

Kristina Eraković

**Parametri oksidacijskog stresa u premalignim
promjenama vrata maternice**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju iz kolegija Opća klinička biokemija 1 pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Marije Grdić Rajković.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Mariji Grdić Rajković na ugodnom vođenju tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem neobičnom prijatelju koji me je čuvao i brižno pratio tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Oksidacijski stres	1
1.2. Slobodni radikali i neradikali	2
1.2.1. Reaktivni kisikovi spojevi	2
1.2.1.1. Superoksidni anionski radikal	4
1.2.1.2. Vodikov peroksid	4
1.2.1.3. Hidroksilni radikal	5
1.2.1.3.1. Malondialdehid	6
1.2.2. Reaktivni dušikovi spojevi	7
1.2.2.1. Radikal dušikovog oksida	7
1.2.3. Reaktivni elektrofilni spojevi	8
1.3. Antioksidansi	8
1.4. Glutation	9
1.5. Tioli	11
1.6. Cervikalna intraepitelna neoplazija	13
1.6.1. Čimbenici rizika razvoja karcinoma iz cervikalne intraepitelne neoplazije	15
1.6.2. Humani papiloma virus	15
1.6.3. Oksidacijski stres i cervikalna intraepitelna neoplazija	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Uzorci	18

3.2.	Metoda određivanja tiola u serumu.....	19
3.3.	Metoda određivanja reduciranog glutationa u serumu.....	20
3.4.	Metoda određivanja malondialdehida u serumu	20
3.5.	Statistička obrada podataka.....	21
4.	REZULTATI	22
4.1.	Demografske karakteristike ispitivanih skupina.....	22
4.2.	Koncentracija tiola.....	23
4.3.	Koncentracija reduciranog glutationa	25
4.4.	Koncentracija malondialdehida.....	27
4.5.	Univarijantna i multivarijantna regresijska analiza parametara oksidacijskog stresa.....	29
5.	RASPRAVA	30
6.	ZAKLJUČAK	33
7.	LITERATURA	34
8.	SAŽETAK/SUMMARY	41
9.	PRILOZI	45
9.1.	Popis kratica.....	45
10.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Oksidacijski stres izazvan djelovanjem slobodnih radikala, povezan je s razvojem raznih patoloških stanja kao primjerice s razvojem kardiovaskularnih i malignih bolesti, neuroloških poremećaja i dijabetesa (Valko i sur., 2007). Mjerenje raznih biomarkera oksidacijskog stresa u patološkim stanjima rasvjetljuje njihovu važnost i ulogu u razvoju bolesti (Daim i sur., 2018).

Kod patoloških stanja dolazi do stvaranja povećane koncentracije slobodnih radikala dok se tijekom normalnog metabolizma stvaraju male koncentracije koje je moguće ukloniti antioksidacijskim sustavima. Mala ili srednja koncentracija slobodnih radikala omogućuje pravilan rad stanice i održava redoks ravnotežu. Takve koncentracije održavaju se pomoću antioksidacijskih sustava koji imaju mogućnost vezivanja na slobodne radikale i time sprečavaju razvitak oksidacijskog stresa (Ahmed i sur., 1999). Molekularna struktura antioksidansa omogućuje preuzimanje nevezanog elektrona iz slobodnom radikala i na taj način dolazi do stabilizacije molekule (Valko i sur., 2006).

1.1. Oksidacijski stres

Povećana koncentracija slobodnih radikala može uzrokovati oksidacijski stres koji uništava staničnu strukturu: membranu, lipide, proteine i nukleinske kiseline. Tu povećanu količinu radikala nije moguće ukloniti ograničenim antioksidacijskim sustavom zbog čega dolazi do oksidacijskog stresa (Droge, 2002). Oksidacijski stres predstavlja neravnotežu u oksido-redukcijskim reakcijama u korist oksidacijskih reakcija pri čemu se oslobađaju povećane količine slobodnih radikala. Dolazi do poremećaja homeostaze čiji uzroci mogu biti: mehanički, bakterijski, virusni i toksični. Razlozi gubitka homeostaze mogu nastati kao posljedica gubitka antioksidansa, povećanja koncentracije prooksidansa ili kao posljedica nakupljanja molekula oštećenih slobodnim radikalima. Primjer gubitka homeostaze je starenje u kojem dolazi do poremećaja u ravnoteži između antioksidansa i slobodnih radikala. Ravnoteža se pomiče prema prooksidansima pa dolazi do povećane koncentracije slobodnih radikala (Chandra i sur., 2010).

1.2. Slobodni radikali i neradikali

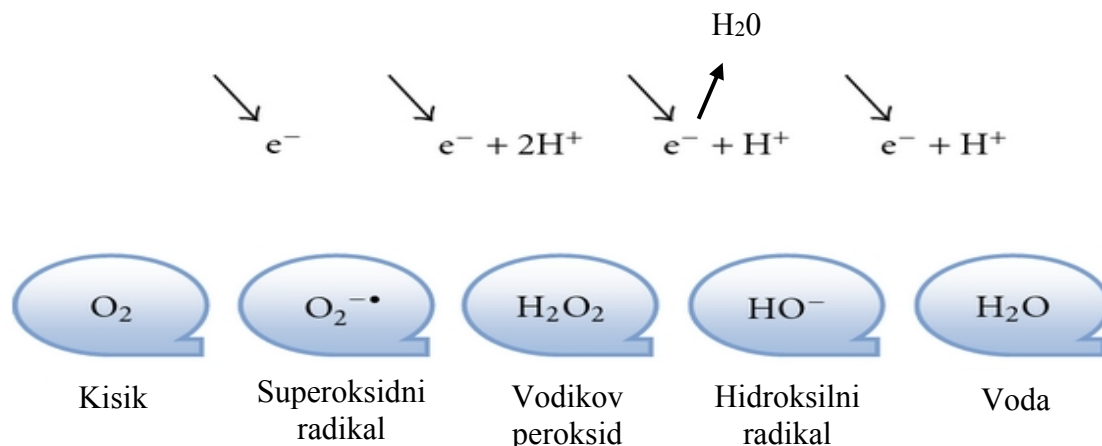
Slobodni radikali su spojevi koji sadrže nespareni elektron za razliku od stabilne molekule koja ima elektrone u parovima. Svaka molekula s nesparenim elektronom zahtjeva elektron kako bi upotpunila svoj elektronski par i time dosegla stabilnost. Težeći stabilnosti, molekule oduzimaju elektrone drugim molekulama i tako nastaju novi slobodni radikali. Lančana reakcija uzimanja i davanja elektrona u organizmu uzrokuje oštećenje stanica (Pine, 1994).

Postoje brojni čimbenici koji potiču nastajanje slobodnih radikala. Čimbenike možemo podijeliti na vanjske i unutarnje (namjerne i slučajne). Vanjski su: dim cigarete, ionizirajuće zračenje i fotoliza. Namjerni su aktivacije neutrofila, a slučajni su: enzimski sustavi koji reduciraju molekularni kisik u superoksidni radikal (ksantin oksidaza, aldehid oksidaza, flavin dehidrogenaza, peroksidaza), neenzimski sustavi prijenosa elektrona, reakcije autooksidacije, transportni sustav prijenosa elektrona u mitohondriju (Čepelak i Čvorišćec, 2009).

1.2.1. Reaktivni kisikovi spojevi

U procesu stupnjevite redukcije kisika do vode dolazi do stvaranja slobodnih radikala. Specifična konfiguracija kisika, s dva nesparena elektrona, smještena u različitim π orbitalama rezultira redukcijom kisika u stupnjevitom nizu prijenosa jednog elektrona. Navedena redukcija odvija se u koracima te usporava direktno povezivanje kisika s organskim spojevima. Ovo će omogućiti stanici oksidaciju goriva djelovanjem dehidrogenaze koja povezuje redukciju kisika i nastajanje vode sa stvaranjem ATP-a u respiracijskom lancu (Čepelak i Čvorišćec, 2009). Elektroni molekule kisika imaju paralelne spinove i ne mogu stvarati termodinamičan stabilni par stoga ostaju u odvojenim orbitalama. To će biti polazna osnova daljeg odvijanja lančane reakcije (Pine, 1994).

