivo bubrega i venska krv, a od zdravih osoba venska krv.

Sumnja na dijagnozu karcinoma bubrega postavljena je kliničkim, laboratorijskim i slikovnim metodama (UZV, CT ili MR), a potvrđena patohistološkim ispitivanjem. Sve novotvorine bile su primarni karcinomi bubrega. Na temelju procjene patologa iz bubrega svakog bolesnika uzeti su uzorci tkiva uz neoplazmu (priležeće tkivo) i neoplastičnog tkiva te ako je bolesnik bio podvrgnut radikalnoj nefrektomiji i uzorak zdravog tkiva (udaljeno od priležećeg) istog bubrega. Uzorci tkiva nisu makroskopski sadržavali nekrotična žarišta, područja krvarenja, ciste ili ožiljno tkivo. Iz naših ispitivanja isključeni su bolesnici koji imaju čimbenike rizika koji bi značajno mogli utjecati na rezultate istraživanja (druga primarna neoplazma, kemoterapija, uzimanje vitamina ili minerala). Histološka klasifikacija karcinoma bubrega učinjena je prema 6. izdanju klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije (WHO)³⁴ iz 2002.g. (Tablica 3).

Tablica 3. TNM klasifikacija karcinoma bubrega iz 2002.g.

TNM stadij	Proširenost zloćudne novotvorine
TX	Prisutnost zloćudne novotvorine se ne može procijeniti
T0	Nema znakova zloćudne novotvorine
T1	Zloćudna novotvorina ≤ 7cm, ograničena na bubreg
T1a	Zloćudna novotvorina ≤ 4cm, ograničena na bubreg
T1b	Zloćudna novotvorina > 4cm i ≤ 7cm, ograničena na bubreg
T2	Zloćudna novotvorina > 7cm, ograničena na bubreg
T3	Zloćudna novotvorina se širi u velike vene ili nadbubrežnu žlijezdu ili perirenalno tkivo, ali se ne širi izvan fascije Gerota
T3a	Zloćudna novotvorina se širi u nadbubrežnu žlijezdu ili perirenalno tkivo, ali se ne širi izvan fascije Gerota
T3b	Zloćudna novotvorina se makroskopski širi u bubrežnu venu ili segmentalne ogranke bubrežne vene ili u donju šuplju venu ispod razine ošita
T3c	Zloćudna novotvorina se makroskopski širi u donju šuplju venu iznad razine ošita ili se širi u stijenku donje šuplje vene
T4	Zloćudna novotvorina se širi izvan fascije Gerota
NX	Prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima se ne može procijeniti
N0	Nema znakova metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Metastaza u jednom limfnom čvoru
N2	Metastaze u više od jednog regionalnog limfnog čvora
MX	Prisutnost udaljenih metastaza se ne može procijeniti
M0	Nema znakova za udaljene metastaze
M1	Prisutnost udaljenih metastaza

3.1.1 Kliničko-patološke karakteristike bolesnika s karcinomom bubrega

Ispitivanu skupinu sačinjavalo je 30 bolesnika s karcinomom bubrega (15 žena i 15 muškaraca). Prosječna dob oboljelih žena bila je $61,5 \pm 11,7$ (37 do 77 godina), a muškaraca $60,9 \pm 10,2$ (46 do 77 godina). Odnos tjelesne težine i visine između skupina žena i muškaraca ukazao je na statistički značajnu razliku ($p < 0,003$; $p < 0,00002$), ali sličan indeks tjelesne mase (BMI) u obje skupine. Povišeni krvni tlak (iznad 140/90 mmHg) utvrđen je kod 8 oboljelih žena i 9 oboljelih muškaraca. Prema TNM klasifikaciji karcinoma bubrega najčešće je dijagnosticiran stadij T₁ (u 8 žena i 8 muškaraca), stadij T₂ u 3 žene i 1 muškarca, a stadij T₃ u 4 žene i 4 muškarca. Stadij T₄ nije dijagnosticiran niti u jednog ispitanika. U 2 bolesnika patohistološki se nije mogao odrediti stadij karcinoma bubrega (Tablica 4).

Tablica 4. Životna dob, tjelesna težina, visina i BMI u bolesnika oba spola, broj bolesnika s povišenim krvnim tlakom te raspodjela bolesnika u T stadij prema TNM klasifikaciji karcinoma bubrega.

	ŽENE	MUŠKARCI
Životna dob	61.5 ± 11.7 (37-77)	60.9 ± 10.2 (46-77)
Tjelesna težina	73.9 ± 13.5 (48-102)	91.0 ± 15.6 (69-120)
Visina	164.5±6.0 (154-177)	175.7±6.0 (164-186)
BMI	24.2 ± 5.21	25.9 ± 5.2
Povišeni krvni tlak	8/15	9/15
T ₁	8/15	8/15
T ₂	3/15	1/15
T ₃	4/15	4/15
T ₄	0/15	0/15
Neklasificirani T stadij	0/15	2/15

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SEM za životnu dob (godine), tjelesnu težinu (kg), visinu (cm) i BMI. Za povišeni krvni tlak (mmHg) i T stadij novotvorine vrijednosti su izražene kao broj bolesnika s povišenim krvnim tlakom ili u određenom T stadiju u odnosu na ukupni broj bolesnika.

3.2 POSTUPCI PRIPREME I ANALIZE UZORAKA

3.2.1 Priprema tkiva bubrega

Neposredno nakon operativnog zahvata, a nakon patohistološke procjene, iz tkiva bubrega uzeti su uzorci za različite vrste analiza. Uzorci neoplastičnog tkiva, priležećeg tkiva i u slučaju radikalne nefrektomije dio tkiva udaljenog od novotvorine koje se može smatrati zdravim tkivom stavljeni su na led. Dio tkiva koji se koristio za analizu LPO transportirao

se uronjen u 1.15% otopini KCl na ledu i obrađivao odmah. Dio uzoraka koji nisu zahtjevali neposrednu obradu zamrznuti su i transportirani u posudi sa suhim ledom u sterilnim eppendorf epruvetama od 2 ml te pohranjeni na -80°C . Za RNK analizu uzorci su stavljeni u RNA later (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) u eppendorf epruvete od 2 mm i transportirani na ledu te pohranjeni na $+4^{\circ}\text{C}$ do obrade unutar nekoliko dana.

Tkivo bubrega za određivanje koncentracije tiobarbiturno reaktivnih supstanci (TBARS), MDA i AOE homogenizirani su upotrebom Potter-Elvehjem homogenizatora na 1300 okretaja u minuti. Homogenizacija uzoraka provodila se na $+4^{\circ}\text{C}$. Dobiveni homogenat koristio se za određivanje koncentracije TBARS, MDA i proteina te aktivnosti SOD, KAT i GPx u zdravom, neoplastičnom i priležećem tkivu.

Kemikalije:

kalijev klorid (KCl); natrij hidrogen fosfat (Na_2HPO_4); etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$); proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska

butilirani hidroksitoluen 0.5% (BHT); proizvodi Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka

fosfatni pufer ($\text{pH}=7.8$).

Priprema otopina:

50 mM fosfatni pufer ($\text{pH}=7.8$) priprema se miješanjem dvije otopine (A i B); otopinu "A" čini 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, a otopinu "B" čini 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Otopina "A" (17 ml) pomiješa se s otopinom "B" (183 ml), podesi na pH 7.8 i dopuni do 800 ml s dH_2O .

0.5% otopina BHT dobiva se otapanjem BHT u etanolu.

1.15% KCl dobiva se otapanjem KCl u dH_2O .

Postupak:

Za određivanje koncentracije TBARS i pripadajućih proteina tkivo bubrega se homogenizira u 1.15% otopini KCl uz konačnu koncentraciju homogenata 1:10 (w/v). Koncentracija TBARS i proteina određuje se odmah po pripremi uzorka. Za određivanje koncentracije MDA tkivo bubrega (100 mg) se homogenizira u 1 ml otopine za homogenizaciju (900 µl fosfatnog pufera sa 100 µl svježeg pripremljenog 0.5% BHT u etanolu). Homogenizira se svaki uzorak posebno te se 25 µl homogenata uzorka čuva na -80°C u plastičnoj epruveti do analize. Istovremeno se odvađa uzorak homogenata za određivanje koncentracije proteina (određuju se odmah). Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina.

Za određivanje aktivnosti AOE uzorak tkiva bubrega se homogenizira u 50 mM fosfatnom puferu u omjeru 1:10 (w/v). Uzorci homogenata bubrega namijenjeni određivanju aktivnosti AOE sonificiraju se u tri ciklusa po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa na +4°C. Sonificirani uzorci homogenata centrifugiraju se na 18000 g 10 minuta, a potom na 20000 g 35 minuta u ultracentrifugi s hlađenjem na +4°C. Aktivnost AOE određuje se u supernatantu homogenata bubrega odmah po pripremi uzoraka ili se uzorci supernatanta pohranjuju na -80°C za naknadno određivanje njihovih aktivnosti. Koncentracija TBARS i aktivnost AOE određuju se spektrofotometrijski na UV-VIS spektrofotometru Camspec M330 (Camspec Ltd uz odgovarajući software, Cambridge, UK).

3.2.2 Određivanje aktivnosti AOE u homogenatu tkiva bubrega

3.2.2.1 Određivanje aktivnosti tSOD, CuZnSOD i MnSOD

Kemikalije:

etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA); citokrom C; superoksid dismutaza (SOD iz goveđih eritrocita); ksantin; ksantin oksidaza (50 jedinica/1.3 ml); proizvodi Sigma, St. Louis, SAD

natrij hidroksid (NaOH); kalijev cijanid (KCN); proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska
fosfatni pufer (pH=7.8).

Priprema otopina:

Osnovna otopina SOD iz goveđih eritrocita u koncentraciji od 1 mg/ml razrijeđuje se do koncentracije od 1000 ng/100 µl. Ta se koncentracija razrijeđuje u radnu otopinu u koncentraciji od 500 ng/50 µl od koje se rade slijedeća razrijeđenja u rasponu od 100 ng/50 µl do 500 ng/ 50 µl radi očitavanja vrijednosti s baždarnog pravca s poznatim vrijednostima SOD.

Otopina "A": 1.5 mg 1 mM ksantina otapa se u 9.86 ml 1 mM NaOH i citokroma C (12.96 mg 0.05 mM citokroma C otopljenog u 85 ml 50 mM fosfatnog pufera (pH=7.8 koji sadrži 0.1 mM EDTA)).

Otopina "B" (svježe pripremljena): 1500 µl ksantin oksidaze (konačna aktivnost od 0.2 U/ml) otapa se u 50 mM fosfatnom puferu (pH= 7.8) koji sadrži 0.1 mM EDTA. U određivanju koncentracije MnSOD koristi se 3 mM KCN.

Postupak:

Modificiranom metodom Flohé i Ottinga (1984.g.)¹⁰⁷ određuje se aktivnost ukupne SOD (tSOD) u supernatantu homogenata tkiva bubrega inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza. Aktivnost ksantin oksidaze može se razlikovati od pokusa do pokusa, stoga je nužno uskladiti koncentraciju ksantin oksidaze tako da brzina redukcije citokroma C bude jednaka porastu apsorbancije od 0.025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez SOD. U staklenu kivetu s 2.9 ml otopine "A" dodaje se 50 µl uzorka (po potrebi razrijeđenog s fosfatnim puferom, pH=7.8 bez EDTA) i reakcija započinje dodatkom 50 µl otopine "B". Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute spektrofotometrijski na valnoj duljini 550 nm. Svaki uzorak termostatira se na +25°C. Jedinica SOD određena

je kao količina enzima potrebnog za 50% inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD. Aktivnost tSOD izražena je u IU/mg proteina.

Aktivnost MnSOD određuje se pod istim uvjetima kao i tSOD uz razliku da se supernatant inkubira najmanje 30 minuta s 3 mM KCN čime se inhibira aktivnost CuZnSOD. CuZnSOD aktivnost izračuna se tako da se aktivnost MnSOD oduzme od aktivnosti tSOD. Aktivnost MnSOD i CuZnSOD izražena je u IU/mg proteina.

3.2.2.2 Određivanje aktivnosti KAT

Kemikalije:

30% vodikov peroksid (H_2O_2); proizvodi Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka

6.81% kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4); 7.12% natrij hidrogenfosfat (Na_2HPO_4); proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska

50 mM fosfatni pufer (pH=7.0).

Priprema otopina:

Otopina "A" priprema se otapanjem 6.81 g KH_2PO_4 s dH_2O do 100 ml, a otopina "B" otapanjem 7.12 g Na_2HPO_4 s dH_2O do 100 ml. Otopine "A" i "B" pomješaju se u omjeru 1:1.5.

0.34 ml 30% H_2O_2 razrijedi se s fosfatnim puferom (pH=7.0) do 100 ml (30 mM H_2O_2). Otopina je stabilna dva tjedna na $+4^\circ C$.

Postupak:

Metodom po Aebiju (1984.g.)¹⁰⁸ određuje se aktivnost KAT u supernatantu homogenata tkiva bubrega. Uzorci se razrijeđuju 50 puta fosfatnim puferom (pH=7.0) i termostatiraju na $+25^\circ C$. Razrijeđenom uzorku od 2 ml u kvarcnoj kivetu dodaje se supstrat (1 ml 10 mM H_2O_2) čime započinje reakcija enzima. Aktivnost enzima mjeri se 30 sekundi na valnoj duljini 240 nm. Slijepu probu čini 2 ml razrijeđenog uzorka i 1 ml fosfatnog

pufera (pH=7.0). U trenutku dodatka supstrata očita se vrijednost apsorbancije uzorka (t=0). Bilježi se pad apsorbancije u vremenu t=0 i t=30 sekundi. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena je mjera KAT aktivnosti pri čemu je jedinica KAT aktivnosti definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1 μmol H_2O_2 u minuti (pH=7.0, +25°C) gdje koncentracija H_2O_2 pada od 10.3 do 9.2 mM. KAT aktivnost u supernatantu homogenata tkiva bubrega izražena je u μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina (μmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ mg proteina), a što odgovara jedinicama aktivnosti KAT po miligramu proteina (IU/mg proteina).

3.2.2.3 Određivanje aktivnosti GPx

Kemikalije:

RANSEL kit; proizvodi Randox Lab., Crumlin, United Kingdom.

Postupak:

RANSEL kit koristi se za određivanje aktivnosti GPx u supernatantu homogenata tkiva bubrega. Metoda je bazirana na principu oksidacije NADPH prema metodi Paglia i Valentinéa (1967.g.)¹⁰⁹. U staklenu kivetu od 3 ml dodaje se 1 ml reakcijske smjese i 20 μl supernatanta razrijeđenog otopinom za razrjeđivanje. GPx katalizira oksidaciju glutationa sa supstratom kumen-hidroksidom (40 μl , ishodišna koncentracija 0.018 mmol/l).

Pad u apsorbanciji mjeri se spektrofotometrijski 3 minute pri valnoj duljini od 340 nm. Jedna jedinica GPx katalizira oksidaciju 1 μM reduciranog glutationa (GSH) u oksidirani glutation (GSSG) kod pH=7.0 pri +25°C. Aktivnost GPx izražena je u jedinici po miligramu proteina (IU/mg proteina).

3.2.3 Određivanje koncentracije proteina u homogenatu tkiva bubrega

Kemikalije:

2% natrijev karbonat (Na_2CO_3); 2% kalij natrij-tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$); 1% bakar sulfat (CuSO_4); natrij hidroksid (NaOH); Folin-Ciocalteuov reagens; proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska

albumin goveđeg seruma; proizvodi Armour Pharmaceutical Co. Ltd. Eastborne, United Kingdom.

Priprema otopine:

Smjesa za određivanje proteina sadrži: 2% Na_2CO_3 (20 ml); 2% $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ (0.2 ml); 1% CuSO_4 (0.2 ml); 1N NaOH ; Folin-Ciocalteuov reagens (1:2; razrijeđen s dH_2O); albumin goveđeg seruma (0.5 mg proteina/ml).

Postupak:

Metodom po Lowryju (1951.g.)¹¹⁰ određuje se koncentracija proteina. Uzorku (0.2 ml) dodaje se 1N NaOH (0.2 ml), smjesa (2 ml) te Folin-Ciocalteuov reagens (0.2 ml). Apsorbancija otopine mjeri se pri valnoj duljini od 700 nm. Koncentracija proteina izražava se u miligramima proteina po gramu svježeg tkiva (mg proteina/g tkiva). Kao standard koristi se albumin goveđeg seruma.

3.2.4 Određivanje koncentracije TBARS u homogenatu tkiva bubrega

Kemikalije:

Tiobarbiturna kiselina (TBA); 1,1,3,3-tetrametoksiopropan, TMP ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_4$); 99.9% etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$); proizvodi Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka

natrij dodecil sulfat, SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$); proizvodi Merck, Darmstadt, Njemačka

kalijev klorid (KCl); octena kiselina ($C_2H_4O_2$); n-butanol ($C_4H_{10}O$); piridin (C_5H_5N); kloridna kiselina (HCl); natrij klorid (HCl); natrij hidroksid (NaOH); proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska.

Priprema otopina:

1.15% KCl (1.15 g/100 ml dH_2O); 8.1% (0.81 g SDS/10 ml dH_2O); 20% $C_2H_4O_2$ priprema se miješanjem 20 ml 99.5% $C_2H_4O_2$, 2.31 ml HCl i nadopunjuje do 50 ml sa dH_2O . Otopina se podesi na pH 3.5 dodavanjem 5 M NaOH i dopuni do konačnog volumena od 100 ml sa dH_2O . 0.8% otopina TBA priprema se na dan pokusa otapanjem 8 g TBA/100 ml dH_2O . Od osnovne otopine standarda (25 μ l TMP/50 ml etanola) rade se radna razrijeđenja standarda.

Postupak:

Prema metodi Ohkawe i sur. (1979.g.)¹¹¹ određuje se koncentracija TBARS u homogenatu tkiva bubrega. Metoda je nespecifična jer osim MDA (više od 90%) u probi s TBA mogu reagirati drugi aldehidi kao i druge reaktivne tvari. Stoga, u ovim ispitivanjima ne određuje se samo koncentracija MDA nego koncentracija TBARS koje su također značajan pokazatelj LPO u biološkim sustavima. U reakciji jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA uz nastanak obojenog proizvoda. 10% homogenatu tkiva bubrega pripremljenom u 1.15% otopini KCl (0.2 ml) dodaje se 8.1% SDS (0.2 ml), 20% $C_2H_4O_2$ (pH=3.5; 1.5 ml), 0.8% vodena otopina TBA (1.5 ml) i reakcijska smjesa do 4 ml ukupnog volumena nadopuni se s dH_2O . Smjesa se kuha u vodenoj kupelji 60 minuta na $+95^\circ C$, a zatim hladi 15-20 minuta na sobnoj temperaturi. Ohlađenoj smjesi dodaje se 5 ml n-butanola i piridina (omjer 15:1) i 1 ml dH_2O , uz jako miješanje. Uzorci se centrifugiraju 15 minuta na 3000 okretaja u minuti pri čemu se odvajaju dva sloja. Koncentracija TBARS

mjeri se u obojenom sloju na valnoj duljini 532 nm. Kao standard upotrebljava se TMP. Koncentracija TBARS izražena je u nmol/mg proteina.

3.2.5 Određivanje koncentracije MDA u plazmi i homogenatima tkiva bubrega metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC)

Kemikalije:

Tiobarbiturna kiselina (TBA); 1,1,3,3-tetraetoksipropan, TEP ($C_{11}H_{24}O_4$); proizvodi Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka

natrij dodecil sulfat, SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$); proizvodi Merck, Darmstadt, Njemačka

fosfatna kiselina (H_3PO_4); metanol (CH_4O); kalijev hidrogenfosfat (KH_2PO_4); natrijev hidroksid (NaOH); proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska.

Priprema otopina:

Standard TEP pripremljen je u slijedećim razrijeđenjima: 0.156; 0.312; 0.625; 1.25; 2.5; 5.0; 10.0; 20.0 i 40 μ M; 0.44 M H_3PO_4 ; 50 mM KH_2PO_4 (pH=6.8); 42 mM TBA; 1 M NaOH; metanol.

Postupak:

Prema metodi Khoschsorur i sur. (2000.g.)¹¹² određuje se koncentracija MDA u plazmi odvojenoj iz krvi koja je prikupljena u epruvete s EDTA od zdravih i ljudi oboljelih od karcinoma bubrega. Prema istoj metodi određuje se koncentracija MDA u 10% homogenatima zdravog, priležecog i neoplastičnog tkiva bubrega. Razrijeđeni uzorci plazme i standardi (50 μ l uzorka + 450 μ l dH_2O) pomiješaju se s 750 μ l 0.44 M H_3PO_4 i 250 μ l 42 mM TBA. Uzorci se uranjaju u vodenu kupelj 60 minuta na +100°C, a potom hlade 15 minuta na ledu. Ohlađenim uzorcima dodaje se 1:1 CH_4O u lužini (4.5 ml 1 M NaOH+50 ml CH_4O). Koncentracija MDA određuje se u

20 µl supernatanta metodom HPLC s UV očitavanjem na 533 nm. HPLC sustav sadrži Shimadzu LC-20AB tekući kromatograf, Shimadzu SPD-20A UV/VIS detektor, CBM-20A komunikacijski modul, Midas Spark Holland automatski skupljač frakcija uzoraka. Kromatografija je analizirana s LC solution programom. Pokretna faza sastoji se od 50 mM KH₂PO₄ (pH=6.8) s 40% (v/v) u CH₄O. Protočna brzina stavlja se na 0.9 ml/minuti i uzorci se analiziraju na Waters Spherisorb ODS 2.5 µm, 4.6×150 mm kolonama. Koncentracija MDA u plazmi izražava se u nmol/L, a koncentracija MDA u homogenatu tkiva u nmol/mg proteina.

3.2.6 Određivanje ekspresije gena različitih izoformi P450 te MnSOD i CuZnSOD u homogenatima tkiva bubrega

3.2.6.1 Izolacija RNK iz tkiva bubrega

Kemikalije:

TRIzol[®] Reagent; proizvodi Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

kloroform (CHCl₃); izopropanol (C₃H₈O); 75% etanol (C₂H₆O); proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska

dietil pirokarbonat, DEPC (C₆H₁₀O₅); proizvodi Sigma, St. Louis, SAD.

Priprema otopine:

0,5 ml DEPC (0,1% v/v) dodaje se u 500 ml kvarcne vode. Otopina se dobro promiješa, inkubira preko noći na +37°C te autoklavira na +121°C 20 minuta. DEPC je karcinogen stoga je potrebno nositi zaštitne rukavice i opremu.

Postupak:

Uzorci tkiva mase oko 30 mg stavljaju se u homogenizator te se na njih odmah dodaje 1 ml trizola prema metodi Chomczynski i sur. (1987.g.)¹¹³ Slijedi homogenizacija uzoraka 60 sekundi od manje brzine prema većoj.

Nakon toga uzorci se inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi. Na uzorke se zatim dodaje 200 μ l CHCl_3 , protresu se na tresilici 15 sekundi i stavljaju na led 5 minuta. Slijedi centrifugiranje uzoraka na 12 000 g tijekom 15 minuta na $+4^\circ\text{C}$. Dobivena gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNK polako se odvoji od prstena i donje faze. Na isti volumen vodene faze dodaje se isti volumen $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$. Dobivena otopina nekoliko puta se lagano promiješa, inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi te centrifugira 10 minuta na 12 000 g na $+4^\circ\text{C}$. Supernatant se odvaja od taloga, a na talog se dodaje 1 ml 75% $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. Uzorci se promiješaju i centrifugiraju na 7 500 g tijekom 5 minuta na $+4^\circ\text{C}$. Postupak ispiranja 75% $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ i centrifugiranja pod istim uvjetima ponovi se još jednom, nakon čega se supernatant dekantira, a talog suši 10 minuta. Slijedi dodavanje 20 μ l H_2O obrađene DEPC na talog.

3.2.6.2 Određivanje koncentracije i kvalitete RNK

Kemikalije:

Agaroz; etilen-diamino tetraoctena kiselina (EDTA); proizvodi Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

octena kiselina ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$); Tris; proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska

Etidij bromid; proizvodi Sigma, St. Louis, SAD

DNK obilježivač 100 pb; proizvodi Fermantas, Burlington, Canada.

Priprema otopina:

TAE pufer: 24,2 g Tris otopi se u 50 ml Re H_2O , dodaje se 10 ml 0,5 M EDTA, dodaje se 5,7 ml $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ i nadopuni do 100 ml s Re H_2O .

Agarozni gel pripremljen je otapanjem 1.5 g agaroze u 100 ml 30 mM TAE pufera.

Postupak:

Koncentracija RNK mjeri se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije u kvarcnim kivetama na valnoj duljini 260 nm. Formula za računanje koncentracije RNK u $\mu\text{g/ml}$ otopine je:

$$\text{O.D.}_{260 \text{ nm}} \times 40 \times \text{čimbenik razrijeđenja}$$

Za RNK se uvijek mjeri i ekstinkcija na 280 nm koja označava zagađenje proteinima. Računa se omjer $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$. Omjer veći od 1.8 upućuje da je izolirana RNK čista. Cjelovitost RNK određuje se horizontalnom elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu pri 90 V. Na svaki gel nanoseno je 6 μl proizvoda lančane reakcije polimerazom (PCR) i DNK obilježivač od 100 pb. Elektroforezom se RNK razdvaja na dvije vrpce, 28S i 16S ribosomske RNK u omjeru 2:1 koje se nakon bojanja etidij bromidom koncentracije 0,5 $\mu\text{l/ml}$ nakon 20 min mogu vidjeti na UV transiluminatoru i dokumentirati fotografiranjem (Image Master, Amersham Pharmacia Biotech).

3.2.6.3 Reverzna transkripcija

Kemikalije:

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade; 10 \times DNase I Reaction Buffer; 25 mM etilen-diamino tetraoctena kiselina (EDTA, pH=8.0); SuperscriptTM II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase; RNaseOUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor; 5 \times First-Strand Buffer; 1 mM DTT; proizvodi Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

0,5 $\mu\text{g/ml}$ oligo d(T)₁₈; proizvodi New England Biolabs, Massachusetts, SAD

10 mM dNTP; proizvodi Isogen Life Science, Nizozemska.

Postupak:

Izolirana i prethodno izmjerena RNK iz tkiva bubrega pohranjuje se na -80°C do korištenja. Reverzna transkripcija provodi se u ukupnom volumenu od 20 μl prema slijedećem postupku: u svaku eppendorf

epruvetu dodaje se 1 μ l RNK (koncentracije 1 μ g/ μ l), 1 μ l deoksiribonukleaze (DNaze), 1 μ l pufera za DNazu i 7 μ l kvarcne H₂O. Uzorci se inkubiraju 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim se dodaje 25 mM EDTA (pH 8.0) kako bi se inhibirala Dnaza te se inkubiraju na +65°C 10 minuta. Uzorci se stavljaju na led i dodaje se po 1 μ l početnica oligo d(T)₁₈ i 1 μ l dNTP te se inkubiraju 5 minuta na +94°C. Slijedi dodavanje 4 μ l 5 \times First-Strand Buffera, 2 μ l DTT i 1 μ l ribonukleaznog inhibitora. U nastavku se uzorci inkubiraju 2 minute na +94°C nakon čega se u uzorke dodaje po 1 μ l reverzne transkriptaze. Reakcija se odvija na +42°C tijekom 90 minuta te se nakon toga cijelokupni proizvod reakcije (cDNK) razrijeđuje s kvarcnom H₂O do ukupnog volumena od 100 μ l i zamrzava na -20°C. Tako dobivena cDNK koristi se kao kalup u PCR.

Kako bi se utvrdila uspješnost prepisivanja mRNK u cDNK, uz svaku dobivenu cDNK umnoži se pomoću para specifičnih početnih oligonukleotida i β -aktin koji je konstitutivno eksprimiran u svim stanicama. Proizvod ove reakcije je veličine 540 pb. Za reakciju umnažanja β -aktina uvjeti su slijedeći - svaki od 33 ciklusa reakcije PCR sastoji se od tri faze: denaturacija (traje 20 sekundi pri +94°C), faza sparivanja (traje 20 sekundi pri +60°C) i faza produljivanja lanaca (traje 40 sekundi pri +70°C). Uzorci dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjeravaju se horizontalnom elektroforezom u 1,5% gelu agaroze. Veličina umnoženog odsječka određuje se prema DNK standardu GeneRuler™ 50bp DNA Ladder. Proizvodi reakcije PCR prikazuju se u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora.

3.2.6.4 Analiza ekspresije gena za P450

Kemikalije:

10 \times HotMaster Taq Buffer; 25 mM Mg²⁺; 0,1 mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP i dGTP); 0,5 IU HotMaster™ Taq DNA Polymerase; proizvodi Eppendorf, Hamburg, Njemačka

0,25 μ M početni oligonukleotidi; proizvodi Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD

1,5% Agaroz; proizvodi Sigma, St. Louis, SAD

DNA standard GeneRuler™ 50bp DNA Ladder; proizvodi Fermentas, Canada.

Postupak:

Razina ekspresije transkripata mRNA gena za CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP1B1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2D6 i β aktin u zdravom, priležem i neoplastičnom tkivu bubrega utvrđuje se semikvantitativnom PCR metodom pomoću specifičnih početnih oligonukleotida prikazanih u tablici 5. Reakcija PCR odvija se u volumenu od 25 μ l kojeg sačinjava: 2,5 μ l komercijalno dostupnog 10X PCR pufera, 0,5 μ l nukleotida (dNTP), 0,5 μ l početnih oligonukleotida, 5 μ l cDNA, 0,5 jedinica Taq polimeraze te kvarcna H₂O. Nakon početne inkubacije na +94°C tijekom 2 minute, reakcije se odvijaju: pod jednakim uvjetima za denaturaciju na +94°C kroz 20 sekundi, uz određenu temperaturu u fazi sparivanja (hibridizacije) za umnožavanje s početnicama - za CYP1A1, CYP1B1 i CYP2D6 na +52°C; za CYP3A4, CYP2C19 i CYP2E1 na +55°C, a za CYP1A2, CYP2C9 i β aktin na +60°C te uz jedinstvenu temperaturu od +70°C kroz 40 sekundi za produljivanje lanaca DNK. Završni korak reakcije traje 7 minuta na +70°C. Uzorci dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjeravaju se horizontalnom elektroforezom u 1.5% gelu agaroze. Veličina umnoženog odsječka određuje se prema DNK standardu GeneRuler™ 50bp DNA Ladder. Produkti reakcije PCR prikazuju se u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora. Analizom na Image Master VDS (Pharmacia Biotech) određuje se jačina vrpce u kontrolnom uzorku za svaki gen od interesa (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP1B1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2D6 i β -aktin).

Tablica 5. Oligonukleotidne početnice ciljnih gena, temperatura hibridizacije (°C), veličina proizvoda (parovi baza, pb) i broj ciklusa korištenih u istraživanju.

GEN	POČETNICE	HIBRIDIZACIJA °C	VELIČINA PROIZVODA (pb)	BROJ CIKLUSA
β-ACTIN				
5'	5' GTG CGT GAC ATT AAG GAG AAG 3'	60	213	30
3'	5' GAA GGT AGT TTC GTG GAT GC 3'			
1A1				
5'	5' TCACAGACAGCCTGATTGAG 3'	52	443	33
3'	5' GATGGTTGACCCATAGCTT 3'			
1A2				
5'	5'AAC AAG GGA CAC AAC GCT GAAT3'	60	453	30
3'	5'GGA AGA GAA ACA AGG GCT GACT 3'			
3A4				
5'	5'CCTTACATATAC ACA CCC TTT GGA AG3'	55	158	30
3'	5' GGTGAAGA AGTCCTCT AAGCT 3'			
1B1				
5'	5' GTA TAT TGT TGA AGA GAC AG 3'	52	316	33
3'	5' AAA GAG GTA CAA CAT CAC CT 3'			
2C9				
5'	5' TCCTATCATTGATTACTTCCCG 3'	60	217	30
3'	5' AACTGCAGTGTTTCCAAGC 3'			
2C19				
5'	5' TTCACCTGTGATCCCACTTT 3'	55	342	33
3'	5' CTCCATTTTGATCAGGAAGCA 3'			
2D6				
5'	5' AGG AGA TCG ACG ACG TGA TA 3'	52	553	33
3'	5'TTG GAA CTA CCA CAT TGC TTT 3'			
2E1				
3'	5' CTGCAACGTCATAGCCGACAB3'	55	294	30
5'	5' TCCATTTCCACGAGCAGGCA 3'			

3.2.6.5 Analiza ekspresije gena za MnSOD i CuZnSOD

Kemikalije:

Komplet za RT-PCR: TaqMan® Master Mix; : TaqMan® Gene Expression Assay; proizvodi Applied Biosystems; Carlsbad, CA, SAD.

Postupak:

Lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR)

određuje se promjena u ekspresiji gena za CuZnSOD (ID Hs00166575_m1, 63pb) i MnSOD (ID Hs01553554_m1, 69pb). Ova metoda temelji se na detekciji oslobođenog fluorescentnog signala prilikom umnažanja molekula cDNK. Na 5 µl cDNK dodaje se 10 µl kompleta za RT-PCR koji sadrži enzim DNK polimerazu, 1 µl specifičnih početnica te 4 µl mili qH₂O. Svi pokusi izvode se u triplikatu na aparatu ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Nakon inkubacije

uzoraka 2 minute pri +50°C (aktivacija uracil-DNK-glikozilaze) slijedi aktivacija DNK polimeraze 10 minuta pri +95°C. Uzorci zatim ulaze u 40 ciklusa denaturacije (15 sekundi pri +95°C) i sparivanja oligonukleotida te produljenja lanaca DNK (60 sekundi pri +60°C). Ekspresija svih gena kvantificira se u odnosu na endogenu kontrolu, gen za eukariotsku 18S rRNK (ID Hs99999901_s1, 187pb) u svrhu normalizacije ukupne količine cDNK u svakom uzorku. Relativna promjena ekspresije svakog gena izračunava se pomoću programa REST© te izražava u odnosu na kontrolu definiranu kao 1.

3.2.7 Western blot za MnSOD i CuZnSOD proteine

3.2.7.1 SDS elektroforeza (SDS-PAGE)

Kemikalije:

40% akrilamid/bisakrilamid (omjer 29:1); 10% amonij persulfat (APS); 10% natrij dodecil sulfat, SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$); ditiotreitol (DTT); TEMED; proizvodi Sigma, St. Louis, SAD

BIO-RAD Precision Plus Protein™ Standard; proizvodi BIO-RAD, Hercules, CA, SAD

izopropanol (C_3H_8O); kloridna kiselina (HCl); glicin $C_2H_5NO_2$; Tris; proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska.

Priprema otopina:

Donji pufer: Tris HCl (pH 8.8) 1.875 M: 11.36 g Tris otapa se u ReH_2O , pH vrijednost se podešava na 8.8 sa 6M HCl i nadopunjava do 50 ml s ReH_2O .

Gornji pufer: Tris HCl (pH 6.8) 1.25 M: 7.56g Tris otapa se u ReH_2O , pH vrijednost se podešava na 6.8 sa 6M HCl i nadopunjava do 50 ml s ReH_2O .

10× elektroforetski pufer: 16.1 g Tris i 72.1 g glicina otapa se u ReH_2O i zatim se dodaje 5g SDS. pH vrijednost podešava se na 8.3.