Stupnjevita redukcija kisika stvara slobodne radikale kisika sljedećim redom: hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2\cdot$), superoksidni radikal ($\text{O}_2\cdot^-$), vodikov peroksid (H_2O_2 oksidans) čijom redukcijom nastaje hidroksilni radikal ($\text{HO}\cdot$), a on nakon redukcije prelazi u vodu. To je najčešća reakcija stvaranja radikala u organizmu (Slika 1.) (Buico i sur., 2009).



Slika 1. Redukcija kisika do vode (Slika 1. preuređena prema literaturnom navodu March i sur., 2011).

Reaktivni kisikovi spojevi (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) nastaju tokom aerobnog metabolizma u određenim koncentracijama obzirom da su potrebni za normalno odvijanje fizioloških funkcija: stvaranje energije, sintezu hormona štitnjače, imunološku obranu (fagocitozu), održavanje vaskularnog tonusa, međukomunikaciju stanica i sintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. Osim navedenih pozitivnih učinaka slobodnih radikala, brojni su i mnogo poznatiji negativni, toksični učinci, istih (Meo i sur., 2016).

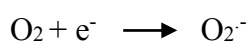
ROS podrazumijevaju slobodne radikale i neke neradikalne derivate kisika (hipoklorit, vodikov peroksid) (Droge, 2002).

Tablica 1. Slobodni radikali i neradikali (Čepelak i Čvorišćec, 2009).

Radikal	Neradikal
Superoxidni radikal	Vodikov peroksid
Hidroksilni radikal	Singlet kisik
Hidroperoksilni radikal	Lipidni hidroperoksid
Lipidni radikal	Kompleks Fe=O
Lipidni peroksilni radikal	hipoklorit
Lipidni aloksilni radikal	
Dušikov dioksid	
Dušikov oksid	
Tiil radikal	
Proteinski radikal	

1.2.1.1. Superoksidni anionski radikal

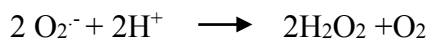
Superoksidni anionski radikal nastaje u enzimskim reakcijama koju katalizira: dehidrogenaza dihidroorotske kiseline, flavin-dehidrogenaza, ksantin-oksidaza i aldehid-oksidaza. Također nastaje oksidacijom katekolamina i flavina te nastaje i redukcijom nikotin-adenin-dinukleotid-fosfata koji je bitan oksidacijski sustav na površini upalnih stanica. Superoksidni radikal nastaje u respiracijskom lancu iz 1-3 % kisika u prelasku elektrona s ubikinona na kisik. Elektron koji je nastao u respiracijskom lancu koristi se za stvaranje superoksidnog anionskog radikala (Cao i sur., 1997).



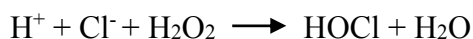
Kao reaktivni spoj on nastoji proći kroz staničnu membranu pomoću transportnog sustava, međutim nije sposoban proći kroz lipidnu membranu te ostaje u odjeljku. Zbog toga nema visoku reaktivnost jer mu je onemogućen daljnji negativan učinak na organizam (Meo i sur., 2016).

1.2.1.2. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid pripada reaktivnim kisikovim spojevima iako nema nespareni elektron (neradikal). Nastaje u reakciji dvovalentne redukcije molekule kisika koju katalizira enzim urat-oksidaza, D-aminokiselinska oksidaza i glikolat-oksidaza. Navedena reakcija odvija se u peroksisomima. Druga značajna reakcija za nastanak vodikovog peroksida je reakcija jednovalentne redukcije uz enzim superoksid-dismutazu (SOD) u kojoj se odvija dismutacija superoksida (Čepelak i Čvorišćec, 2009). Vodikov peroksid nastaje kao produkt obiju sjedinjenih reakcija. Uz pomoć iona prijelaznih metala (željezo, bakar), vodikov peroksid može postići visoku koncentraciju i time predstavljati opasnost za organizam (Droge, 2002).



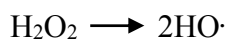
Za razliku od superoksidnog anionskog radikala on ima sposobnost proći kroz biološku membranu i time stvarati spojeve koji su iznimno reaktivni kao hipokloritna kiselina. Hipokloritna kiselina sa snažnim baktericidnim djelovanjem nastaje pomoću mijeloperoksidaze (MPO) (Droge, 2002).



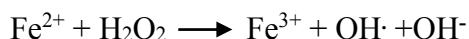
Mijeloperoksidaza je smještena u fagosomima neutrofila. Ona katalizira nastajanje hipokloritne kiseline. Hipokloritna kiselina prekida replikaciju bakterijske DNA i time onemogućava ugradnju DNA u bakterijsku membranu (Turkan, 2018).

1.2.1.3. Hidroksilni radikal

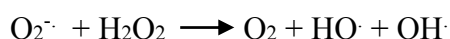
Hidroksilni radikal je radikal najveće reaktivnosti upravo zbog kratkog poluživota i iznimno negativnog djelovanja na proteine, lipide i DNA. Nastaje u reakciji homolitičke fizije vodikovog peroksida kao posljedica zračenja (Čepelak i Čvorišćec, 2009).



Također može nastati u reakciji iona prelaznih metala s vodikovim peroksidom. Navedena reakcija naziva se Fentonova reakcija (Meo i sur., 2016):



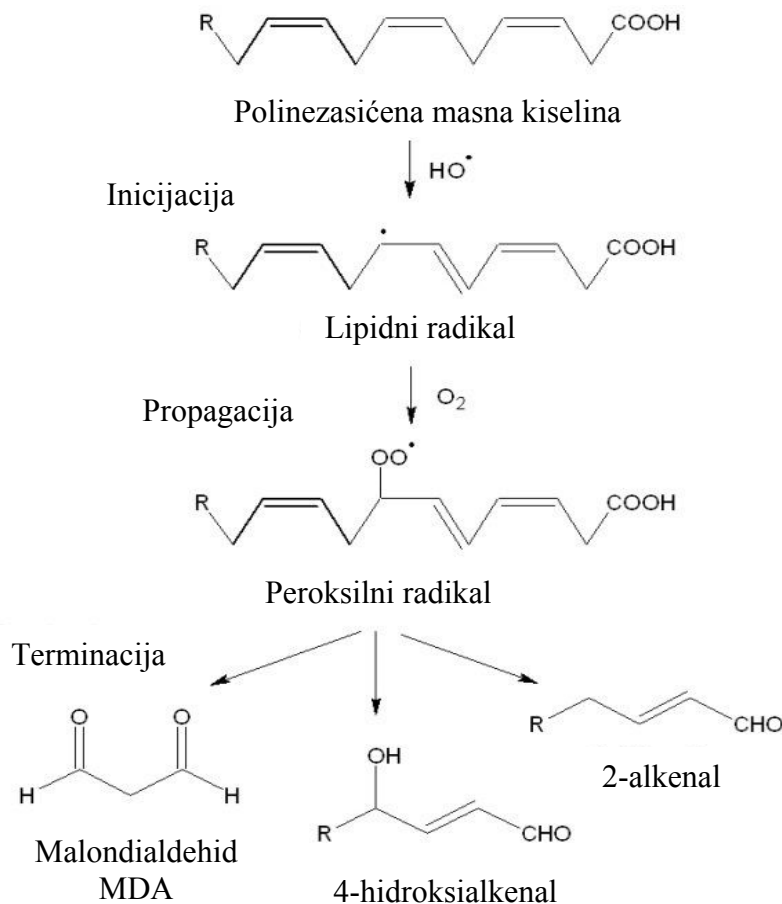
Isti radikal može nastati i Haber Weissom reakcijom (Meo i sur., 2016):



Zbog velike reaktivnosti hidroksilni radikal ima sposobnost djelovanja na brojne spojeve pa tako može oksidirati aminokiselinske ostatke i stvoriti Schiffove baze. Najčešće reagira sa prolinom, histidinom, cisteinom, metioninom i argininom što u konačnici dovodi do fragmentacije proteina, unakrsnog povezivanja, agreagacije i proteolitičke razgradnje. Hidroksilni radikal može negativno djelovati na DNA cijepajući strukturu i mijenjajući purinske i primidinske baze (Čepelak i Čvorišćec, 2009). Kao posljedica toga dolazi do mutacija i razvitka karcinoma. Negativni učinak hidroksilnog radikala očitovat će se i na lipidima stanične membrane putem lančane reakcije koju nazivamo lipidna peroksidacija (Ahmed, 1999).

1.2.1.3.1. Malondialdehid

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija koju potiču slobodni radikali, a mogu je zaustaviti antioksidansi (Esterbauer i sur., 1991). Tim procesom dolazi do oksidativne promjene koja najčešće pogađa polinezasićene masne kiseline. Odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija započinje napadom slobodnog radikala (najčešće hidroksilnog radikala) na polinezasićenu masnu kiselinu pri čemu nastaje lipidni radikal. U slijedećoj fazi, nastali lipidni radikal, koji je nestabilna molekula, reagira s kisikom te nastaje peroksilni radikal. On je također nestabilan pa zbog toga reagira s drugim masnim kiselinama stvarajući pri tome druge lipidne radikale i lipidni hidroperoksid. Nastankom novih lipidnih radikala ciklus se ponavlja. Lančana reakcija se prekida kada reakcijom dva radikala nastaje ne-radikal ili kada se u reakciju uključuje antioksidans koji donira elektron i time stvara stabilni oksidirani spoj. Konačni produkti procesa su toksični aldehidi malondialdehid (MDA) i 4-dihidroksinonenal (HNE) (Slika 2.) (Bukan i sur., 2003; Esterbauer i sur., 1991).



Slika 2. Lipidna peroksidacija (Slika 2. preuređena prema <https://alchetron.com/Lipid-peroxidation>).

Zbog lipidne peroksidacije membrane mijenjaju svoju permeabilnost, umanjuje se njihov akcijski potencijal, dolazi do promjene u radu ionskih kanala, brojni enzimi i receptori gube aktivnost te dolazi do apoptoze (Domitrović i sur., 2007).

Malondialdehid je jedan od najznačajnijih toksičnih produkata lipidne peroksidacije i time njegov značajan biljeg. Parametar oksidacijskog stresa MDA je topljiv zbog čega ga možemo određivati u krvi (Esterbauer i sur., 1991.). MDA dovodi do oštećenja DNA te oštećenja funkcije stanične membrane čime doprinosi nastajanju mutacije. Njegove povišene koncentracije uočene su u pacijenata oboljelih od raka, dijabetesa s kardiovaskularnim bolestima, Alzheimerove bolesti (Kesavulu i sur., 2001). Zbog toga MDA određujemo upravo u navedenim patološkim stanjima kao i u osoba izloženim primjerice kadmiju i aluminiju (De Zwart i sur., 1999).

1.2.2. Reaktivni dušikovi spojevi

Važnu ulogu u oksidacijskom stresu imaju i reaktivni dušikovi spojevi (RNS, od engl. *reactive nitrogen species*). Neki od njih su: dušikov oksid (NO[•]), peroksinitriti (NO₃[•]), dušikov dioksid (NO₂[•]) (Patel i sur., 1999).

1.2.2.1. Radikal dušikovog oksida

Radikal dušikovog oksida nastaje u reakciji oksidacije L-arginina u L-citrulin koju katalizira enzim NO sintaza (NOS) uz prisutnost elektrona nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata (Poon, 2004).

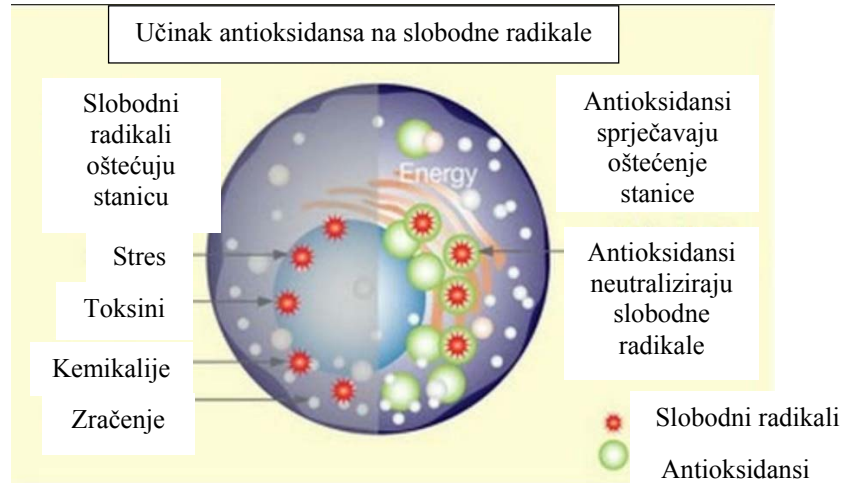
Ovaj radikal je sličan superoksidnom radikal. Slabije reagira s biomolekulama, iako ima nespareni elektron. On ima sposobnost stabiliziranja slobodnih radikala npr. superoksidnog anionskog radikala i hidroksilnog radikala pri čemu stvara stabilnije produkte. Međutim, ukoliko nastanu veće količine radikala dušikovog oksida i superoksidnog radikala, njihovom reakcijom nastat će iznimno toksičan peroksinitrit. Ovisno o koncentraciji, pH i temperaturi, peroksinitriti reagiraju s biomolekulama te na taj način mogu izravno ili posredno, putem nusprodukata, oksidirati lipoproteine niske gustoće (Antelmann i Helmann, 2011) ili mogu reagirati s tirozinskim ostacima proteina uz oslobađanje ione bakra (Poon, 2004).

1.2.3. Reaktivni elektrofilni spojevi

Osim ROS i RNS spojeva koji imaju važnu ulogu u oksidacijskom stresu, potrebno je navesti i reaktivne elektrofilne spojeve (RES, od engl. *reactive electrophile species*). Ovi spojevi mogu nastati tijekom metabolizma ili kao nusprodukti reakcija u kojima su sudjelovali ROS i RNS. RES spojevi su karakteristični po nedostatku jednog elektrona u ugljikovom centru. U navedene spojeve spadaju aldehidi, kinoni i epoksidi (Valko i sur., 2007).

1.3. Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi koji nastoje inhibirati ili usporiti oksidaciju molekula i time stvaranje slobodnih radikala (Slika 3.). Ti spojevi se smatraju donorima elektrona koji imaju ulogu neutraliziranja u organizmu nepotrebne povećane količine slobodnih radikala (Ahmed, 1999). Od iznimne je važnosti održavanje ravnoteže između antioksidansa i slobodnih radikala u organizmu u cilju pravilnog funkcioniranja stanica (Valko i sur., 2006).



Slika 3. Učinak antioksidansa na slobodne radikale (Slika 3. preuređena prema <http://www.dayahsprinter.com/2017/05/jenis-jenis-antioksida-dan-manfaat-pada.html>).