Postupak:

SDS elektroforeza je metoda kojom se razdvajaju proteini na osnovu razlike u molekularnoj masi prema metodi Laemmli (1970.g.)¹¹⁴. Proteini tijekom putovanja kroz gel uz pomoć SDS (anionski detergent koji denaturira proteine omotavajući se oko njihovih polipeptidnih veza) dobivaju ukupni negativni naboj koji je proporcionalan njihovoj duljini. Na taj način gustoća naboja proteina postaje jednaka za različite proteine te oni u električnom polju putuju prema pozitivnom polu brzinom koja ovisi isključivo o njihovoj molekularnoj masi. Kao sredstvo u kojem dolazi do razdvajanja proteina koristi se poliakrilamidni gel čija umrežena struktura pruža otpor kretanju proteina, pri čemu proteini veće molekularne mase putuju sporije od proteina manje molekularne mase. Poliakrilamidni gel sastoji se od gela za sabijanje (5%) i gela za razdvajanje (ovisno o veličini proteina koje želimo razdvojiti ima različiti postotak akrilamidnog dijela). U našim pokusima pripreman je 12.5% gel (koristi se ukoliko se istovremeno žele izolirati proteini različitih molekularnih masa). Pripremljena otopina izlijeva se između dviju staklenih ploča do $\frac{3}{4}$ razine te se nadsvođuje izopropanolom kako bi se omogućila polimerizacija donjeg gela. Nakon što se gel polimerizira (oko 30 minuta) izlije se izopropanol, a na donji gel izlije se tekući gornji gel u koji se stavi češalj kako bi se formirale jažice u koje se kasnije nanose uzorci. Uzorci se neposredno prije nanošenja denaturiraju kuhanjem 2 minute na +95°C. Zatim se kratko centrifugiraju te se nanesu u jažice i miješaju sa 5× puferom za uzorke. U svaku jažicu dodaje se isti volumen uzorka (20 µl). Također, koncentracija proteina u svakom uzorku koji se nanosi na gel je jednaka (5 µg). U jednu jažicu nanosi se proteinski standard koji služi za pokazivanje položaja proteina određene molekularne mase na gelu za vrijeme elektroforeze i nakon transfera na membrani.

Sistem za vertikalnu elektroforezu na kojem se razdvajaju proteini je Mini Protean[®] 3 Cell 67-S (BIO-RAD, Hercules, CA, SAD). Elektroforeza se provodi na 80 V, a nakon prijelaza proteina iz gornjeg gela u donji napon

se povećava na 100 V. Pod tim uvjetima provodi se elektroforeza sve dok fronta ne dođe do dna gela.

3.2.7.2 Prijenos proteina sa gela na membranu

Kemikalije:

100% metanol (CH₄O); proizvodi Kemika, Zagreb, Hrvatska
poliviniliden difluorid (PVDF) membrana 0,2 μm; proizvodi BIO-RAD, Hercules, CA, SAD.

Priprema otopine:

Pufer za prijenos - 50 ml elektroforetskog pufera 10× (pH=8.3)
pomiješamo sa 350 ml dH₂O i 100 ml metanola.

Postupak:

Proteini razdvojeni na 12.5% gelu prenose se na PVDF membranu pomoću aparata za prijenos proteina Mini Trans-Blot Module (BIO-RAD, Hercules, CA, SAD). Gel za razdvajanje se prije prijenosa na membranu odvaja od gela za sabijanje i stavlja u pufer za prijenos. PVDF membrana izrezuje se na nešto veću dimenziju od gela, stavlja par sekundi u 100% metanol kako bi bila upotrebljiva za prijenos proteina, a zatim ispiru u dH₂O. Ovaj postupak ponavlja se tri puta nakon čega se membrana stavlja u pufer za prijenos kako bi se ekvilibrirala. Zatim se gel i membrana zajedno slažu u kazetu za prijenos. Na donji dio kazete u kadici s puferom za prijenos stavlja se najprije spužvica, Whattman filter papiri, PVDF membrana, gel, Whattman filter papiri i spužvica. Važno je da između membrane i gela ne nastanu mjehurići zraka jer u tom slučaju nema prijenosa proteina s gela na membranu. Kazeta se zatim stavlja u kadicu za prijenos tako da gel bude okrenut prema negativnom, a membrana prema pozitivnom polu kako bi negativno nabijeni proteini putovali prema membrani za vrijeme prijenosa. Prijenos traje 1 sat pri konstantnoj struji od 350 mA.

3.2.7.3 Otkrivanje proteina specifičnim antitijelima

Antitijela:

anti-SOD1 (ab16831) [superoxide dismutase1], 17 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrijeđenje 1:2000; anti-SOD2 (ab13533) [superoxide dismutase2], 25 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrijeđenje 1:5000; proizvodi Abcam, Cambridge, UK

sekundarno anti-zečje antitijelo iz magarca (NA934), razrijeđenje 1:5000, obilježeno peroksidazom hrena; proizvodi Amersham, Buckinghamshire, UK

anti-ERK2 (C-14), 42 kDa, zečje poliklonsko antitijelo, razrijeđeno 1:1000; proizvodi Santa Cruz Biotechnology Inc., SAD.

Kemikalije:

0,1% TWEEN; proizvodi Sigma, St. Luis, SAD

5% mlijeko u prahu; proizvodi Fixmilch Instant, Austrija

BM Chemiluminiscence Blotting Substrate (POD); proizvodi Roche Applied Science, Njemačka

50 mM fosfatni pufer (pH=7.8).

Priprema otopina:

PBS-TWEEN: na 500 ml fosfatnog pufera dodaje se 500 μ l TWEEN.

Pufer za blokiranje: 2.5 g mlijeka u prahu otopi se u 50 ml PBS TWEEN.

Postupak:

Membrana se nakon prijenosa ispire u fosfatnom puferu 10 minuta na tresilici, a zatim se stavlja preko noći na +4°C u pufer za blokiranje kako bi se blokirala prazna mjesta na membrani i na taj način spriječilo nespecifično vezanje antitijela na membranu. Membrana se drugi dan inkubira primarnim antitijelima (zečja poliklonalna) 3 sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Zatim se ispire tri puta po 5 minuta u PBS TWEEN nakon čega se inkubira sekundarnim antitijelom 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije membrana se ponovo ispire u PBS TWEEN

3 puta po 5 minuta nakon čega se na proteinsku stranu stavlja otopina za detekciju. Nakon inkubacije od 2 do 3 minute membrana se stavlja u plastičnu foliju i na nju se stavlja autoradiografski film (RF4, 100 NIF, Fotokemika-Kodak) te se polaže u kazetu za razvijanje. Nakon određenog vremena ekspozicije koje je prethodno određeno za svako antitijelo film se razvija stavljanjem u razvijlač, vodu i fiksir. Nakon toga se ispiru u vodi i stavlja na sušenje. Membrana se može čuvati u plastičnoj foliji na +4°C do godinu dana. U tom vremenu može se ponovno inkubirati određenim antitijelom.

3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (SEM) služeći se statističkim programom za obradu podataka SPSS za Windowse (v.10.0.5.). Razlike dobivene između neoplastičnog, priležecog i zdravog tkiva kao i utjecaj spola na ispitivane pokazatelje uspoređivani su uz pomoć univarijantne jednofaktorske analize varijance (one-way ANOVA) sa Schefféovim testom za testiranje skupina. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

4 REZULTATI

4.1 UTJECAJ POVIŠENOG KRVNOG TLAKA NA LPO I AKTIVNOST AOE U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

Koncentracija TBARS i aktivnost AOE praćena je u homogenatima zdravog, priležećeg i neoplastičnog tkiva bubrega u muškaraca i žena s fiziološkom vrijednosti (do 140/90 mmHg) i povišenim krvnim tlakom (iznad 140/90 mmHg). Pokazano je da visoki krvni tlak ne mijenja značajno koncentraciju TBARS niti aktivnost AOE u ispitivanim tkivima bubrega u oba spola (Tablica 6).

Tablica 6. Utjecaj fiziološke vrijednosti i visokog krvnog tlaka na koncentraciju TBARS i aktivnost AOE.

	MUŠKARCI			ŽENE		
Fiziološke vrijednosti krvnog tlaka						
	Zdravo	Neoplazma	Priležeće	Zdravo	Neoplazma	Priležeće
TBARS	2.48±1.00	1.93±0.75	0.69±0.16	0.74±0.09	1.58±0.39	0.44±0.12
SOD	1.90±1.04	1.06±0.39	1.71±0.32	3.30±0.50	2.16±0.46	3.61±0.60
KAT	0.04±0.01	0.02±0.00	0.04±0.01	0.05±0.00	0.03±0.01	0.04±0.01
GPx	0.32±0.09	0.23±0.09	0.26±0.07	0.29±0.07	0.23±0.05	0.38±0.08
Visoki krvni tlak						
	Zdravo	Neoplazma	Priležeće	Zdravo	Neoplazma	Priležeće
TBARS	1.14±0.29	1.69±0.22	0.90±0.21	0.54±0.19	2.00±0.39	0.65±0.12
SOD	2.17±0.52	1.39±0.37	2.18±0.46	3.37±0.92	2.85±0.66	3.30±0.64
KAT	0.05±0.01	0.01±0.00	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.00	0.05±0.00
GPx	0.24±0.06	0.20±0.06	0.20±0.04	0.24±0.03	0.19±0.03	0.37±0.08
	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

Utjecaj krvnog tlaka na koncentraciju TBARS (nmol/mg proteina) i aktivnost AOE (IU/mg proteina) u homogenatima zdravog, neoplastičnog i priležećeg tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SEM.

NZ - nema statističke značajnosti između skupina s fiziološkom vrijednosti i povišenim krvnim tlakom u svim pokazateljima u oba spola.

4.2 UTJECAJ PREKOMJERNE TJELESNE TEŽINE NA LPO I AKTIVNOST AOE U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

Koncentracija TBARS i aktivnost AOE praćena je u homogenatima zdravog, priležećeg i neoplastičnog tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena s urednom i prekomjernom tjelesnom težinom (BMI > 25). Usporedbom skupina s urednom i prekomjernom tjelesnom težinom nisu nađena statistički značajna odstupanja u ispitivanim uzorcima tkiva bubrega u oba spola (Tablica 7).

Tablica 7. Utjecaj uredne i prekomjerne tjelesne težine na koncentraciju TBARS i aktivnost AOE.

MUŠKARCI				ŽENE		
Uredna tjelesna težina						
	Zdravo	Neoplazma	Priležeće	Zdravo	Neoplazma	Priležeće
TBARS	1.43±0.33	1.69±0.28	0.84±0.19	0.62±0.16	1.65±0.70	0.45±0.14
SOD	2.50±0.69	1.16±0.32	1.59±0.29	3.96±0.69	2.82±1.01	4.18±0.68
KAT	0.05±0.01	0.02±0.00	0.04±0.01	0.05±0.00	0.03±0.01	0.05±0.01
GPx	0.27±0.07	0.24±0.06	0.25±0.06	0.24±0.04	0.20±0.05	0.39±0.12
Prekomjerna tjelesna težina						
	Zdravo	Neoplazma	Priležeće	Zdravo	Neoplazma	Priležeće
TBARS	0.71±0.19	5.39±2.81	0.93±0.23	0.98±0.30	1.94±0.31	0.66±0.15
SOD	1.50±0.81	1.89±0.77	2.63±0.85	2.90±0.51	2.30±0.44	2.78±0.68
KAT	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.00	0.03±0.01	0.05±0.01
GPx	0.17±0.05	0.09±0.03	0.17±0.05	0.37±0.09	0.21±0.04	0.33±0.06
	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

Utjecaj tjelesne težine na koncentraciju TBARS (nmol/mg proteina) i aktivnost AOE (IU/mg proteina) u homogenatima zdravog, neoplastičnog i

priležećeg tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SEM.

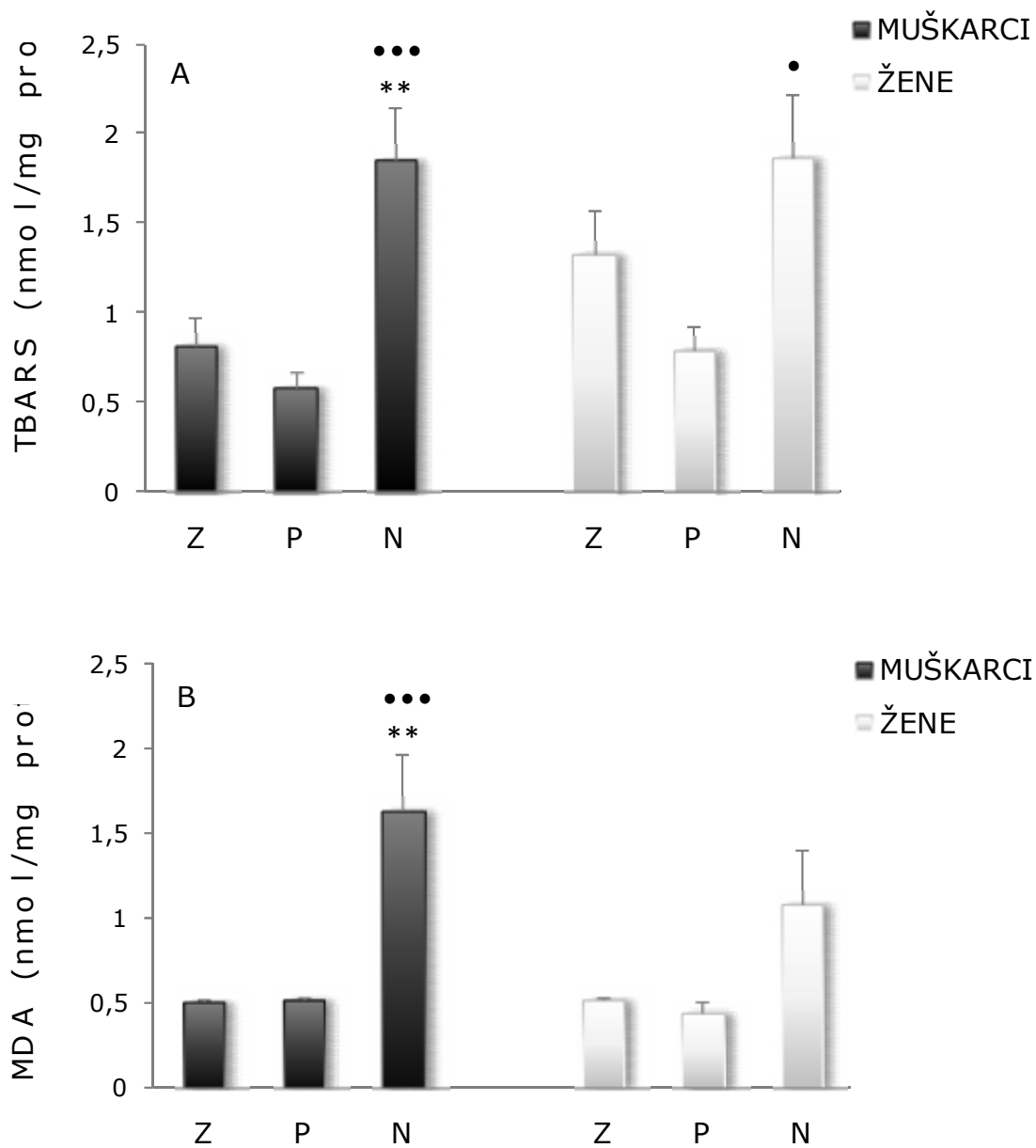
NZ - nema statističke značajnosti između skupina s urednom i prekomjernom tjelesnom težinom u svim pokazateljima u oba spola.

4.3 LPO U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

Proces LPO u homogenatima tkiva bubrega praćen je određivanjem koncentracije TBARS i MDA u homogenatu zdravog, priležećeg i neoplastičnog tkiva u oba spola.

Koncentracija TBARS (Slika 8A) u homogenatu neoplastičnog tkiva u muškaraca statistički je značajno viša u odnosu na zdravo i priležeće tkivo ($p=0.007$; $p=0.001$).

U žena je koncentracija TBARS u homogenatu neoplastičnog tkiva značajno viša u odnosu na priležeće tkivo ($p=0.027$), ali ne i u odnosu na zdravo tkivo. Usporedbom tkiva muškaraca i žena nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji TBARS. Koncentracija MDA (Slika 8B) u muškaraca je značajno viša u homogenatu neoplastičnog tkiva u odnosu na zdravo ($p=0.006$) i priležeće tkivo ($p=0.003$). U žena, iako je zapažen porast koncentracije MDA u homogenatu neoplastičnog tkiva, nema statistički značajnih razlika među ispitivanim tkivima. Usporedbom između spolova nema statistički značajne razlike u koncentraciji MDA u homogenatima zdravog, priležećeg ili neoplastičnog tkiva.

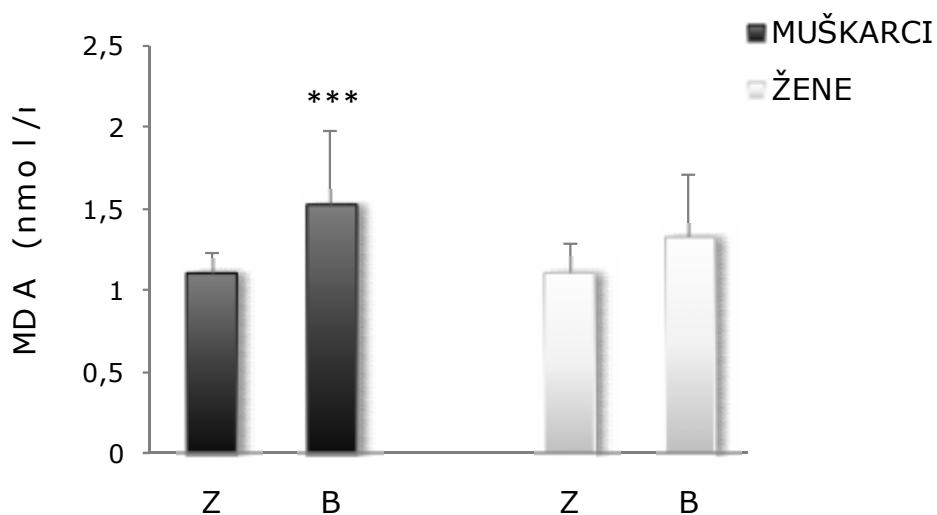


Slika 8. (A) Koncentracija TBARS (nmol/mg proteina) i (B) MDA (nmol/mg proteina) u homogenatima zdravog (Z), priležećeg (P) i neoplastičnog (N) tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM.

- ** $p < 0.01$ neoplastično u odnosu na zdravo tkivo;
- $p < 0.005$ neoplastično u odnosu na priležeće tkivo;
- $p < 0.05$ neoplastično u odnosu na priležeće tkivo.

4.4 LPO U PLAZMI ZDRAVIH LJUDI I OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

Proces LPO u plazmi zdravih i oboljelih osoba praćen je određivanjem koncentracije MDA (Slika 9). Koncentracija MDA u plazmi muškaraca oboljelih od karcinoma bubrega statistički je značajno viša ($p=0.005$) u odnosu na kontrolnu skupinu muškaraca. U oboljelih žena opažena je tendencija porasta koncentracije MDA u plazmi, ali statistička značajnost nije dokazana.



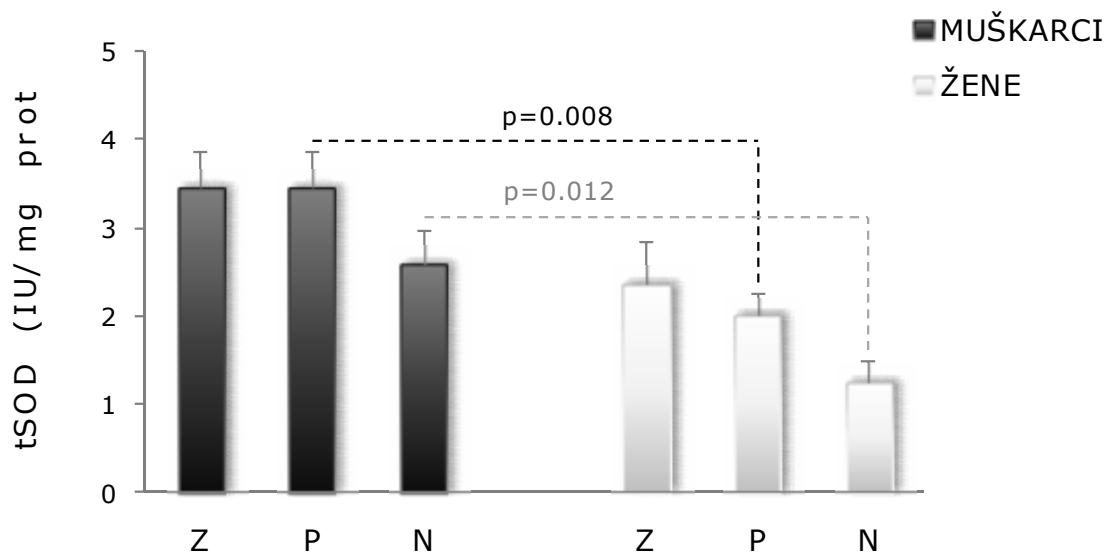
Slika 9. Koncentracija MDA (nmol/ml) u plazmi zdravih kontrolnih skupina (Z) te muškaraca i žena oboljelih od karcinoma bubrega (B). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM.

*** $p=0.005$ oboljele u odnosu na zdrave osobe.

4.5 AKTIVNOST AOE U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

4.5.1 Aktivnost tSOD

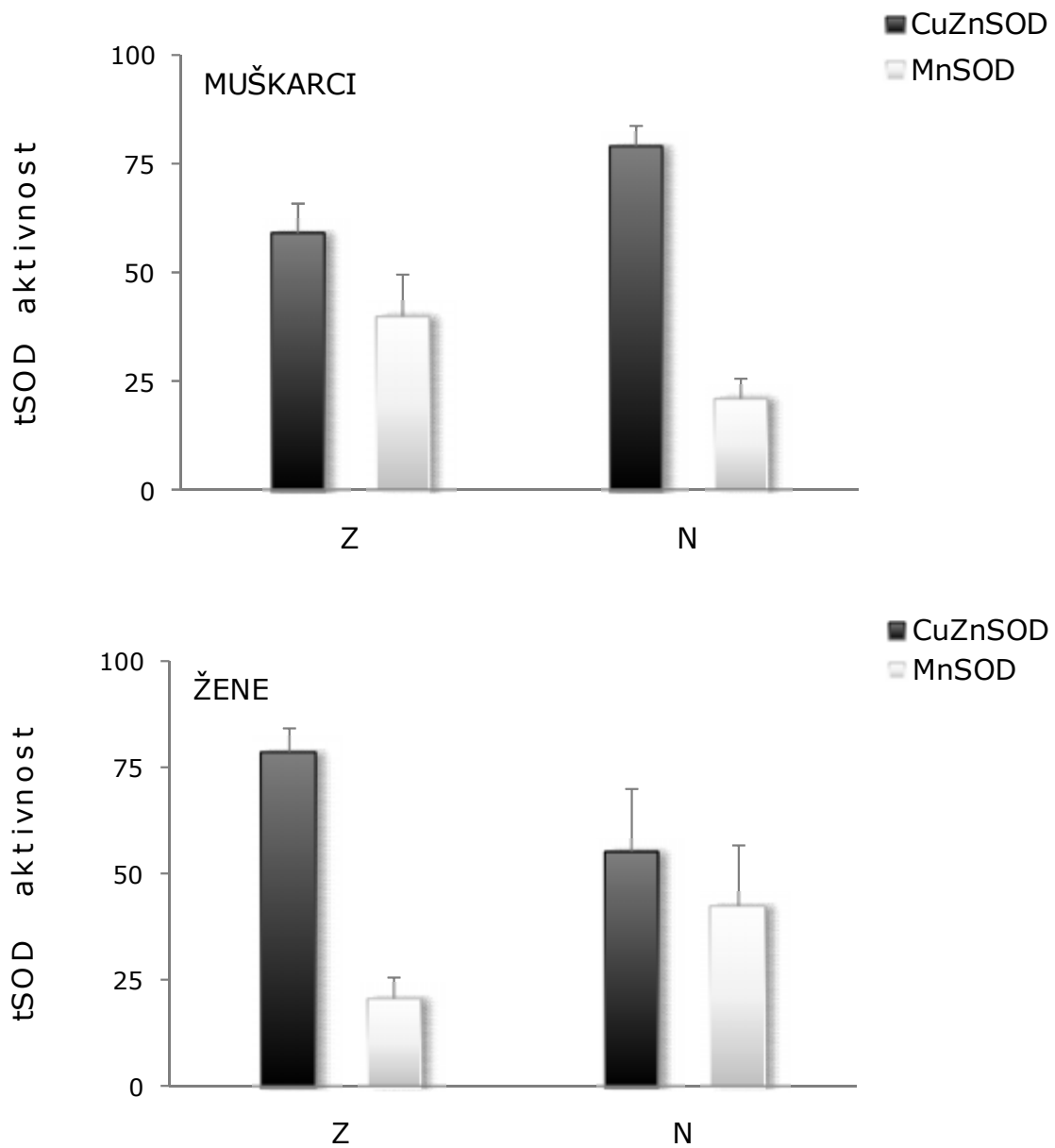
Aktivnost tSOD u homogenatima tkiva bubrega oboljelih osoba prikazana je na slici 10. U oba spola aktivnost tSOD je nepromijenjena u homogenatu neoplastičnog i priležećeg tkiva u odnosu na zdravo tkivo. Međutim, značajne razlike u aktivnosti tSOD zapažene su između oboljelih muškaraca i žena. Muškarci imaju statistički značajno višu aktivnost tSOD u homogenatu neoplastičnog ($p=0.012$) i priležećeg tkiva ($p=0.008$) u odnosu na žene.



Slika 10. Aktivnost tSOD (IU/mg proteina) u homogenatima zdravog (Z), priležećeg (P) i neoplastičnog (N) tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM.

4.5.2 Aktivnost CuZnSOD i MnSOD

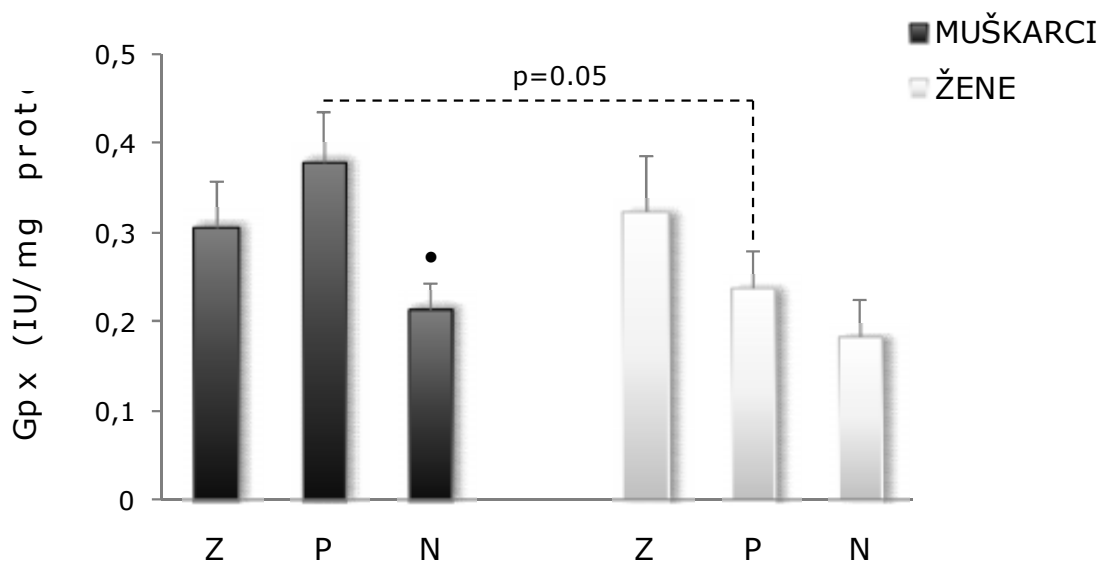
Aktivnost CuZnSOD i MnSOD u homogenatima tkiva bubrega oboljelih osoba prikazana je na slici 11. U homogenatima zdravog tkiva oboljelih od karcinoma bubrega u oba spola aktivnost CuZnSOD i MnSOD bila je različita. U homogenatima zdravog tkiva oboljelih muškaraca udio aktivnosti MnSOD i CuZnSOD bila je gotovo podjednaka u tSOD aktivnosti (CuZnSOD $59\% \pm 12$; MnSOD $41\% \pm 11$). U homogenatima zdravog tkiva oboljelih žena većina tSOD aktivnosti pripadala je aktivnosti CuZnSOD ($81\% \pm 8$), a samo mali dio bio je MnSOD aktivnost ($19\% \pm 9$). U homogenatima neoplastičnog tkiva opažena je spolno ovisna inverzija aktivnosti SOD izoenzima. U žena, uslijed porasta aktivnosti MnSOD i smanjenja aktivnosti CuZnSOD, aktivnost oba izoenzima bila je slična ($56\% \pm 13$ CuZnSOD; $44\% \pm 10$ MnSOD), a u muškaraca je opažen porast CuZnSOD aktivnosti ($79\% \pm 8$) i smanjenje MnSOD aktivnosti ($21\% \pm 7$).



Slika 11. Aktivnost CuZnSOD i MnSOD u homogenatima zdravog (Z) i neoplastičnog (N) tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM (% od tSOD aktivnosti).

4.5.3 Aktivnost GPx

Rezultati aktivnosti GPx u homogenatima tkiva bubrega oboljelih osoba prikazani su na slici 12. GPx aktivnost u homogenatima neoplastičnog tkiva bubrega u muškaraca statistički je značajno niža ($p=0.038$) u odnosu na priležeće tkivo, ali statistički nije značajno promijenjena u odnosu na zdravo tkivo. U žena nema statistički značajne promjene u aktivnosti GPx u homogenatu kako neoplastičnog tako i priležećeg tkiva u odnosu na zdravo tkivo. Usporedbom između spolova izmjerena je granično statistički značajno viša aktivnost GPx ($p=0.05$) u homogenatima priležećeg tkiva bubrega u muškaraca u odnosu na priležeće tkivo u žena.

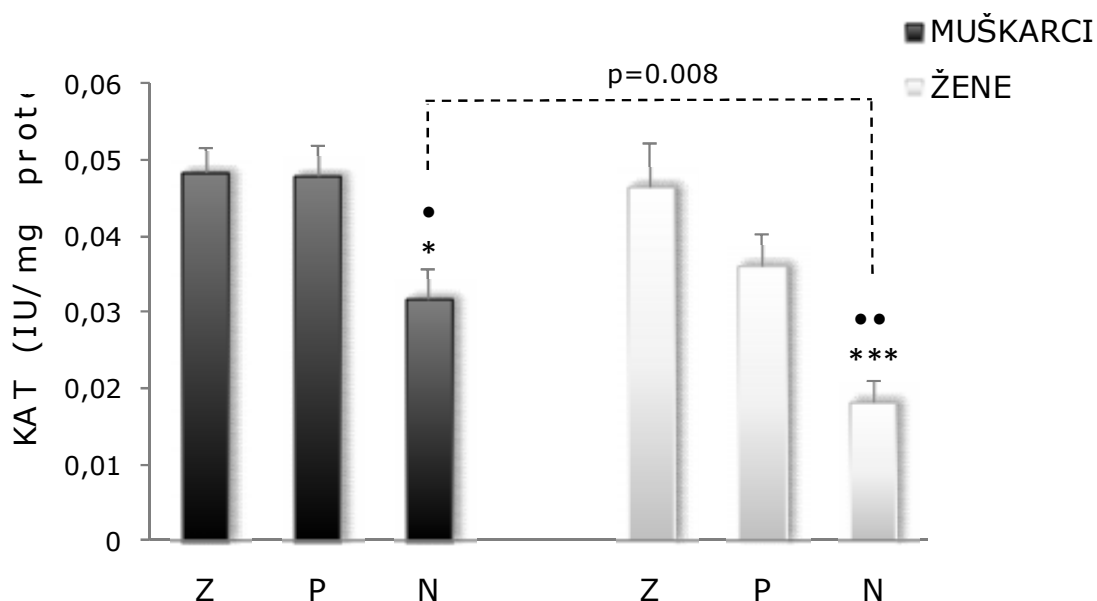


Slika 12. Aktivnost GPx (IU/mg proteina) u homogenatima zdravog (Z), priležećeg (P) i neoplastičnog (N) tkiva bubrega u muškaraca i žena. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM.

- $p<0.05$ neoplastično u odnosu na priležeće tkivo.

4.5.4 Aktivnost KAT

Rezultati aktivnosti KAT u homogenatima tkiva bubrega oboljelih osoba prikazani su na slici 13. Aktivnost KAT je statistički značajno promijenjena u homogenatima neoplastičnog i priležećeg tkiva u muškaraca i žena oboljelih od karcinoma bubrega u odnosu na homogenate zdravog tkiva. Muškarci i žene imaju sniženu KAT aktivnost u homogenatima neoplastičnog tkiva u odnosu na priležeće ($p=0.017$; $p=0.007$) i zdravo tkivo ($p=0.019$; $p=0.001$). Statistički značajno viša vrijednost aktivnosti KAT ($p=0.008$) izmjerena je u homogenatima neoplastičnog tkiva bubrega u muškaraca u odnosu na isto tkivo u žena.

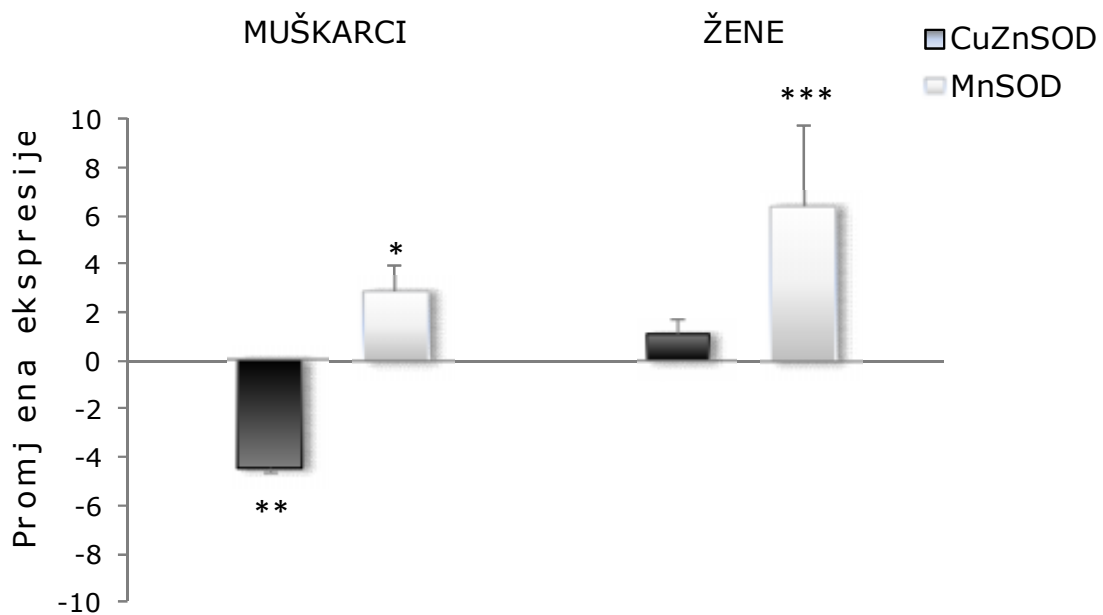


Slika 13. Aktivnost KAT (IU/mg proteina) u homogenatima zdravog (Z), priležećeg (P) i neoplastičnog (N) tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM.

- $p < 0.05$ neoplastično u odnosu na priležeće tkivo;
- $p < 0.01$ neoplastično u odnosu na priležeće tkivo;
- * $p < 0.05$ neoplastično u odnosu na zdravo tkivo;
- *** $p < 0.001$ neoplastično u odnosu na zdravo tkivo.

4.6 EKSPRESIJA GENA ZA CuZnSOD I MnSOD U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

Ekspresija gena za CuZnSOD i MnSOD u homogenatima tkiva bubrega oboljelih osoba prikazana je na slici 14. U oboljelih muškaraca statistički je značajno smanjena ekspresija za gen CuZnSOD u homogenatima neoplastičnog tkiva (faktor 4.465; $p=0.0085$) u usporedbi sa homogenatima zdravog tkiva. U oboljelih žena ekspresija gena za CuZnSOD ostala je nepromijenjena u homogenatima neoplastičnog tkiva u usporedbi sa zdravim tkivom (faktor 1.11; $p=0.92$). Međutim, ekspresija gena za MnSOD značajno je porasla u homogenatima neoplastičnog tkiva kako u muškaraca (faktor 2.778; $p=0.039$) tako i žena (faktor 6.386; $p=0.001$) u usporedbi sa homogenatima zdravog tkiva.



Slika 14. PCR analiza ekspresije gena za CuZnSOD i MnSOD u homogenatima neoplastičnog u komparaciji sa zdravim tkivom bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Relativne promjene uspoređene su u odnosu na kontrolu (definirana kao 1) i izračunate upotrebom $2^{-\Delta\Delta CT}$ metode. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM.