Mehanizam djelovanja antioksidansa podrazumijeva:

- 1.) sprječavanje nastanka ROS-a,
- 2.) uklanjanje spojeva pomoću citoprotektivnih enzima; glutacione peroksidaze (GPx), glutacione reduktaze (GSR), SOD, katalaze (CAT) te drugih antioksidansa (vitamin C, E, selen, glukoza, urati),
- 3.) eliminacija uništenih molekula ili popravak oštećenja (Gopalakrishnan i Starlin, 2013; Čepelak i Čvorišćec, 2009).

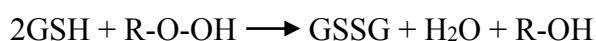
Antioksidanse možemo podijeliti:

- 1.) prema podrijetlu (endogeni, egzogeni),
- 2.) prema mjestu djelovanja (stanični, izvanstanični, membranski),
- 3.) prema topljivosti u vodi ili lipidima,
- 4.) prema načinu djelovanja (preventivni, čistači, enzimi popravka) (Čepelak i Čvorišćec, 2009).

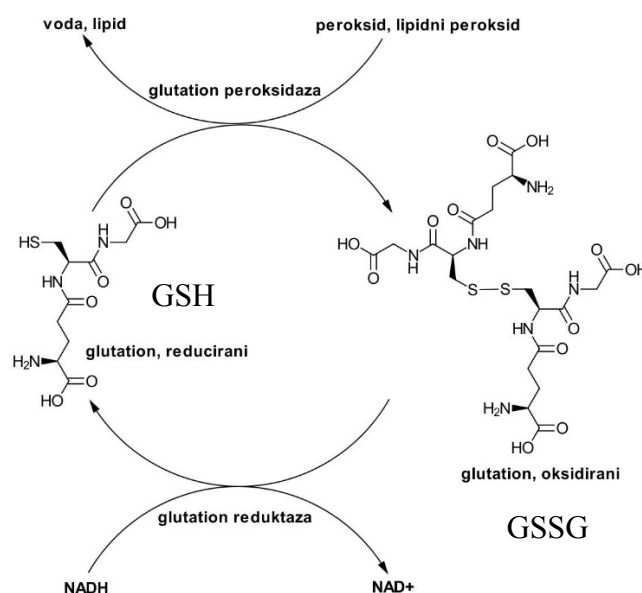
1.4. Glutation

Glutation je vrlo značajan i iznimno zastupljen antioksidans u organizmu, tripeptid sa sulfhidrilnom skupinom. Sulfhidrilna skupina glutaciona je donor elektrona u reakciji sa slobodnim radikalima te ih na taj način nastoji stabilizirati dok se ona oksidira u disulfidni oblik (Xiong i sur., 2001). Tim procesom štiti stanicu od oksidacijskog stresa (Valko i sur., 2006).

Glutation sadrži glicin, cistein i glutamat. Pojavljuje se u oksidiranom i reduciranom obliku. Uglavnom se nalazi u reduciranom obliku (GSH), a samo 5 % glutaciona se nalazi u oksidiranom obliku (GSSG). Za održavanje homeostaze u stanici bitan je omjer reduciranog i oksidiranog oblika (GSH/GSSG). U oksidacijskom stresu omjer GSH/GSSG je smanjen u staničnim odjeljcima (Strayer, 1991).



Unutarstanična koncentracija glutaciona kreće se u rasponu od 0,5 do 10 mmol/L ovisno o tipu stanice. Glutation smatramo tiolnim puferom stanice koji ima ulogu održavanja tiolnog redoks statusa pomoću glutacione reduktaze. Glutaciona reduktaza prevodi GSSG, koji je nastao kao posljedica stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (poput vodikovog peroksida i organskih peroksida), ponovno u GSH (Slika 4.) (Dickinson i Forman, 2002).



Slika 4. Glutation - redukcija – oksidacija (Slika 4. preuređena prema <https://www.plantagea.hr/zbirka-tekstova/antioksidansi-pocetak/>).

Jedan od karakterističnih procesa u oksidacijskom stresu u kojem sudjeluje glutacion je posttranslacijska modifikacija u kojoj dolazi do modifikacije redoks osjetljive skupine proteina. Taj proces se naziva S-glutacionilacija (Antelmann i Helmann, 2011).

Glutacion ima sposobnost prolaska kroz membranu cjelovito ili rascijepljen na aminokiseline. U slučaju prolaska u rascijepljenom obliku, nakon prolaska kroz membranu, ponovno se spaja u cjelovit oblik. Enzim koji je značajan u procesu cijepanja GSH naziva se γ -glutamil transferaza (GGT). Navedeni enzim cijepa izvanstanični GSH na glutamat i cisteinil-glicin. Cisteinil-glicin će naknadno biti pocijepan uz pomoć membranske dipeptidaze na glicin i cistein. Po prolazu kroz membranu u unutarstanični prostor pocijepani GSH povezuje se pomoću enzima γ -glutamilcistein sintetaze (γ -GCS) i glutacion sintetaze (GCL) (Xiong i sur., 2011).

1.5. Tioli

Tiol je organosumporni spoj koji u sastavu ima sulfhidrilnu skupinu-SH, a ona je vezana na ugljikov atom. Smatramo ga analogom alkohola obzirom da na mjestu na kojem se kisik nalazi u alkoholu, u tiolima se nalazi sumpor (Pine, 1999).

Važnost tiola je u njihovoj antioksidacijskoj ulozi koja se ostvaruje u procesu popravka oštećenja, nastalih djelovanjem ROS, RNS i RES. Njihova antioksidacijska uloga obuhvaća i obrambene mehanizme koji preveniraju moguća oštećenja djelovanjem slobodnih radikala. Nositelji navedene antioksidacijske uloge tiola su albumini koji sadrže veliku količinu tiolnih skupina (Antelmann i Helmann, 2011).

Tiolne skupine su podložne oksidaciji pa tako u reakcijama oksidacije u prisutnosti baze daju organske disulfide. Do oksidacije tiolne skupine cisteina može doći enzimski uz pomoć tiol oksidaze, ali i ne-enzimski u reakcijama s nereaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima te s RES-om (Held i Gibson, 2012). U tim ne-enzimskim reakcijama, u kojim sudjeluju ROS, oksidacijom tiola dolazi do stvaranja sulfenske (R-SOH), sulfinske (RSOOH) i sulfonske kiseline (RSO₃H) (Marino i Gladyshev, 2009). Sulfenska kiselina smatra se glavnim intermedijarom u reakciji s ROS-om. Rijetko se reakcije oksidacije zaustavljaju na navedenom intermedijaru već dolazi do daljnje oksidacije pri čemu nastaju spojevi sulfinska i sulfonska kiselina (Antelmann i Helmann, 2011).

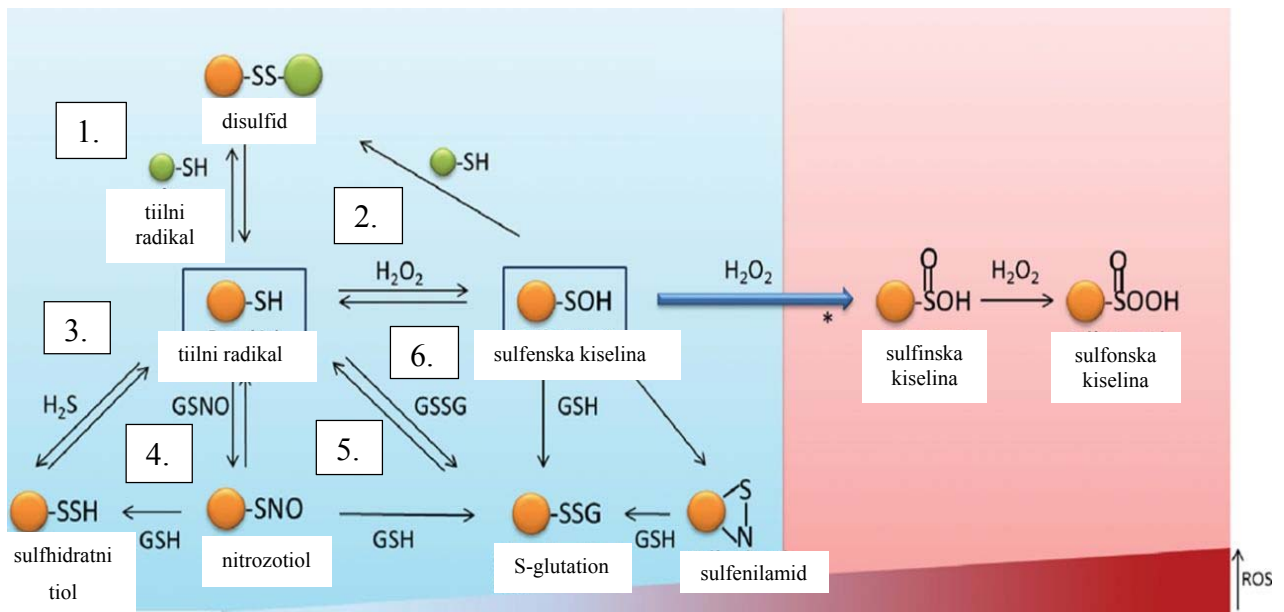
Navedene kiseline značajni su nam parametri oksidacijskog stresa. Sulfinska i sulfonska kiselina nakon oksidacije ne mogu se vratiti u reducirani oblik, dok sulfenska kiselina ima mogućnost da stupi u reakciju s glutationom i cisteinom preko S-tiolacije. S-tiolacija značajna je reverzibilna modifikacija kao i S-glutationilacija obzirom da sprječava nastanak velike koncentracije oksidiranih oblika (Antelman i Helmann, 2011). Važno je napomenuti da i RNS imaju utjecaj u modifikaciji tiola pri čemu nastaju spojevi S-nitrozotiol (RS-NO) ili S-nitrotiol (R-SO₂). Također i RES mogu imati izravan i neizravan učinak na oksidacijsko stanje tiolnih skupina (Hu, 1994).

Radikali nastali iz tiola nazivaju se tiil ili tiolni radikali (RS[•]). Jedan od načina nastanka ovih radikala je uklanjanje vodika s tiola. Tiilni radikali jednostavno ulaze u reakciju s kisikom što pospješuje oksidaciju cisteinskih ostataka (Cai i Yan, 2013).

Važno je istaknuti da je za detekciju staničnog redoks statusa mnogo značajnije određivanje ukupne koncentracije tiola nego glutaciona obzirom da oni predstavljaju jači redoks pool nego glutation zasebno (Held i Gibson, 2012).

Na Slici 5. prikazana je detaljna oksidativna posttranslacijska modifikacija tiolne skupine cisteina. U tiolnoj skupini cisteina atom sumpora je bogat elektronima te ima mogućnost da se nalazi u brojnim oksidacijskim stanjima. ROS/RNS reagiraju s tiolnom skupinom što dovodi do oksidativnih posttranslacijskih modifikacija. Posttranslacijske modifikacije cisteina mogu biti reverzibilne ili ireverzibilne. Kako bi spriječili oksidacijski stres i teža oštećenja stanice težimo reverzibilnim reakcijama. U prisutnosti visoke koncentracije ROS prevodi tiolne u tiolne radikale (Antelmann i Helmann, 2011).

1. Stvaranje disulfidne veze moguće je i između tiolnih radikala dvaju nezavisnih slobodnih tiolnih skupina.
2. Sulfenska kiselina može se reverzibilno oksidirati stvarajući disulfidne veze unutar ili izvan proteina, međutim sulfenska kiselina može i reverzibilnom reakcijom preći u sulfenilamid ili S-glutacion.
3. Reakcijom sulfhidracije tiolni radikal reagira sa sumporovodičnom kiselinom te nastaje sulfhidratni tiol.
4. i 5. Stvaranje S-glutaciona (RSSG) je reverzibilna reakcija u kojoj oksidirani oblik glutaciona (GSSG) ili S-nitrozoglutacion (GSNO) reagira s tiolnim radikalom. Može nastati i od sulfeniliranih tiola (sulfenske kiselina) ili sulfenilamidinom reakcijom s GSH.
6. Reverzibilnom reakcijom tiolni radikal reagira s ROS-om te nastaje sulfenska kiselina. Ireverzibilnom oksidacijom sulfenske kiselina u prisutnosti ROS-a, reakcija ide u sulfinsku kiselinu, a zatim i u sulfonsku kiselinu ukoliko je dovoljno velika koncentracija ROS-a koji pospješuju oksidaciju (Slika 5.) (Chung i sur., 2012).

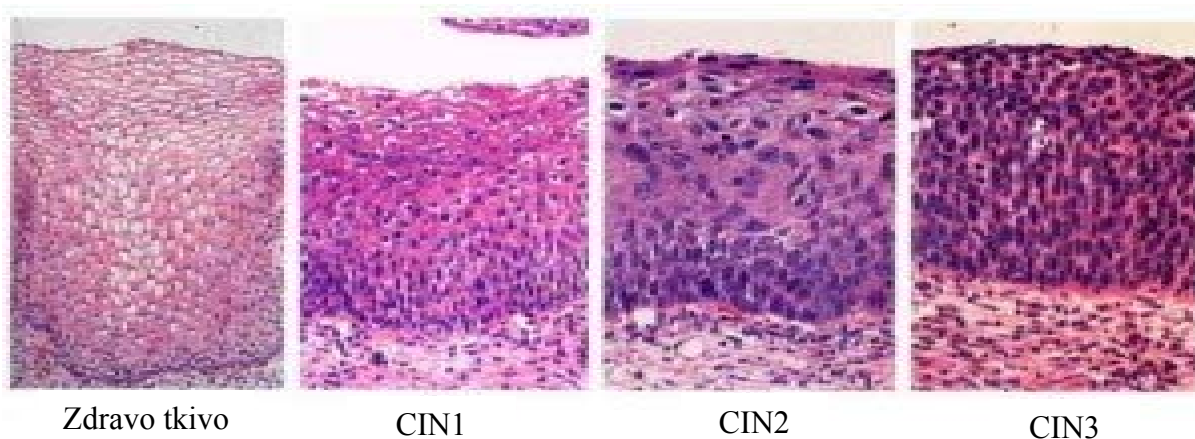


Slika 5. Oksidativne posttranslacijske modifikacije na cisteinu (Slika 5. preuređena prema literaturnom navodu Chung i sur., 2012).

1.6. Cervikalna intraepitelna neoplazija

Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) je premaligna promjena na vratu maternice (Soloman i sur., 2002). Promjene su vidljive kao atipične stanice unutar epitela vrata maternice, koje onemogućuju normalan razvoj i sazrijevanje epitela. Atipičnost se uočava u izgledu i veličini jezgre, promjeni kromatina te odnosu jezgre i citoplazme (Kumar i sur., 2007).

CIN može postati tumorsko oboljenje, ali oboljele promijenjene stanice vrata maternice imaju i mogućnost povrata u zdravo stanje (Di Domenici i sur., 2012). Obzirom na područje zdravog tkiva koje je zahvaćeno CIN-om razlikujemo 3 oblika promjena: CIN1, CIN2 i CIN3 (Slika 6.) (Kurman i sur., 2011).



Slika 6. Histološki izgled zdravog tkiva CIN1, CIN2 i CIN3 (Slika 6. preuređena prema https://www.google.com/search?q=Cervical-Intraepithelial-Neoplasia-and-Cervical-Cancer.&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi3x7SB-P7hAhVSw4sKHZJqDZIQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=p23I_t6PZXvVZM:).

Tablica 2. CIN prema stadijima (Kurman i sur., 2011).