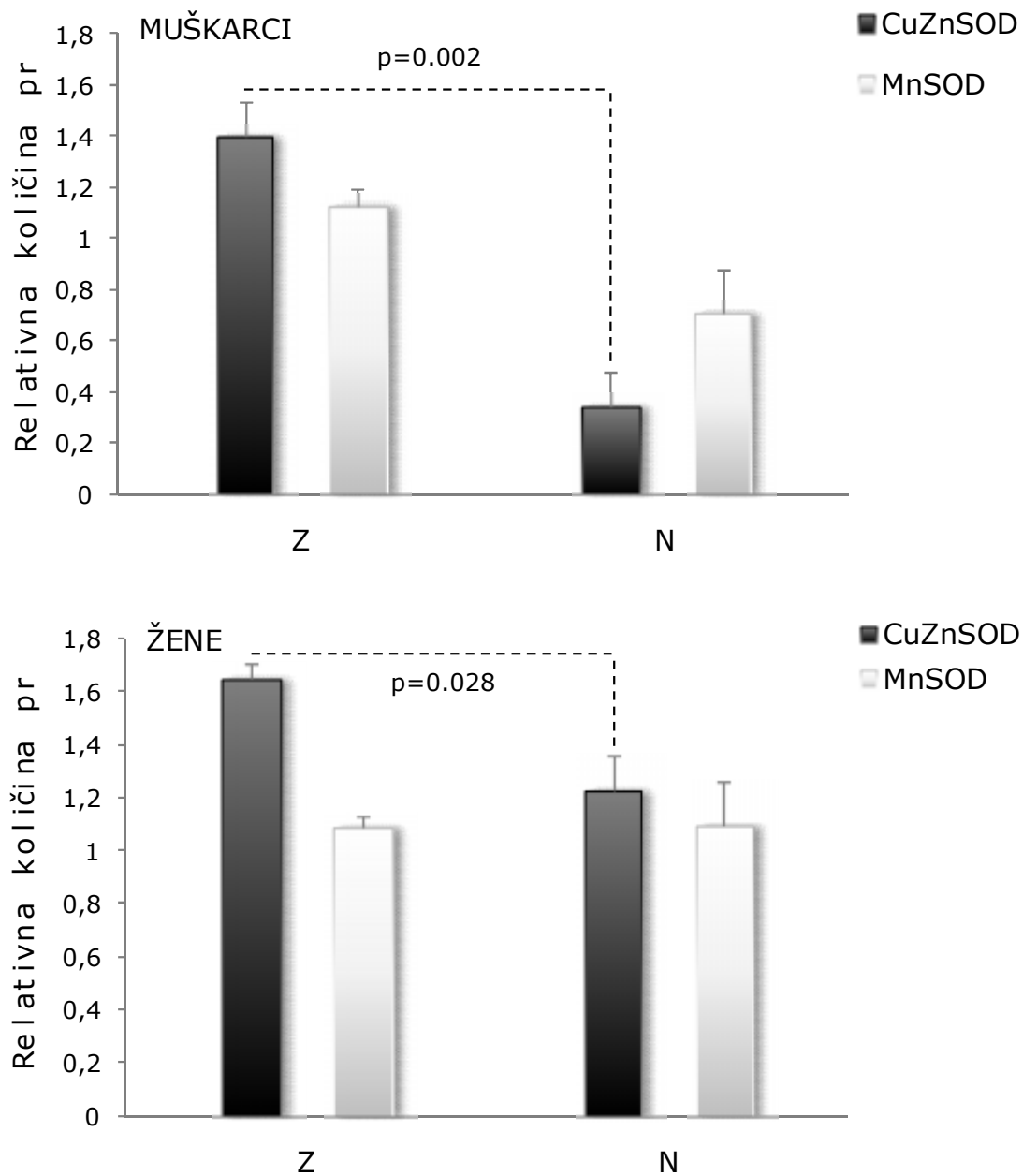
*** $p < 0.001$ izraženost gena za MnSOD u homogenatima neoplastičnog u odnosu na zdravo tkivo;

** $p < 0.01$ izraženost gena za CuZnSOD u homogenatima neoplastičnog u odnosu na zdravo tkivo;

* $p < 0.05$ izraženost gena za MnSOD u homogenatima neoplastičnog u odnosu na zdravo tkivo.

4.7 KOLIČINA CuZnSOD I MnSOD PROTEINA U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

Kao što je prikazano na slici 15, u oboljelih muškaraca i žena nije izmjerena promjena u količini MnSOD proteina između homogenata zdravog i neoplastičnog tkiva. Međutim, u oba spola statistički je značajno promijenjena količina CuZnSOD proteina u homogenatima neoplastičnog tkiva muškaraca ($p=0.002$) i žena ($p=0.028$) u usporedbi sa homogenatima zdravog tkiva.

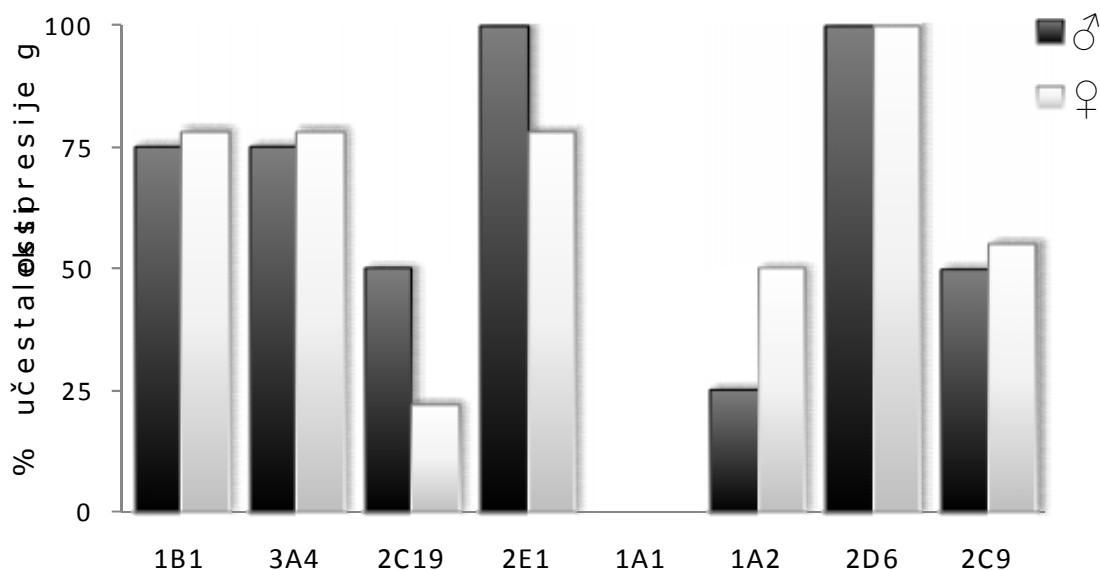


Slika 15. Relativna količina proteina CuZnSOD i MnSOD u homogenatima zdravog (Z) i neoplastičnog (N) tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM. Promjena izraženosti proteina = intenzitet obojenja koji odgovara proteinu CuZnSOD i MnSOD relativno u odnosu na obojenje proteina ERK-2 u istom uzorku.

4.8 EKSPRESIJA GENA RAZLIČITIH P450 IZOFORMI U HOMOGENATIMA TKIVA BUBREGA OBOLJELIH OSOBA U OBA SPOLA

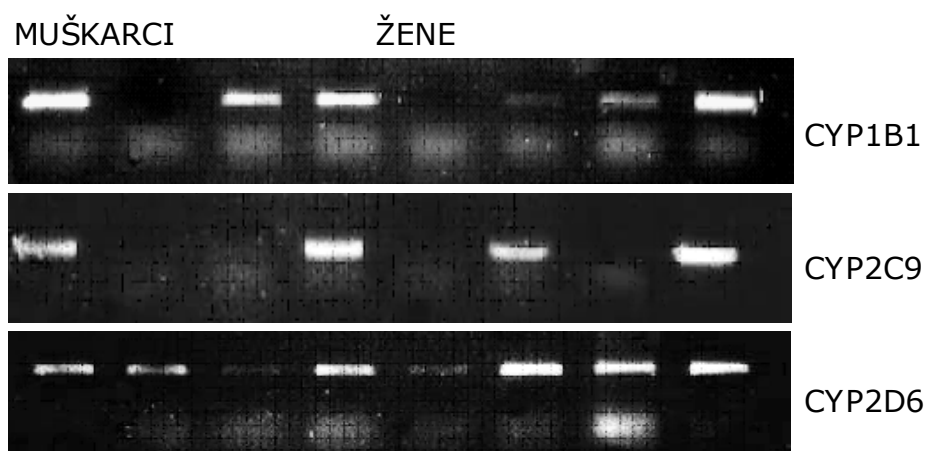
4.8.1 Ekspresija gena u homogenatima zdravog tkiva

U homogenatima zdravog tkiva bubrega u muškaraca i žena oboljelih od karcinoma bubrega odredili smo postotak ekspresije gena (Slika 16) i ekspresiju (mRNK) gena za različite izoforme P450 (Slika 17). U oba spola u homogenatima zdravog tkiva bubrega nije eksprimiran gen za CYP1A1. Nasuprot tome, geni za CYP2D6 eksprimirani su u svim uzorcima zdravog tkiva muškaraca i žena. Geni za pojedine izoforme P450 izraženi su u jednakom postotku zdravog tkiva u muškaraca i žena i to gen za CYP1B1 i CYP3A4 (u 78% žena i 75% muškaraca) i gen za CYP2C9 (u 55% žena i 50% muškaraca). Neki od gena P450 izraženi su u različitom postotku ovisno o spolu. Tako je, primjerice, gen za CYP2C19 izražen u 50% uzoraka u muškaraca i 22% žena, CYP2E1 u 100% uzoraka u muškaraca i 78% žena, a gen za CYP1A2 u 50% uzoraka u žena i 25% muškaraca.



Slika 16. Učestalost ekspresije gena (u postocima) pojedinih P450 izoformi

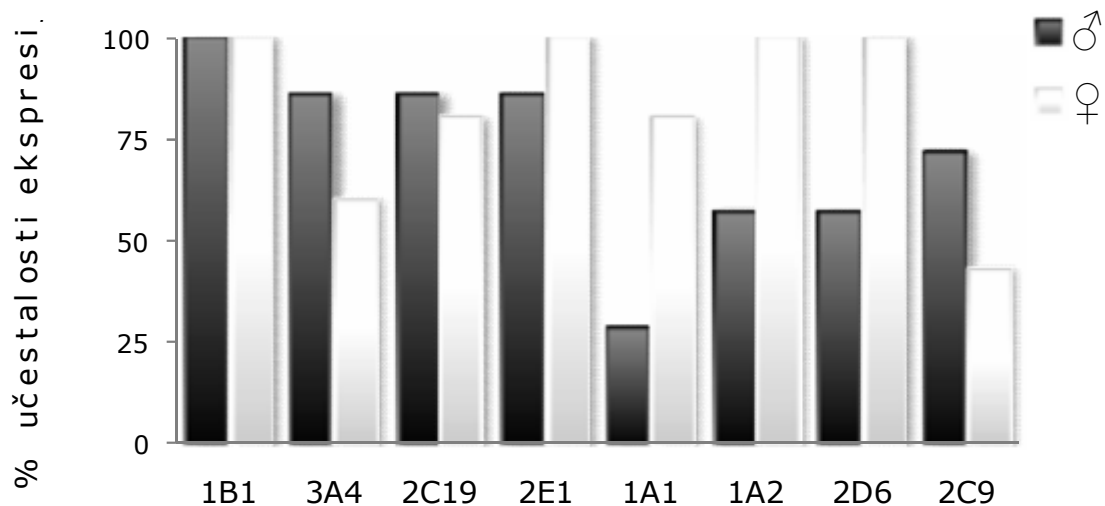
u homogenatima uzoraka zdravog tkiva bubrega u muškaraca (♂) i žena (♀).



Slika 17. Ekspresija gena (mRNK) za CYP1B1, CYP2C9 i CYP2D6 u homogenatima zdravog tkiva bubrega u oboljelih muškaraca i žena.

4.8.2 Ekspresija gena u homogenatima priležućeg tkiva

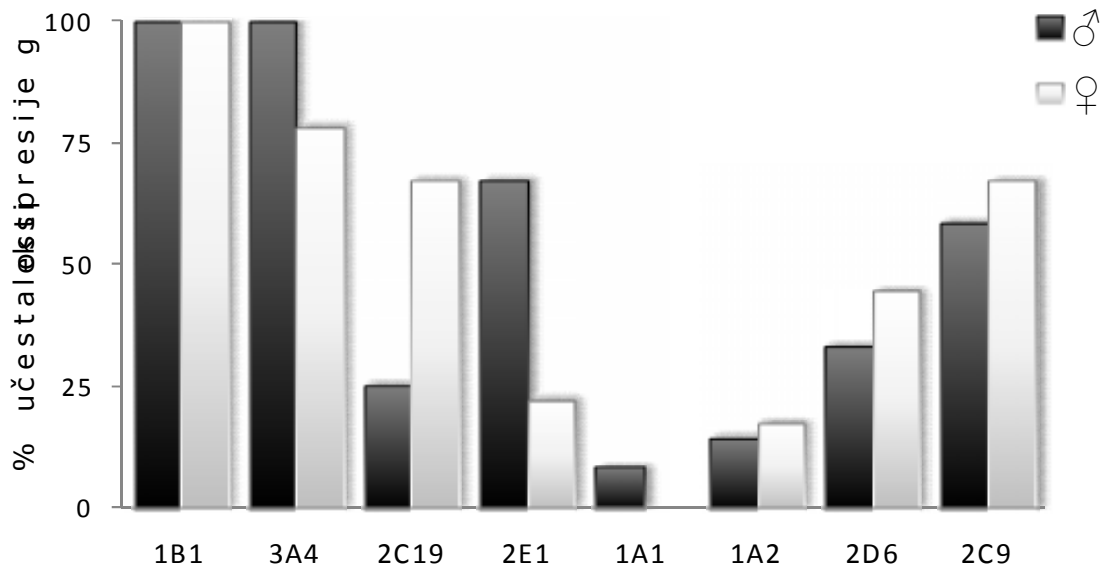
Rezultati ekspresije pojedinih izoformi P450 u homogenatima priležućeg tkiva bubrega u muškaraca i žena prikazani su na slici 18. Za razliku od zdravog tkiva, u homogenatima tkiva koje priliježe uz novotvorinu eksprimirane su u oba spola u manjem ili većem postotku sve izoforme P450. Podjednaku ekspresiju gena u uzorcima u oba spola utvrdili smo za CYP1B1 (100%), CYP2C19 (85% muškarci, 80% žene) i CYP2E1 (86% muškarci i 100% žena). CYP3A4 i CYP2C9 više su eksprimirani u muškaraca (86% i 72%) nego u žena (60% i 43%). Nasuprot tome, geni za CYP1A1, CYP1A2 i CYP2D6 više su eksprimirani u žena (80%, 100%, 100%) nego u muškaraca (29%, 57%, 57%).



Slika 18. Učestalost ekspresije (u postocima) pojedinih P450 izoformi u homogenatima uzoraka priležećeg tkiva uz novotvorinu bubrega u muškaraca (♂) i žena (♀).

4.8.3 Ekspresija gena u homogenatima neoplastičnog tkiva

Ekspresija različitih izoformi P450 u homogenatima neoplastičnog tkiva bubrega prikazana je na slici 19. Rezultati analize pokazali su da je mRNA za CYP1B1 eksprimirana u svim uzorcima neoplastičnog tkiva, kako u muškaraca tako i u žena (100%). Najmanja ekspresija u uzorcima u oba spola nađena je za gen CYP1A2 (14% muškaraca i 17% žena). U oba spola podjednako su eksprimirani geni za CYP3A4 (100% muškaraca i 78% žena), CYP2D6 (33% muškaraca i 44% žena) i gen za CYP2C9 (58% muškaraca i 67% žena). Ekspresija gena za CYP2E1 više je zastupljena u uzorcima neoplastičnog tkiva u muškaraca (67%) nego u žena (22%). Ekspresija za gen CYP2C19 jače je izražena u žena (66%) nego u muškaraca (28%). Gen za CYP1A1 eksprimiran je samo u muškaraca (8%).

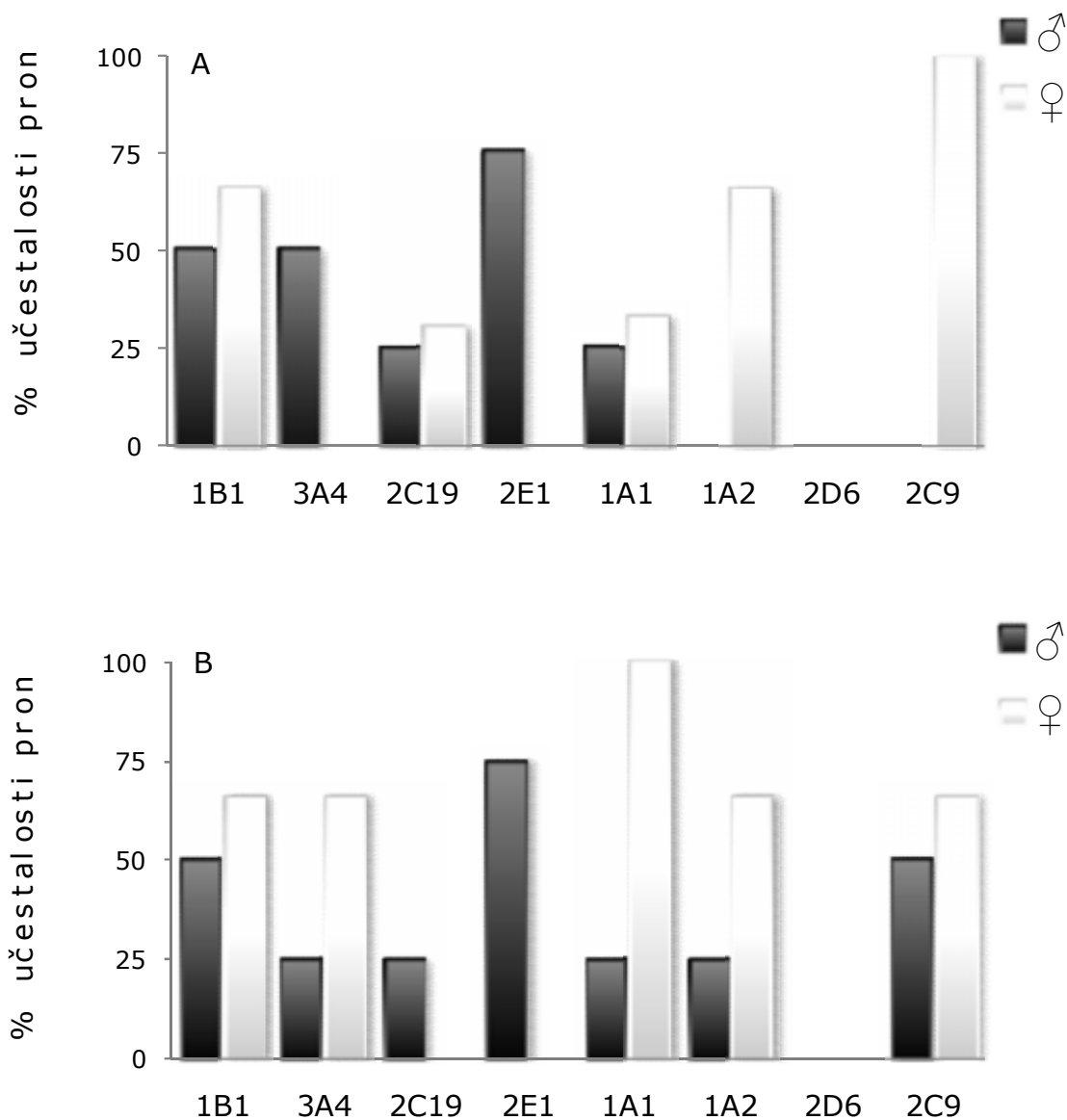


Slika 19. Učestalost ekspresije (u postocima) pojedinih P450 izoformi u homogenatima uzoraka neoplastičnog tkiva bubrega u muškaraca (♂) i žena (♀).

4.8.4 Učestalost promjene u ekspresiji P450 gena između homogenata zdravog, priležećeg i neoplastičnog tkiva bubrega

Učestalost promjene u ekspresiji različitih izoformi P450 između homogenata zdravog, priležećeg i neoplastičnog tkiva bubrega u oba spola prikazana je na slici 20.

Uz podatke u koliko je pojedinačnih tkiva (zdravom, priležećem i neoplastičnom) u bolesnika oba spola eksprimirana mRNK za izoforme P450, važno je uočiti i učestalost promjene u ekspresiji mRNK za svaku pojedinu izoformu, uspoređujući međusobno sva tri tkiva u istog bolesnika. Dobiveni podaci ukazuju u koliko slučajeva dolazi do promjene u ekspresiji (paljenja ili gašenja transkripcije gena) za određenu izoformu između zdravog i neoplastičnog tkiva u muškaraca i žena (Slika 20A) i zdravog nasuprot priležećeg tkiva (Slika 20B).



Slika 20. Učestalost promjene u ekspresiji (u postocima) različitih izoformi P450 između homogenata uzorka zdravog, priležećeg i neoplastičnog tkiva bubrega u muškaraca (♂) i žena (♀). (A) zdravo nasuprot neoplastičnom tkivu, (B) zdravo nasuprot priležećem tkivu.

Do promjene ekspresije gena za CYP2D6 (u odnosu na zdravo tkivo) nije došlo u neoplastičnom tkivu niti u jednog muškog ili ženskog bolesnika. Do promjene u ekspresiji gena za CYP1B1 u neoplastičnom tkivu u odnosu na zdravo tkivo došlo je u 50% muškaraca i 66% žena, za CYP2C19 i

CYP1A1 u 25% muškaraca i 30% žena. CYP3A4 i CYP2E1 promijenjeni su samo u muškaraca (50% odnosno 75%), a CYP1A2 i CYP2C9 samo u žena (66% odnosno 100%). Uspoređujući postotak promjene ekspresije pojedinih izoformi između zdravog i priležecog tkiva, uočena je razlika u odnosu na zdravo i neoplastično tkivo, osim za CYP1B1 i CYP2E1. U priležecem tkivu promjene u ekspresiji CYP2C9 i CYP1A2 događaju se, osim u žena (što je bio slučaj u neoplastičnom tkivu) i u muškaraca (50% odnosno 25%). Nasuprot tome, postotak ekspresije za CYP3A4 mijenja se osim u muškaraca (kao u neoplastičnom tkivu) i u žena (66%). U žena je postotak ekspresije za CYP1A1 znatno veći u priležecem tkivu nego u neoplastičnom tkivu u odnosu na zdravo tkivo (100% nasuprot 33%). Ekspresija gena za CYP2C19 mijenja se u priležecem tkivu samo u muškaraca. Uspoređujući promjene u ekspresiji gena za različite izoforme u zdravom i neoplastičnom tkivu bubrega u oba spola (Tablica 8) zapaženo je da u većini P450 izoformi ne dolazi do značajne promjene u ekspresiji (CYP1A1, CYP2C9, CYP1B1, CYP3A4) dok je ta promjena podjednaka u muškaraca i žena za gen CYP2D6 (u oba spola u neoplastičnom tkivu smanjuje se postotak ekspresije). Međutim, ekspresija gena za CYP2E1 i CYP2C19 mijenja se u neoplastičnom tkivu u ovisnosti o spolu pa se tako u muškaraca ekspresija gena za CYP2E1 u neoplastičnom tkivu ne mijenja, a u žena se smanjuje dok se ekspresija gena za CYP2C19 također u muškaraca ne mijenja, a u žena se povećava.

Tablica 8. Promjena ekspresije gena P450 u muškaraca i žena oboljelih od karcinoma bubrega.

P450	muškarci		promjena Z:N	žene		promjena Z:N
	Z	N		Z	N	
1A1	0 (0/12)	8.3 (1/12)	nema	0 (0/9)	0 (0/9)	nema
2C9	50 (6/12)	58 (7/12)	nema	55 (5/9)	67 (6/9)	nema
1B1	75 (9/12)	100 (12/12)	±	78 (7/9)	100 (9/9)	±
3A4	75 (9/12)	100 (12/12)	±	78 (7/9)	78 (7/9)	nema
2D6	100 (12/12)	33 (4/12)	↓	100 (9/9)	44 (4/9)	↓
2E1	100 (12/12)	67 (8/12)	±	78 (7/9)	22 (2/9)	↓
2C19	50 (6/12)	25 (3/12)	±	22 (2/9)	67 (6/9)	↑

Proporcija ekspresije gena te promjena u ekspresiji gena za različite izoforme P450 između homogenata uzoraka neoplastičnog (N) i zdravog (Z) tkiva bubrega oboljelih osoba u oba spola. Rezultati su prikazani kao postotak bolesnika (u muškaraca n=12, u žena n=9) oboljelih od karcinoma bubrega koji eksprimiraju specifične CYP izoforme. U zagradi: broj bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega koji izražavaju specifičnu CYP izoformu u odnosu na sve muškarce ili sve žene obuhvaćene istraživanjem.

5 RASPRAVA

Karcinom bubrega je najčešća zloćudna novotvorina bubrega u odraslih osoba¹¹⁵. Uslijed porasta stope incidencije u većini zemalja te visoke stope smrtnosti¹¹⁶ spada u najznačajnije novotvorine urotakta. U Europi je najveća stopa incidencije karcinoma bubrega opažena u Istočnim zemljama te Njemačkoj. Niža stopa incidencije zabilježena je u većini azijskih i afričkih zemalja te u nekim dijelovima Južne Amerike^{117,118}. U svijetu je 2000.g. zabilježeno oko 189 000 karcinoma bubrega od čega dvije trećine u razvijenim zemljama. Karcinom bubrega je dvostruko učestaliji u muškaraca u odnosu na žene¹⁰⁵. U razdoblju od 1998.g. do 2002.g. u Sjedinjenim Američkim Državama otkriveno je 16.2 karcinoma bubrega u muškaraca i 8 u žena na 100 000 stanovnika. Čimbenici usko povezani s povišenim rizikom za pojavu karcinoma bubrega su pušenje, pretilost i visoki krvni tlak, iako povećani rizik imaju i bolesnici podvrgnuti hemodijalizi, transplantaciji bubrega, radioterapiji te bolesnici na antihipertenzivnoj terapiji. Podaci o povezanosti karcinoma bubrega s uporabom analgetika, učincima prehrane i izloženosti određenim kemikalijama (azbest, organska otapala) još su uvijek višeznačni¹¹⁹. Podaci ovog istraživanja pokazuju povećanu razinu LPO izražene kao koncentracija TBARS u neoplastičnom tkivu bubrega muških i ženskih bolesnika. Međutim, povećanje razine LPO izražene kao koncentracija MDA (preciznija metoda) opaženo je samo u muškaraca. Povećanje razine LPO u plazmi također je utvrđeno isključivo u oboljelih muškaraca. Rezultati većeg broja istraživanja podupiru pretpostavku o povezanosti LPO i nastanka karcinoma bubrega te svrstavaju karcinom bubrega u skupinu novotvorina sa znatnim promjenama u ravnoteži oksidacijsko /antioksidacijskog sustava^{120,121}. Gago-Dominguez nedavno je predložio LPO kao jednu od ključnih čimbenika u razvoju karcinoma bubrega. Naime, RKV koje uzrokuju LPO oštećuju i DNK izazivajući genetske mutacije, aktiviraju protoonkogene i/ili inaktiviraju tumor supresorske

gene te mogu dovesti do preobrazbe zdrave u zloćudnu stanicu. Opisani proces karakterističan je za sporo proliferirajuća tkiva (npr. jetra, bubreg) dok u brzo proliferirajućim tkivima (npr. koštana srž, limfatično tkivo, koža) vjerojatno dolazi do apoptoze oštećenih preneoplastičnih ili neoplastičnih stanica¹²². Zdravo tkivo bubrega u čovjeka sadrži veliki broj peroksisoma. U stanicama karcinoma bubrega peroksisomi su potpuno odsutni. Posljedica nedostatka peroksisoma je narušeni metabolizam masnih kiselina¹²³. Tkivo karcinoma bubrega kod čovjeka u odnosu na priležeće tkivo pokazuje visoki sadržaj 8-OH-dG¹²⁴ kao i proizvoda LPO (HNE)⁶⁶. Način na koji se stvara 8-OH-dG je slijedeći: H₂O₂ slobodno prolazi kroz membrane stanice i ulazi u citoplazmu¹²⁵. U prisustvu unutarstaničnog «katalitičkog» željeza ili bakra putem Fentonove reakcije stvara se vrlo toksičan i reaktivan OH⁻• koji uzrokuje nastanak 8-OH-dG i potiče proces LPO. Navedeni podaci ukazuju na veću izloženost DNK karcinoma bubrega djelovanju RKV u odnosu na priležeće tkivo. Poznato je da RKV mogu sudjelovati u složenom procesu karcinogeneze od inicijacije do zloćudne preobrazbe¹²⁶. Histokemijska ispitivanja (posebice u karcinomu bubrega u ljudi) pokazala su kao glavne izvore stvaranja RKV neoplastične stanice, endotelne stanice i makrofage. Postavlja se pitanje koji je značaj oksidacijskog stresa u novotvorinama? Toyokuni¹²⁷ pretpostavlja da oksidacija u neoplastičnim stanicama neprekidno aktivira transkripcijske faktore poput NF-κB puta unutarstaničnog prijenosa poruka te uzrokuje aktivaciju i ekspresiju protoonkogeni kao što su c-fos, c-jun i c-myc. Međutim, postoje i oprečni podaci. Primjerice, imunohistokemijski je pokazana slabija prisutnost HNE (pokazatelj LPO) u karcinomu bubrega tipa svijetlih stanica u odnosu na zdravo tkivo bubrega⁶⁶.

U literaturi postoji niz podataka o povezanosti oksidacijskih procesa i većeg rizika za razvitak karcinoma bubrega u osoba s prekomjernom tjelesnom težinom i/ili visokim krvnim tlakom^{128,129}. Rezultati ovog istraživanja nisu potvrdili navedeno - porast oksidacijskih procesa u ispitanoj populaciji bolesnika nije posljedica prekomjerne tjelesne težine

niti povišenog krvnog tlaka. Statistička analiza koncentracije MDA i TBARS u neoplastičnom, priležecem i zdravom tkivu bolesnika oba spola, prekomjerne ili uredne tjelesne težine (BMI iznad odnosno ispod 25) kao i s visokom ili fiziološkom vrijednosti krvnog tlaka (visoki krvni tlak – vrijednost u mirovanju veća od 140/90 mmHg) nije pokazala razlike između promatranih skupina. Osim oksidacijskog stresa, u novotvorinama su promijenjene ekspresija i/ili aktivnost antioksidacijskih enzima. Rezultati disertacije pokazali su statistički nepromijenjenu aktivnost tSOD u tkivu karcinoma bubrega u odnosu na zdravo i priležeće tkivo u oba spola, iako je tSOD aktivnost u neoplastičnom tkivu kod oba spola imala tendenciju smanjenja. GPx aktivnost bila je smanjena samo u neoplastičnom tkivu oboljelih muškaraca, a aktivnost KAT bila je smanjena u neoplastičnom tkivu oba spola. Značajno je napomenuti nižu aktivnost tSOD i KAT u neoplastičnom tkivu u žena u odnosu na neoplastično tkivo u muškaraca. Ti se podaci podudaraju s većinom podataka iz literature koji pokazuju promijenjenu aktivnost AOE kao što su tSOD, GPx i KAT u većini karcinoma (tako i karcinoma bubrega) u ljudi¹³⁰. Ta se aktivnost može mijenjati od značajno nižih do viših u odnosu na zdravo ili priležeće tkivo^{131,132}. Ova disertacija je po prvi puta pokazala postojanje razlike u aktivnosti AOE u neoplastičnom tkivu bubrega između muškaraca i žena. Niža aktivnost tSOD i KAT u žena može biti odraz stvaranja manjih količina H₂O₂. Naime, ženke štakora stvaraju upola manju količinu H₂O₂ u odnosu na mužjake¹³³.

Rezultati disertacije pokazali su značajnu razliku u izoformnim oblicima tSOD (CuZnSOD i MnSOD) među bolesnicima oba spola i u zdravom i u neoplastičnom tkivu. Aktivnost tSOD je u uzorcima zdravog tkiva u oba spola većim dijelom rezultat aktivnosti CuZnSOD, ali je u muškaraca aktivnost MnSOD viša nego u žena. U neoplastičnom tkivu u muškaraca opaženo je povećanje aktivnosti CuZnSOD i smanjenje aktivnosti MnSOD dok se u žena aktivnost CuZnSOD smanjila, a aktivnost MnSOD je porasla. Povećanje aktivnosti MnSOD u žena bilo je popraćeno povećanom

ekspresijom gena za MnSOD, iako se količina proteina za izoformu nije promijenila. Opaženi rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja ukazuju na promjene u aktivnosti MnSOD u većini neoplazmi i neoplastičnih linija¹³⁴. U ljudi je aktivnost AOE poput CuZnSOD i MnSOD u većini različitih tipova neoplastičnih stanica raznih organa najčešće niska, iako adenokarcinomi pokazuju i povišenu aktivnost MnSOD i KAT¹³⁴. MnSOD je uz GPx i KAT neposredno uključen u metabolizam H₂O₂. Niska aktivnost GPx kao i KAT u karcinomu bubrega granularnog tipa stanica kod ljudi ukazuje da određenih tipovi neoplastičnih stanica ne mogu odgovarajuće odstraniti H₂O₂¹³⁴. Razina H₂O₂ kao i O₂^{-•} u neoplastičnim stanicama ovisi o regulaciji AOE, ali i vrsti novotvorine¹³⁴. Stanice glomerula bubrega inkubirane s H₂O₂ povećavaju aktivnost MnSOD dok je aktivnost CuZnSOD nepromijenjena u odnosu na netretirane stanice¹³⁵. MnSOD osigurava obranu od oksidacijskog oštećenja izazvanu RKV najviše unutar mitohondrija jer se nalazi u mitohondrijskom matriksu gdje je oksidacijski stres najizraženiji. Zaključci niza istraživanja predlažu da povišenjem aktivnosti MnSOD dolazi do inhibicije zloćudnog fenotipa stanice, djelomično i zbog pomaka oksidacijsko/antioksidacijskog statusa u korist antioksidansa jer se kod smanjene ekspresije i/ili aktivnosti MnSOD smanjuje kapacitet odstranjivanja povećane količine unutarstaničnih peroksida^{136,137}. Li i sur.¹³⁸ pretpostavili su da je gen za MnSOD tumor supresor jer je u istraživanju sa ljudskim stanicama karcinoma dojke transfekcija gena za MnSOD i povišena aktivnost MnSOD potisnula metastatski kapacitet. Dvostruko veća incidencija karcinoma bubrega u muškaraca u odnosu na žene može biti uzrokovana i djelovanjem spolnih hormona. Poznata je zaštitna uloga estrogena od LPO¹³⁹. Rezultati ove disertacije pokazali su povišenu razinu LPO samo u muškaraca (tkivo bubrega i plazma). Viša razina LPO može djelomično biti uzrokovana i relativno velikom individualnom raznolikosti u oksidacijsko/antioksidacijskim pokazateljima¹⁴⁰. U radu Sobocanec i

sur.¹⁴¹ individualna raznolikost bila je najveća za GPx (36%), a manja za KAT (19%) i SOD (14%) aktivnost.