Histološki stupnjevi	Citologija	Opis
CIN1	Intraepitelna lezija niskog stupnja (LSIL)	Blaga displazija koja zahvaća 1/3 debljine epitelnog presjeka
CIN2	Intraepitelna lezija visokog stupnja (HSIL)	Umjeren displazija koja zahvaća 2/3 debljine epitelnog presjeka
CIN3	Intraepitelna lezija visokog stupnja (HSIL)	Teška displazija koja zahvaća 2/3 debljine epitelnog presjeka

Postoji još jedan stadij promjene unutar oblika CIN 3, karcinom *in situ* (CIS). To je promjena u kojoj tumorske stanice nisu probile bazalnu membranu pa se tumor nalazi omeđen u određenom prostoru, obuhvaćajući samo epitelne stanice (Čorušić i Babić, 2005). Nije invazivan ukoliko na njega neće djelovati dodatni negativni faktori. Karcinom *in situ* pojavljuje se neposredno prije invazivnog karcinoma (Richart i Barron, 1969).

1.6.1. Čimbenici rizika razvoja karcinoma iz cervikalne intraepitelne neoplazije

CIN je premaligna promjena vrata maternice pa je za napredovanje u maligni stadij, uz humani papiloma virus (HPV) visokog rizika, potrebna i prisutnost ostalih čimbenika rizika: oksidacijski stres, aktivno i pasivno pušenje, prehrana, imunokompromitiranost, prisutnost infekcija i hormonske promjene (Slattery i sur., 1989). Pušenje suprimira aktivaciju obrambenog imunskog sustava čime potiče karcinogenezu (Viac i sur., 1990). Smanjen unos vitamina A, C i E povećavaju mogućnost napredovanja CIN-a u maligni stadij (Patterson i sur., 1997). Imunokompromitiranost bolestima: HIV-om, leukemijom, Hodgkinovom bolesti i transplantacijom također utječu povećavajući rizike razvoja bolesti. Eventualna prisutnost infekcija drugim mikroorganizmima nepovoljno će utjecati na daljnji razvoj bolesti pri čemu će doći do dodatnog oštećenja cervikalnog epitela (Castle i sur., 2003). Upotreba kontracepcije u vremenskom periodu duljem od 5 godina utjecat će na progresiju CIN-a (Moreno i sur., 2002). Potrebno je još istaknuti važnost utjecaja endogenih i genetskih čimbenika rizika za razvoj bolesti (Basta i sur., 2006).

1.6.2. Humani papiloma virus

HPV visokog rizika glavni je čimbenik napredovanja CIN-a u maligni stadij. (Di Domenici i sur., 2012).

U 90 % pacijentica kojima je dijagnosticiran rak vrata maternice utvrđena je prisutnost HPV virusa. Razlikujemo HPV visokog te niskog rizika. Upravo HPV visokog rizika uzročnik je raka vrata maternice. U HPV visokog rizika ubrajamo: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 i 58 (Vujić i Čorušić, 2004). Tip HPV-a 6 i 11 su niskog rizika te uzrokuju benigne genitalne bradavice dok tipovi HPV-a 16 i 18 imaju najvišu pojavnost kod pacijentica s rakom vrata maternice. Tendencija prevencije je u pravovremenim pregledima i ranom otkrivanju (screening pretrage) oboljenja. Prevenciju je moguće ostvariti monovalentnim/ bivalentnim/kvivalentnim cijepljenjem čija su meta prije svega tipovi HPV virusa 16 i 18. U slučaju oboljenja potrebno je prilagoditi terapiju stadiju oboljenja (Sturgeon i sur., 2010).

1.6.3. Oksidacijski stres i cervikalna intraepitelna neoplazija

Za napredovanje CIN-a u maligni stadij, uz infekciju HPV, važan je i utjecaj ROS i RNS. Uz neadekvatno djelovanje antioksidacijskih sustava te u prisutnosti HPV-a i drugih faktora rizika, može doći do progresije bolesti. Pri tom dolazi do pogrešaka u replikaciji DNA što omogućava integraciju virusa u stanicu domaćina i onemogućava normalno odvijanje apoptoze (De Marco, 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

CIN je predstadij raka vrata maternice koji se može razviti u maligno oboljenje, ali može ostvariti i regresiju (Kumar i sur., 2007). Prema dosadašnjim saznanjima nije moguće predvidjeti kod kojih pacijentica s CIN-om će se dogoditi progresija prema malignoj promjeni, a kod kojih regresija. Malignom razvoju bolesti, osim prisutnosti HPV-a, doprinosi oksidacijski stres i prisutnost ROS-a (Di Domenici i sur., 2012). Kod pacijentica oboljelih od raka vrata maternice dokazane su promjene u enzimskim i neenzimskim antioksidacijskim sustavima i povećana lipidna peroksidacija (Balci i sur., 2012; Arioiz i sur., 2009; Camuzcuoglu i sur., 2009; Beevi i sur., 2007; Delmaris i sur., 2007; Manju i sur., 2002a; Manju i sur., 2002b; Ahmed i sur., 1999). Obzirom da je povećana lipidna peroksidacija prisutna i u pacijentica s CIN-om možemo pretpostavljati kako antioksidacijski disbalans, uz ostale čimbenike rizika ima važnu ulogu u napredovanju CIN-a prema raku vrata maternice (Looi i sur., 2008; Kim i sur., 2003).

Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti koncentracije parametara oksidacijskog stresa, koncentraciju tiolnih skupina, MDA i GSH pacijentica s CIN-om. Drugi cilj ovog istraživanja je utvrditi dijagnostičku vrijednost koncentracije parametara oksidacijskog stresa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Istraživanje uključuje 62 ispitanice kojima je CIN potvrđen patohistološkom analizom (PHD). Ispitanice sa potvrđenim CIN-om su podijeljene u dvije podskupine na temelju citološke Bethesda klasifikacije. Jednu podskupinu činile su ispitanice sa skvamoznim intraepitelnim lezijama niskog stupnja (LSIL; od engl. *low squamous intraepithelial lesion*, n=19), a drugu ispitanice sa skvamoznim intraepitelnim lezijama visokog (HSIL; od engl. *high squamous intraepithelial lesion*, n=42). U LSIL promjene prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, od engl. *World Health Organization*) baziranoj na PHD analizi pripada CIN1 promjena, a u HSIL promjene pripadaju CIN2, CIN3 i CIS promjene.

Iz ispitivane grupe izdvojene su ispitanice s: bubrežnom i jetrenom bolesti, moždanim ili srčanim udarom, hipertenzijom, anginom pektoris, šećernom bolesti, endometrijozom, policističnim jajnicima, malignim bolestima, trudnice i ispitanice koje uzimaju lijekove koji remete metabolizam masti i ugljikohidrata.

U kontrolnu skupinu uključeno je 112 zdravih žena s urednim Papanicolau testom (PAPA-test) unazad 2 godine kao i što sličnijim kriterijima podudarnosti u dobi, načinu života i utjecaju okoliša s ispitanicama s CIN-om. Iz kontrolne skupine izdvojene su ispitanice prema istim kriterijima kao i ispitanice s CIN-om.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog Bolničkog Centra – „Sestre Milosrdnice“ i Poliklinike „Aviva“. Sve ispitanice su potpisale informativni pristanak za sudjelovanje u studiji.

Koncentracija tiola, MDA i GSH određivana je u uzorcima seruma. Uzorkovanje je provedeno kod pacijentica 12 sati nakon posljednjeg obroka, u ranim jutarnjim satima. Uzorci seruma su centrifugirani 15 minuta na 3000 okretaja/min, nakon čega je supernatant odvojen i pohranjen u nekoliko alikvota na -20⁰ C do analiza.

3.2. Metoda određivanja tiola u serumu

U istraživanju je korištena spektrofotometrijska metoda za određivanje koncentracije tiola čiji je osnovni princip reakcija tiolnih skupina s reagensom DTNB (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina). U ovoj reakciji nastaje žuto obojeni produkt, anion TNB⁻ čiju apsorbanciju mjerimo na 412 nm.

Reagensi koji su korišteni:

- 10 mmol/L DTNB koji je otopljen u apsolutnom metanolu
- 0,25 mol/L Tris pufer u kojem se nalazi 20 mmol/L EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), pH 8,2
- apsolutni metanol
- destilirana voda

Za određivanje koncentracije tiola pomiješani su: 10 μL DTNB-a, 150 μL TRIS – EDTA pufera, 790 μL apsolutnog metanola i 50 μL seruma. Slijepa proba reagensa sadržavala je: 10 μL DTNB-a, 150 μL TRIS – EDTA pufera, 790 μL apsolutnog metanola i 50 μL vode. Slijepa proba uzorka sadržavala je: 150 μL pufera, 790 μL apsolutnog metanola, 50 μL seruma i 10 μL destilirane vode. Uzorci i slijepa probe inkubirani su 20 min na 25 °C te centrifugirani na 3000 g u trajanju od 10 min. Apsorbancija u supernatantu izmjerena je na spektrofotometru CECIL CE 7200 na 412 nm. Za podešavanje spektrofotometra na 0 korištena je destilirana voda.

$$\begin{aligned}\text{Koncentracija tiola (mmol/L)} &= (A-B-C) * V * 10^3 / v * \epsilon * b \\ &= (A-B-C) * 1\text{mL} * 10^3 / 0,05\text{ mL} * 13600\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1} * 1\text{ cm} \\ &= (A-B-C) * 1,47\text{ mmol/L}\end{aligned}$$

A – apsorbancija probe

B – apsobancija slijepa probe reagensa

C – apsorbancija slijepa probe uzorka

V – volumen reakcijske smjese

v – volumen uzorka

ε – molarni apsorpcijski koeficijent

b – debljina kivete

10³ – faktor za preračunavanje M u mM

3.3. Metoda određivanja reduciranog glutationa u serumu

Za određivanje koncentracije reduciranog glutationa korištena je spektrofotometrijska metoda po Ellmanu (Rumora i sur., 2007). Ova metoda temelji se na reakciji glutationa s 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB). Nakon kidanja disulfidne veze, nastaje 2-nitro-5-tiobenzoat (NTB⁻). Nastali NTB⁻ ionizira se u NTB²⁻ koji je žuto obojen.

Reakcijska smjesa je sadržavala 50 µL DTNB-a, 850 µL fosfatnog pufera i 100 µL seruma za određivanje koncentracije glutationa u uzorku seruma. Serija razrjeđenja standarda GSH (50 µL DTNB-a, 850 µL fosfatnog pufera i 100 µL razrijeđenog standarda) korištena je za izradu standardne krivulje. Slijepa proba je sadržavala 50 µL DTNB-a, 850 µL fosfatnog pufera i 100 µL vode. Nakon mjerenja apsorbancije na 410 nm, određena je koncentracija reduciranog GSH-a pomoću standardne krivulje.

3.4. Metoda određivanja malondialdehida u serumu

Modificirana metoda po Drury-u i suradnicima korištena je za određivanje MDA u serumu (Domjan i sur., 2014; Drury i sur., 1997). Metoda se temelji na reakciji MDA iz seruma s tiobarbituratnom kiselinom (TBA). U ovoj reakciji nastaje crveni pigment koji se određuje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC, od engl. *high performance liquide chromatography*). Specifičnost reakcije povećana je uporabom antioksidansa butiliranog hidroksitoluena (BHT) i primjenom HPLC-a. HPLC pomaže u odvajanju MDA-TBA od drugih komponenti u reakcijskoj smjesi koje također apsorbiraju na istoj valnoj duljini. Reakcijska smjesa je sadržavala 50 µL seruma, 5 µL 0,2 %-tnog BHT-a i 750 µL 1 %-tnog H₃PO₄. Nakon miješanja sadržaja u epruveti, u reakcijsku smjesu dodaje se 250 µL 0,6 %-tnog TBA-a i 445 µL vode HPLC čistoće. Ponovno promiješana smjesa se inkubira u vodenoj kupelji na 100 °C u trajanju od 20 minuta, a potom se reakcija zaustavlja uranjanjem epruvete u hladnu vodu. Zatim se uzorci prenose u automatski ubacivač uzoraka koji je zagrijan na temperaturu od 15 °C te se koncentracija određuje pomoću HPLC-a. Mobilna faza se sastoji od 50 mmol/L KH₂PO₄ i metanola HPLC čistoće u omjeru 60:40, pH 6,8. Protok mobilne faze je 1 mL/min. Korištena je analitička kolona obrnute faze C18 zagrijana na temperaturu od 32 °C uz valnu duljinu UV detektora 532 nm i vrijeme zadržavanja MDA na

analitičkoj koloni od 2,5 min. U posljednjoj fazi, pomoću standardne krivulje 1,1,3,3-tetrametoksi propana poznate koncentracije, određuje se koncentracija MDA-a u $\mu\text{mol/L}$.

3.5. Statistička obrada podataka

Dobiveni podatci analizirani su programom SigmaStat inačice 3.5 te programom Medcalc inačica 17.9.2. Putem deskriptive analize obradili smo osnovna obilježja parametara. Normalnost podataka testirana je Kolmagorov-Smirnov-im testom. Vrijednosti podataka koji imaju normalnu razdiobu izraženi su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, dok su vrijednosti podataka koji nemaju normalnu razdiobu izraženi kao medijan (interkvartilni raspon). Parametrijski t-test korišten je za usporedbu dviju, a ANOVA za više od dvije skupine podataka koji imaju normalnu razdiobu. Neparametrijski Mann-Whitneyev test korišten je za usporedbu dviju skupina podataka, a Kruskal-Wallisov test i Dunnova metoda za posthoc testiranje za više od dvije skupine podataka koji nisu imali normalnu razdiobu. Za ispitivanje određenih parametara kao prediktora CIN-a korištena je univarijantna i multivarijantna logistička regresija. Vrijednost $P < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

Koncentracija parametara oksidacijskog stresa tiola, MDA i GSH uspoređena je između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. Navedeni parametri su uspoređeni i između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om koje su podijeljene u dvije podskupine. U prvu podskupinu svrstane su ispitanice s CIN-om niskog rizika (LSIL), a koje prema PHD analizi pripadaju u skupinu CIN1 promjena. U drugu podskupinu svrstane su ispitanice s CIN-om visokog rizika (HSIL), a koje prema PHD analizi pripadaju u skupinu CIN2, CIN3 i CIS promjena.