Osim opisanih mehanizama, u eukariotskim organizmima razvili su se i dodatni sustavi koji štite od kemijskih oštećenja. Jedan od danas poznatih zaštitnih sustava sastoji se od proteina koji spadaju u hem oksidoreduktaze, a čine sustav citokroma P450. P450 kataliziraju reakcije u procesima biosinteze steroidnih hormona kao i reakcije u metabolizmu ksenobiotika, stvarajući pritom reaktivne metabolite - slobodne radikale koji reagiraju sa staničnim makromolekulama (DNK, RNK, proteini, lipidi) ili podliježu detoksikaciji u reakciji sa staničnim antioksidansima. Pojačana aktivacija P450 izoformi dovodi do stvaranja RKV što modulira oksidacijsko/antioksidacijski status stanice te ovisno o spolu i starosti može utjecati na pojavu spontanih tumora. P450 proteini tijekom oksidoredukcijskih procesa stvaraju radikale $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . Stupanj oksidoredukcije razlikuje se kod pojedinih izoformi P450 pri čemu se CYP2E1 smatra najaktivnijim u procesu, a povišena ekspresija gena za CYP2E1 u stanici izrazito povećava LPO⁷⁷. Promjene P450 u ekstrahepatičkim tkivima pokazale su se značajnima za bolesti poput ateroskleroze, povišenog krvnog tlaka i novotvorina. Potrebno je razlikovati promjenu ukupne količine P450 proteina od promjena u količini pojedinih P450 izoformi. Osim važne uloge u karcinogenezi uslijed stvaranja slobodnih radikala, sustav P450 ima važnu ulogu u karcinogenezi jer sudjeluje u metabolizmu velikog broja ksenobiotika što može dovesti do aktivacije prokarcinogena i protutumorskih lijekova te karcinogenog ili toksičnog učinka. Većina se kemijskih prokarcinogena, kako egzogenih (ksenobiotici) tako i endogenih (steroidni hormoni) biotransformira u aktivne oblike kako bi postali karcinogeni, a ulogu biotransformatora imaju upravo proteini sustava P450. Zbog navedenih činjenica, u ovoj disertaciji ispitan je veći broj P450 izoformi u neoplastičnom, priležećem i zdravom tkivu osoba oboljelih od karcinoma bubrega. Rezultati su pokazali prisutnost gena za CYP1B1 u 75% uzoraka

zdravog tkiva u oba spola, uz povećanu ekspresiju gena za CYP1B1 u neoplastičnom kao i priležećem tkivu (100%). CYP1B1 je ključan enzim za oksidacijski metabolizam niza endogenih i egzogenih tvari. McFadyen i sur.¹⁰² su 2004.g. utvrdili prisutnost CYP1B1 u neoplastičnom tkivu 70% bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega, a pri tome gen nije bio eksprimiran u zdravom tkivu bubrega. Suprotno navedenom radu, istraživanja Yen-Ling Cheung i sur.¹⁴² otkrila su podjednaku ekspresiju gena za CYP1B1 u neoplastičnom i zdravom tkivu bubrega. U karcinomu dojke se prema pojedinim autorima ekspresija gena za CYP1B1 javlja isključivo u neoplastičnom tkivu dok je prema drugim autorima zabilježena i u neoplastičnom i u zdravom tkivu^{100, 101}. Obzirom na pojavu CYP1B1 u nizu novotvorina, Murray i sur.⁹⁹ pretpostavili su da bi CYP1B1 mogao biti relativno specifičan tumorski biljeg, ali se ipak čini da njegova uloga i ekspresija u pojedinim vrstama novotvorina još uvijek nije dovoljno razjašnjena. U ovom istraživanju gen za CYP1A1 nije bio eksprimiran u zdravom tkivu bubrega u oba spola, u priležećem tkivu uz novotvorinu bio je eksprimiran kod 29% muškaraca i čak 80% žena, a u tkivu karcinoma bubrega u muškaraca ekspresija se smanjila na 14% dok kod žena uopće nije bio eksprimiran. Ekspresija gena za CYP1A2 izraženija je u zdravom i priležećem tkivu u odnosu na neoplastično tkivo, pri čemu su razine više u žena. CYP1A1 i CYP1A2 odgovorni su za metaboličku aktivaciju nekoliko prokarcinogena. Postoje i podaci koji govore o zaštitnoj ulozi CYP1A1 i CYP1A2 u uvjetima povišene razine RKV, pri čemu se smatra da uklanjaju proizvode LPO¹⁴³. Znatno veća ekspresija gena za CYP1A2 zabilježena u ovom istraživanju u zdravom i priležećem tkivu kod žena u odnosu na odgovarajuće tkivo u muškaraca mogla bi objasniti povišenu razinu LPO isključivo u neoplastičnom tkivu muškaraca. Rintala i sur.¹⁰³ pokazali su znatno veću aktivnost CYP1A1 u zdravom tkivu bubrega kod bolesnika sa slabo diferenciranim ili metastatskim karcinomom u odnosu na bolesnike sa dobro diferenciranim karcinomom bubrega bez metastaza. Veća ekspresija gena za CYP1A1 u žena u ovoj disertaciji ne

može se objasniti navedenim podatkom jer u bolesnica nisu opažene metastaze.

U bolestima jetre također su zapažene slične promjene na razini pojedinih P450 proteina. Najčešće promjene pojedinih P450 izoformi zabilježene su u CYP1A1 i CYP1A2 u smislu smanjene transkripcije, translacije i aktivnosti proteina.

U ovom istraživanju je ekspresija gena za CYP2E1 bila podjednaka u zdravom i priležecem tkivu u oba spola (75-100%), ali je u tkivu karcinoma bubrega kod žena ekspresija bila 33%. Podatak ukazuje na mogućnost bolje regulacije procesa LPO u žena u neoplastičnom tkivu jer su Cederbauma i sur.⁷⁷ pokazali da je CYP2E1 učinkovitiji od drugih izoformi P450 u katalitičkim procesima LPO (povećana ekspresija gena za CYP2E1 izrazito povisuje LPO). Učinjenim istraživanjem pokazali smo izrazito smanjenje ekspresije gena za CYP2D6 u neoplastičnom u odnosu na zdravo i priležeće tkivo u bolesnika oba spola. Prema dostupnoj literaturi, za sada se CYP2D6 ne povezuje s etiologijom karcinoma bubrega, iako se spominje kao rizični faktor za nastanak karcinoma jetre¹⁴⁴, razvitak karcinoma bronha u pušača¹⁴⁵ i karcinoma dojke kao posljedicu genetskog polimorfizma¹⁴⁶. Prema našim spoznajama, podaci o smanjenoj ekspresiji gena za CYP2D6 u tkivu karcinoma bubrega u odnosu na zdravo i priležeće tkivo su po prvi puta opaženi te su stoga potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdio značaj navedenih zapažanja. Polimorfizam je vjerojatno glavni čimbenik interindividualnim razlikama u metabolizmu i toksičnosti lijekova, a podaci o povezanosti polimorfizma sustava P450 i karcinogeneze su relativno oskudni⁷⁸. Jedan od mogućih razloga za veću učestalost karcinoma bubrega u muškaraca je polimorfizam gena za različite izoforme P450 proteina. P450 koji se povezuju s karcinogenezom poput CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1 i CYP3A4 su tijekom evolucije relativno malo izmjenjeni i manje funkcionalno polimorfni, za razliku od CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 kod kojih su opisani klinički najznačajniji polimorfizmi. Polimorfizam CYP1B1

gena povezuje se s povećanim rizikom za razvoj različitih novotvorina⁷⁹. Polimorfizam CYP2D6 uglavnom se povezuje s rasnom pripadnosti, tako 5-10% populacije bijelaca slabo odgovara na lijekove čiji je metabolizam podložan aktivnosti CYP2D6 dok je taj postotak u azijske rase 0-1%, a u afrikanaca vrlo individualan i iznosi od 0 do 19%¹⁴⁷. Istraživanje Brockmollera i sur.¹⁴⁸ pokazalo je da bi polimorfizam gena za CYP2D6 mogao biti povezan s povećanim rizikom za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura. Longuemaux i sur.¹⁴⁹ u svojim istraživanjima negiraju povezanost polimorfizma gena za CYP2D6 i povišenog rizika za razvitak karcinoma bubrega. Međutim, polimorfizam gena za CYP1B1 mogao bi biti odgovoran za učestaliju pojavu karcinoma bubrega u muškaraca. Naime, Sasaki i sur.¹⁵⁰ utvrdili su da je učestalost genotipova 119T/T i 432G/G značajno viša u oboljelih prema zdravoj populaciji i da je relativni rizik obolijevanja za genotip 119T/T u muškaraca 3.95, a u žena 1.92 dok relativni rizik obolijevanja za genotip 432G/G u muškaraca iznosi 2.81, a u žena 1.35. Parkinson i sur.⁷³ utvrdili su da se neke izoforme P450 proteina (npr. CYP3A4), uz veliku interindividualnu varijabilnost u ekspresiji (čak više od 40 puta), razlikuju u ekspresiji i među spolovima. To se prvenstveno odnosi na CYP1A1 čija je aktivnost niža u žena. U ovom istraživanju zanimljivi podaci dobiveni su ispitivanjem ekspresije pojedinih P450 izoformi usporedbom promjena ekspresije u neoplastičnom tkivu pojedinog bolesnika u odnosu na ekspresiju iste izoforme u zdravom tkivu. Zabilježena je promjena ekspresije gena za CYP2C9 i CYP1A2 u neoplastičnom u odnosu na zdravo tkivo kod svih žena dok se kod muškaraca ekspresija uopće nije promijenila. Ekspresija gena za CYP3A4 i CYP2E1 promijenjena je u 50, odnosno 75% bolesnika, a niti u jedne bolesnice.

Rezultati istraživanja podupiru pretpostavku da oksidacijski stres i prateća antioksidacijska obrana mogu imati važnu ulogu u rastu i progresiji karcinoma bubrega. Samo tkivo karcinoma bubrega u muških bolesnika imalo je značajno višu razinu LPO u odnosu na zdravo tkivo. Također je po

prvi puta pokazano da su oba izoenzima SOD (CuZnSOD i MnSOD) različito, spolno ovisno regulirana u zdravom i neoplastičnom tkivu u oboljelih osoba na razini transkripcije, translacije i aktivnosti enzima. Istraživanje je pokazalo da su najmanje tri P450 izoforme promjenjene u tkivu karcinoma bubrega, od čega su dvije promjenjene na spolno ovisan način. Ovi čimbenici mogli bi biti odgovorni za različit rizik razvitka karcinoma bubrega u muških i ženskih osoba. Moguće ograničenje istraživanja je mali broj ispitanika tako da bi iznesene pretpostavke trebalo potvrditi daljnjim istraživanjima.

6 ZAKLJUČCI

1. Prekomjerna tjelesna težina i visoki krvni tlak ne mijenjaju značajno koncentraciju lipidnih peroksida niti aktivnost AOE u priležećem i neoplastičnom tkivu bolesnika u oba spola u odnosu na zdravo tkivo.

2.
 - a. Koncentracija lipidnih peroksida u neoplastičnom tkivu bubrega značajno je viša u odnosu na zdravo tkivo samo u muškaraca (TBARS $p=0.007$; MDA $p=0.006$) dok je u žena nepromijenjena.
 - b. U neoplastičnom tkivu bubrega u odnosu na zdravo i priležeće tkivo u oba spola značajno je snižena aktivnost KAT (muškarci $p=0.019$, $p=0.017$; žene $p=0.001$, $p=0.007$) pri čemu je aktivnost KAT značajno viša u neoplastičnom tkivu u muškaraca u odnosu na isto tkivo u žena ($p=0.008$).
 - c. Samo u muških bolesnika je aktivnost GPx značajno viša u priležećem tkivu uz karcinom bubrega u odnosu na neoplastično tkivo ($p=0.038$).
 - d. Iako je u oba spola aktivnost tSOD ($tSOD=MnSOD+CuZnSOD$) nepromijenjena u neoplastičnom i priležećem tkivu u odnosu na zdravo tkivo, u neoplastičnom i priležećem tkivu žena nađena je niža aktivnost tSOD u odnosu na isto tkivo u muškaraca ($p=0.012$, $p=0.008$).

3.
 - a. U zdravom tkivu bubrega aktivnost CuZnSOD i MnSOD bila je različita; u muškaraca se tSOD aktivnost u podjednakom postotku odnosila na CuZnSOD i MnSOD, a u žena je većinom pripadala CuZnSOD aktivnosti. U neoplastičnom tkivu dolazi

do inverzije aktivnosti pojedinih SOD izoformi; u žena raste aktivnost MnSOD, a u muškaraca aktivnost CuZnSOD.

- b. Ekspresija gena za CuZnSOD u oboljelih muškaraca značajno je smanjena u neoplastičnom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom ($p=0.0085$) dok je istovremeno u neoplastičnom tkivu žena značajno povišena ekspresija gena za MnSOD u usporedbi sa zdravim tkivom ($p=0.001$).

4. Proces LPO u plazmi oboljelih muškaraca je značajno viši u odnosu na kontrolnu skupinu muškaraca ($p=0.005$) dok u oboljelih žena postoji tendencija porasta procesa LPO, ali statistička značajnost nije dokazana.

5. U zdravom, priležecem i neoplastičnom tkivu bubrega u oba spola ispitali smo ekspresiju gena za različite izoforme citokroma P450 i ustanovili:

- a. Gen za CYP1A1 nije eksprimiran niti u zdravom niti u neoplastičnom tkivu kako u muškaraca tako i u žena.
- b. Ekspresija gena za CYP1B1, CYP2C9, CYP1A2 i CYP3A4 podjednaka je u zdravom i neoplastičnom tkivu bolesnika u oba spola.
- c. Ekspresija gena za CYP2D6 podjednako je smanjena u neoplastičnom tkivu bolesnika u oba spola.
- d. Samo u neoplastičnom tkivu u oboljelih žena smanjena je ekspresija gena za CYP2E1 i povećana ekspresija gena za CYP2C19 dok je u muškaraca za oba gena ekspresija nepromijenjena.

6. Oksidacijski procesi statistički su značajno izraženiji u tkivu karcinoma bubrega u odnosu na zdravo tkivo samo u oboljelih muškaraca. Aktivnost tSOD i KAT u neoplastičnom tkivu u žena u

odnosu na neoplastično tkivo u muškaraca je niža. Oba izoenzima SOD (CuZnSOD i MnSOD) različito su, spolno ovisno regulirana u zdravom i neoplastičnom tkivu u oboljelih osoba i to na razini transkripcije, translacije i aktivnosti enzima. Dvije P450 izoforme (CYP2E1 i CYP2C19) promijenjene su na spolno ovisan način. Navedeni čimbenici mogli bi biti odgovorni za različit rizik razvitka karcinoma bubrega u muških i ženskih osoba.

Rezultati disertacije podupiru pretpostavku da bi oksidacijski stres i prateća antioksidacijska obrana mogli imati važnu ulogu u rastu i progresiji karcinoma bubrega. Opažene spolno ovisne razlike u promatranim pokazateljima mogle bi biti odgovorne za viši rizik razvitka karcinoma bubrega u muških u odnosu na ženske osobe, a modulacija njihova djelovanja mogla bi imati utjecaj na smanjenje rizika obolijevanja kao i na razvoj novih terapijskih postupaka.

7 KRATKI SADRŽAJ

Karcinom bubrega dvostruko je učestaliji u muškaraca u odnosu na žene. Poznato je da su novotvorine uzročno-posljedično povezane s promjenama u oksidacijsko/antioksidacijskom potencijalu u ciljnom organu, ali također i sa sustavom enzima P450 koji sudjeluju u metaboličkoj aktivaciji prokarcinogenih tvari u potencijalno karcinogeni oblik. Hipoteza disertacije je da različita pojavnost karcinoma bubrega u žena i muškaraca proizlazi iz spolno vezane razlike u oksidacijsko /antioksidacijskom statusu i razlike u ekspresiji (time i katalitičkoj aktivnosti) u sustavu proteina P450. Cilj disertacije bio je odrediti razlikuju li se oksidacijski/antioksidacijski pokazatelji u oboljelih osoba te ekspresija enzima u sustavu P450 u oboljelih muškaraca i žena u zdravom, priležećem i neoplastičnom tkivu bubrega. Istraživanje je provedeno na 30 bolesnika oboljelih od karcinoma bubrega (15 muškaraca i 15 žena starosti od 37 do 77 godina). Kontrolnu skupinu sačinjavale su 44 zdrave osobe (23 muškarca i 21 žena). Oksidacijski status određen je mjerenjem koncentracije TBARS i MDA. Antioksidacijski status ispitan je određivanjem aktivnosti enzima KAT, SOD, GPx. Ekspresija gena za pojedine AOE i enzime P450 određena je PCR metodom. Razina proteina za CuZnSOD i MnSOD određena je Western blot metodom.

Rezultati pokazuju da muškarci oboljeli od karcinoma bubrega imaju statistički značajno višu LPO u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu muškaraca ($p=0.005$). Statistički značajno viša razina LPO u neoplastičnom tkivu u usporedbi sa zdravim tkivom opažena je samo u muških bolesnika (TBARS $p=0.007$; MDA $p=0.006$). Aktivnost tSOD i KAT u neoplastičnom tkivu u žena u odnosu na neoplastično tkivo u muškaraca je niža ($p=0.012$, $p=0.008$). Oba izoenzima SOD (CuZnSOD i MnSOD) različito su, spolno ovisno regulirana u zdravom i neoplastičnom tkivu u oboljelih osoba na razini transkripcije, translacije i aktivnosti enzima. Također, utvrđena je promjena u ekspresiji tri od osam promatranih P450

izoformi: ekspresija za CYP2D6 bila je smanjena u neoplastičnom tkivu u oba spola, a za CYP2E1 i CYP2C19 opažene su spolno ovisne promjene u ekspresiji gena. Rezultati disertacije podupiru pretpostavku da bi oksidacijski stres i prateća antioksidacijska obrana mogli imati važnu ulogu u rastu i progresiji karcinoma bubrega. Navedeni pokazatelji mogli bi biti odgovorni za viši rizik razvitka karcinoma bubrega u muških osoba te bi modulacija njihova djelovanja mogla imati utjecaj na smanjenje rizika obolijevanja. Rezultati ove disertacije mogli bi u konačnici imati učinak razvoj novih terapijskih postupaka putem djelovanja na proteine sustava P450.

8 SUMMARY

The oxidation/antioxidant profile and cytochrome P450 in RCC

The aim of this study was to determine whether there is a difference in the oxidation/antioxidant profile and P450 expression in renal cell carcinoma (RCC) tissue, adjacent to tumor tissue and nontumor tissue in men and women. The study was conducted on 30 patients with RCC (15 men and 15 women). The control group was composed of 44 healthy individuals (23 men and 21 women). Oxidative status was determined by measuring the concentration of TBARS and MDA. Antioxidant status was tested by determining the enzyme activity of SOD, GPx and CAT. Gene expression for specific AOE and P450 enzymes was determined by the PCR method. Protein levels of CuZnSOD and MnSOD was determined by the Western blot method. Results indicate that men with kidney cancer have a significantly higher LPO in plasma compared to the control group of men ($p=0.005$). Significantly higher levels of LPO in RCC tissue compared with nontumor tissue was observed only in men (TBARS $p=0.007$; MDA $p=0.006$). tSOD and CAT activity in RCC tissue in women was lower compared to RCC tissue in men ($p=0.012$, $p=0.008$). Gender-related difference in CuZnSOD and MnSOD in nontumor and RCC tissue was obtained at the level of transcription, translation and activity of these antioxidant isoenzymes. The gene expression of 3 CYPs out of 8 was altered; CYP2D6 mRNA was decreased in both sexes while gender-related changes of mRNA expression for CYP2E1 and CYP2C19 was observed. Taken together, these parameters might be potentially responsible for higher risk of RCC in men than in women and modulation of their activity could have an impact on reducing the risk of RCC development and repercussions on the development of new therapeutic procedures.

Ana Šverko, Zagreb, 2011.

9 POPIS LITERATURE

1. European Network of Cancer Registries. Eurocim version 4.0. European incidence database V2.3, 730 entity dictionary (2001), Lyon, 2001.
2. Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scand J Surg* 2004;93:88-96.
3. Linehan JA, Nguyen MM. Kidney cancer: the new landscape. *Curr Opin Urol* 2009;19:133-7.
4. National Cancer Institute (stranica na Internetu). Dostupno na: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>.
5. Levi F, Ferlay J, Galeone C i sur. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int* 2008;101:949-58.
6. Murai M, Oya M. Renal cell carcinoma: etiology, incidence and epidemiology. *Curr Opin Urol* 2004;14:229-33.
7. Petersen RO, Sesterhenn I, Davis CJ. Urologic pathology. 3 izdanje. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia 2009.
8. Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13:287-93.
9. Bukowski RM, Figlin RA, Motzer RJ. Renal Cell Carcinoma Molecular Targets and Clinical Applications. U: Kaelin WG, George DJ (ur.). *The Molecular Biology of Kidney Cancer and Its Clinical Translation into Treatment Strategies*. 2 izdanje. Humana Press: New York 2009, str. 79-97.
10. Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guille F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003;44:226-32.

11. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC i sur. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 2010;58:398-406.
12. Jacob E. Medifocus Guidebook on: Renal Cell Carcinoma. Medifocus Inc: 2011.
13. Remzi M, Ozsoy M, Klingler HC i sur. Are small renal tumors harmless? Analysis of histopathological features according to tumors 4 cm or less in diameter. *J Urol* 2006;176:896-9.
14. Kane CJ, Mallin K, Ritchey J, Cooperberg MR, Carroll PR. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer* 2008;113:78-83.
15. Israel GM, Bosniak MA. How I do it: evaluating renal masses. *Radiology* 2005;236:441-50.
16. Israel GM, Bosniak MA. Pitfalls in renal mass evaluation and how to avoid them. *Radiographics* 2008;28:1325-38.
17. Federle MP. Diagnostic imaging Abdomen. 2 izdanje. Amirsys: Salt Lake City 2010.
18. Hricak H, Demas BE, Williams RD i sur. Magnetic resonance imaging in the diagnosis and staging of renal and perirenal neoplasms. *Radiology* 1985;154:709-15.
19. Janus CL, Mendelson DS. Comparison of MRI and CT for study of renal and perirenal masses. *Crit Rev Diagn Imaging* 1991;32:69-118.
20. Sun MR, Pedrosa I. Magnetic resonance imaging of renal masses. *Semin Ultrasound CT MR* 2009;30:326-51.
21. Putra LG, Minor TX, Bolton DM, Appu S, Dowling CR, Neerhut GJ. Improved assessment of renal lesions in pregnancy with magnetic resonance imaging. *Urology* 2009;74:535-9.
22. Kreft B, Beer AJ. MR Imaging of the Body. 1 izdanje. Thieme: New York 2009.

23. Warren KS, McFarlane J. The Bosniak classification of renal cystic masses. *BJU Int* 2005;95:939-42.
24. Fan L, Lianfang D, Jinfang X, Yijin S, Ying W. Diagnostic efficacy of contrast-enhanced ultrasonography in solid renal parenchymal lesions with maximum diameters of 5 cm. *J Ultrasound Med* 2008;27:875-85.
25. Mitterberger M, Pelzer A, Colleselli D i sur. Contrast-enhanced ultrasound for diagnosis of prostate cancer and kidney lesions. *Eur J Radiol* 2007;64:231-8.
26. Fritzsche PJ, Millar C. Multimodality approach to staging renal cell carcinoma. *Urol Radiol* 1992;14:3-7.
27. American Cancer Society (stranica na Internetu). Dostupno na: <http://www.cancer.org/cancer/kidneycancer/detailedguide/kidney-cancer-adult-what-is-kidney-cancer>
28. Park JW, Jo MK, Lee HM. Significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography for the postoperative surveillance of advanced renal cell carcinoma. *BJU Int* 2009;103:615-9.
29. Dutcher JP, de Souza P, McDermott D i sur. Effect of temsirolimus versus interferon-alpha on outcome of patients with advanced renal cell carcinoma of different tumor histologies. *Med Oncol* 2009;26:202-9.
30. Silverman SG, Gan YU, Morteale KJ, Tuncali K, Cibas ES. Renal masses in the adult patient: the role of percutaneous biopsy. *Radiology* 2006;240:6-22.
31. Remzi M, Marberger M. Renal tumor biopsies for evaluation of small renal tumors: why, in whom, and how? *Eur Urol* 2009;55:359-67.
32. Shannon BA, Cohen RJ, de Bruto H, Davies RJ. The value of preoperative needle core biopsy for diagnosing benign lesions among small, incidentally detected renal masses. *J Urol* 2008;180:1257-61.

33. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-4.
34. Eble JN, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I (ur.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press: Lyons 2004.
35. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ i sur. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997;183:131-3.
36. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
37. Schulze-Osthoff K, Bauer MK, Vogt M, Wesselborg S. Oxidative stress and signal transduction. *Int J Vitam Nutr Res* 1997;67:336-42.
38. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43-50.
39. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:761-70.
40. Favier A, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. Analysis of free radical in biological systems. 1 izdanje. Birkhäuser Verlag: Basel 1995.
41. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:67-101.
42. Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993;69:261-74.
43. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000;25:502-8.

44. Guengerich FP. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J* 1992;6:745-8.
45. van Eeden SF, Klut ME, Walker BA, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 1999;232:23-43.
46. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4 izdanje. Oxford University Press: Oxford 2007.
47. Gutteridge JM, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393:561-4.
48. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984;1:1396-7.
49. Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009;46:531-42.
50. Hultqvist M, Olsson LM, Gelderman KA, Holmdahl R. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends Immunol* 2009;30:201-8.
51. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:689-703.
52. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33-50.
53. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97-112.
54. Das KC, Guo XL, White CW. Protein kinase C delta-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998;273:34639-45.

55. Knirsch L, Clerch LB. Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. *Biochemistry* 2001;40:7890-5.
56. Forman HJ, Dickinson DA. Oxidative signaling and glutathione synthesis. *Biofactors* 2003;17:1-12.
57. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr* 2007;27:41-61.
58. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS i sur. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem* 2003;384:567-74.
59. Sies H, Jones D. *Encyclopedia of Stress*. 2 izdanje. Academic Press 2007.
60. Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 1995;73:3-19.
61. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-62.
62. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 2009;157:1-11.
63. Choe M, Jackson C, Yu BP. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med* 1995;18:977-84.
64. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: some problems and concepts. U: Halliwell B (ur.). *Oxygen Radical and Tissue Injury*. Upjohn Co and FASEB: Bethesda 1988. str. 9-19.
65. Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med* 1996;21:871-88.

66. Oberley TD, Toyokuni S, Szweda LI. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* 1999;27:695-703.
67. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000;18:655-73.
68. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:95-109.
69. Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 1993;49:621-9.
70. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958;75:376-86.
71. Coon MJ, Vaz AD, Bestervelt LL. Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes. *FASEB J* 1996;10:428-34.
72. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 2003;123:369-75.
73. Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:193-209.
74. Cinti DL, Feinstein MB. Platelet cytochrome P450: a possible role in arachidonate-induced aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;73:171-9.
75. Coleman MD. *Human Drug Metabolism: An Introduction*. 2 izdanje. Wiley: Chichester 2010.
76. Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 1997;29:1129-88.

77. Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1539-43.
78. Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* 2002;181-182:447-52.
79. Shimada T, Watanabe J, Kawajiri K i sur. Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis* 1999;20:1607-13.
80. Farrell GC, Zaluzny L. Hepatic heme metabolism and cytochrome P450 in cirrhotic rat liver. *Gastroenterology* 1985;89:172-9.
81. Guengerich FP. Human cytochrome P-450 enzymes. U: Ortiz de Montellano PR (ur.). *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. 2 izdanje. New York: Plenum Press; 1995. str. 473-535.
82. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:414-23.
83. Ronis MJJ, Lindros KO, Ingelman-Sundberg M. The cytochrome P4502E subfamily. U: Ioannides C (ur.). *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects*. 1 izdanje. CRC Press: Boca Raton 1996, str. 211-39.
84. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000;105:1067-75.
85. De Waziers I, Garlatti M, Bouguet J, Beaune PH, Barouki R. Insulin down-regulates cytochrome P450 2B and 2E expression at the post-

- transcriptional level in the rat hepatoma cell line. *Mol Pharmacol* 1995;47:474-9.
86. Morgan ET. Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* 2001;29:207-12.
 87. Sewer MB, Morgan ET. Nitric oxide-independent suppression of P450 2C11 expression by interleukin-1beta and endotoxin in primary rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1997;54:729-37.
 88. Sunman JA, Hawke RL, LeCluyse EL, Kashuba AD. Kupffer cell-mediated IL-2 suppression of CYP3A activity in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2004;32:359-63.
 89. Waxman DJ, Ram PA, Notani G i sur. Pituitary regulation of the male-specific steroid 6 beta-hydroxylase P-450 2a (gene product IIIA2) in adult rat liver. Suppressive influence of growth hormone and thyroxine acting at a pretranslational level. *Mol Endocrinol* 1990;4:447-54.
 90. Liddle C, Goodwin BJ, George J, Tapner M, Farrell GC. Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2411-6.
 91. Shimada T, Oda Y, Gillam EM, Guengerich FP, Inoue K. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1176-82.
 92. Palackal NT, Burczynski ME, Harvey RG, Penning TM. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chem Biol Interact* 2001;130-132:815-24.

93. Kim JH, Sherman ME, Curriero FC, Guengerich FP, Strickland PT, Sutter TR. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:210-9.
94. Telang NT, Suto A, Wong GY, Osborne MP, Bradlow HL. Induction by estrogen metabolite 16 alpha-hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:634-8.
95. Fishman J, Osborne MP, Telang NT. The role of estrogen in mammary carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;768:91-100.
96. Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR. 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9776-81.
97. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:203-32.
98. Chen L, Waxman DJ, Chen D, Kufe DW. Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by transfer of a liver cytochrome P450 gene. *Cancer Res* 1996;56:1331-40.
99. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC i sur. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 1997;57:3026-31.
100. McKay JA, Melvin WT, Ah-See AK i sur. Expression of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer. *FEBS Lett* 1995;374:270-2.
101. Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos* 1996;24:899-905.
102. McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2004;3:363-71.

103. Rintala S, Tammela TL, Tuimala R. CYP1A1 activity in renal cell carcinoma and in adjacent normal renal tissue. *Urol Res* 1998;26:117-21.
104. Hrvatski zavod za javno zdravstvo (stranica na Internetu). Dostupno na: <http://www.hzjz.hr/rak/bilten2008/tablicaB31-2008.pdf>.
105. Motzer RJ, Russo P, Nanus DM, Berg WJ. Renal cell carcinoma. *Curr Probl Cancer* 1997;21:185-232.
106. Dianzani MU. Lipid peroxidation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993;15:125-47.
107. Flohé L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104.
108. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
109. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
110. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
111. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
112. Khoschsorur GA, Winklhofer-Roob BM, Rabl H, Auer T, Peng Z, Schaur RJ. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia* 2000;52:181-84.
113. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
114. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.

115. Godley PA, Escobar MA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 1998;10:261-5.
116. Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr., Chow WH. Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992. *Eur J Cancer Prev* 2002;11:171-8.
117. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Press: Lyon 2004.
118. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
119. Rubagotti A, Martorana G, Boccardo FM. Epidemiology of kidney cancer. *Eur Urol Suppl* 2006;5:558-65.
120. Lusini L, Tripodi SA, Rossi R i sur. Altered glutathione anti-oxidant metabolism during tumor progression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;91:55-9.
121. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* 1986. 1986;25:1058-71.
122. Gago-Dominguez M, Castelao JE. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med* 2006;40:721-33.
123. Grabacka M, Reiss K. Anticancer Properties of PPAR alpha-Effects on Cellular Metabolism and Inflammation. *PPAR Res* 2008;2008:930705-14.
124. Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K i sur. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;58:825-9.
125. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2 izdanje. Clarendon Press: Oxford 1989.

126. Irani K, Xia Y, Zweier JL i sur. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997;275:1649-52.
127. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 1995;358:1-3.
128. Yu MC, Yuan JM, Ross RK. Epidemiology of renal cell carcinoma. U: Petrovich Z, Baert LL, Brady LW (ur.). *Carcinoma of the Kidney and Testis and Rare Urologic Malignancies: Innovations in Management*. Springer Verlag: Berlin 1998, str. 3-13.
129. Kawaciuk I, Hyršl L, Dušek P i sur. Renal cell carcinoma risk factors. *Urologia Polska* 2005;58:3.
130. Oberley TD, Sempf JM, Oberley LW. Immunogold analysis of antioxidant enzymes in common renal cancers. *Histol Histopathol* 1996;11:153-60.
131. Janssen AM, Bosman CB, Sier CF i sur. Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1998;78:1051-7.
132. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1990;8:583-99.
133. Borrás C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 2003;34:546-52.
134. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* 1997;12:525-35.
135. Yoshioka T, Takeda M, Burr IM, Meyrick BO, Ichikawa I. Hydrogen peroxide can activate the Mn-superoxide dismutase gene in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1992:718.

136. Ridnour LA, Oberley TD, Oberley LW. Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:501-12.
137. Oberley LW, Oberley TD. Role of antioxidant enzymes in the cancer phenotype. U: Clerch LB, Massaro DJ (ur.). *Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function (Lung Biology in Health and Disease)*. Marcel Dekker Inc: New York 1997. str, 279-307.
138. Li JJ, Oberley LW, St Clair DK, Ridnour LA, Oberley TD. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene* 1995;10:1989-2000.
139. Yagi K. Female hormones act as natural antioxidants-a survey of our research. *Acta Biochim Pol* 1997;44:701-9.
140. Bolzan AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin Biochem* 1997;30:449-54.
141. Sobocanec S, Balog T, Kusic B, Sverko V, Saric A, Marotti T. Differential response to lipid peroxidation in male and female mice with age: correlation of antioxidant enzymes matters. *Biogerontology* 2008;9:335-43.
142. Cheung YL, Kerr AC, McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Differential expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 in human kidney tumours. *Cancer Lett* 1999;139:199-205.
143. Sinha A, Muthiah K, Jiang W, Couroucli X, Barrios R, Moorthy B. Attenuation of hyperoxic lung injury by the CYP1A inducer beta-naphthoflavone. *Toxicol Sci* 2005;87:204-12.
144. Agundez JA, Ledesma MC, Benitez J i sur. CYP2D6 genes and risk of liver cancer. *Lancet* 1995;345:830-1.

145. Bouchardy C, Benhamou S, Dayer P. The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res* 1996;56:251-3.
146. Gaston C, Kolesar J. Clinical significance of CYP2D6 polymorphisms and tamoxifen in women with breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008;6:825-33.
147. Eichelbaum M, Kroemer HK, Fromm MF. Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;27:171-99.
148. Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996;56:3915-25.
149. Longuemaux S, Delomenie C, Gallou C i sur. Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobiotic-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 1999;59:2903-8.
150. Sasaki M, Tanaka Y, Okino ST i sur. Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2015-9.

10 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11.3.1981.g. u Zagrebu gdje sam završila osnovnu i srednju školu te osnovnu i srednju školu za Klasični balet. Od 1999.g. do 2005.g. školujem se na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2006.g. postajem znanstveni novak, a od 2007.g. specijalizant radiologije pri Kliničkom zavodu za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju KBC "Sestre milosrdnice". Dobitnik sam Rektorove nagrade za akademsku godinu 2004/2005. i Stipendije Grada Zagreba.

RADOVI U INDEKSIRANIM ČASOPISIMA:

1. Šverko A, Sobočanec S, Balog T, Kušić B, Šverko V, Marotti T. Does long-term exercise modulate oxidant/antioxidant status in humans? Comparison between lipid peroxidation and catalase activity in fresh and stored samples. *Croatica Chemica Acta* 2005;78:361-366.
2. Šverko A, Sobočanec S, Kušić B, Mačak-Šafranko Z, Šarić A, Leniček T, Kraus O, Andrišić L, Korolija M, Balog T, Sunjić SB, Marotti M. Superoxide dismutase and cytochrome P450 isoenzymes might be associated with higher risk of renal cell carcinoma in male patients. *Int Immunopharmacol* 2011;11:639-45.
3. Šverko A, Tripalo Batoš A, Mustapić M, Marotti M, Bekavac Bešlin M, Krušlin B. Correlation between magnetic resonance imaging and histopathology in differentiation of pancreatic diseases *Acta Clinica Croatica*. Rad prihvaćen u tisak.

Autorica sam 5 kongresnih sažetaka objavljenih u indeksiranim časopisima te sam izlagala na nizu znanstvenih skupova u zemlji i inozemstvu.

SPECIJALISTIČKO I POSLIJEDIPLOMSKO USAVRŠAVANJE

U akademskoj godini 2005/2006. upisala sam poslijediplomski Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, a 2009/2010. upisala sam Specijalistički poslijediplomski studij Radiologija.

Predsjednica sam Sekcije mladih radiologa Hrvatskog društva radiologa od 2008.g.

Član sam Radiology Trainees Forum od 2008.g. (RTF, organizacija specijalizirana radiologije koja djeluje unutar Europskog radiološkog društva), a od 2009.g. član sam upravnog odbora RTF.

2010.g. postajem član European Training Assessment Programme koji djeluje u sklopu Europskog radiološkog društva.