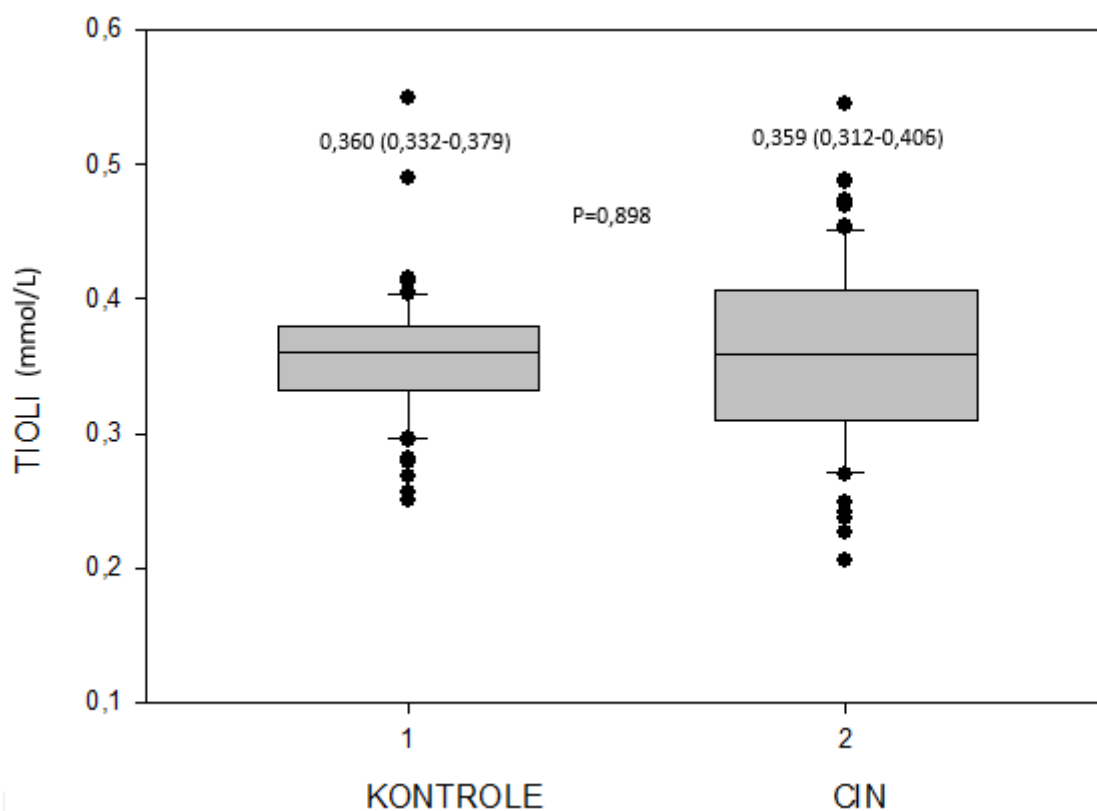
4.1. Demografske karakteristike ispitivanih skupina

Podaci za dob kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om testirani su t-testom. Dobiveni podaci prikazani su kao medijan (min-max). Medijan (min-max) za kontrolnu skupinu ispitanica bio je 39 (21-69) godina, a za skupinu ispitanica s CIN-om 37 (19-63) godina. Usporedbom rezultata podataka obaju skupina pronađena je statistička razlika ($P=0,038$).

Podaci za dob kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s LSIL te HSIL promjenama testirani su ANOVA testom. Dobiveni podaci prikazani su kao medijan (min-max). Medijan (min-max) za kontrolnu skupinu ispitanica bio je 39 (21-69) godina, a za skupinu ispitanica s LSIL promjenama 40 (24-50) godina te skupinu ispitanica s HSIL promjenama 34 (19-63) godina. Usporedbom rezultata podataka obaju skupina pronađena je statistička razlika ($P=0,032$).

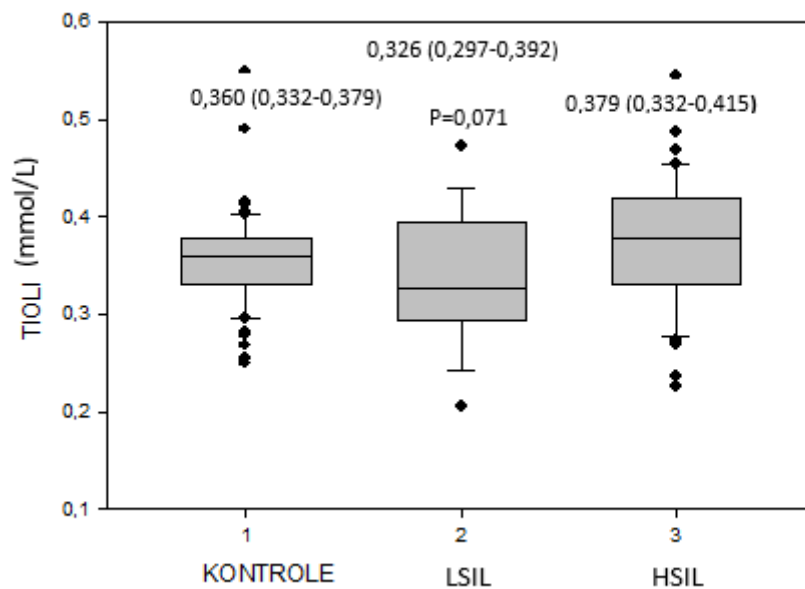
4.2. Koncentracija tiola

Na Slici 7. prikazane su koncentracije tiola u kontrolnoj skupini i skupini pacijentica s CIN-om. Koncentracija tiola ne razlikuje se između ispitivanih skupina ($P=0,898$).



Slika 7. Koncentracija tiola u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanica s CIN-om. Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Testirano Mann-Whitney testom.

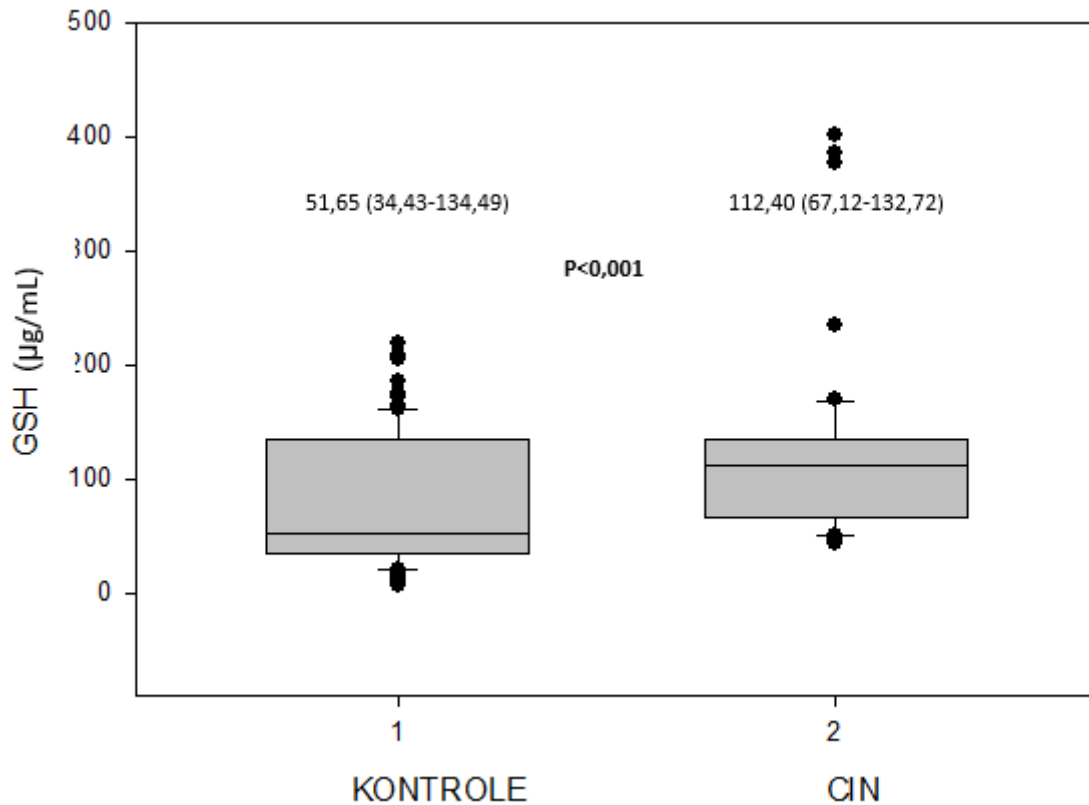
Koncentracija tiola u kontrolnoj skupini ispitanica i skupina ispitanica s LSIL i HSIL promjenama prikazana je na Slici 8. Koncentracija tiola ne razlikuje se između tri ispitivane skupine ($P=0,071$).



Slika 8. Koncentracija tiola u kontrolnoj skupini i skupini ispitanica s LSIL i HSIL promjenama. Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Testirano Kruskal-Wallis testom.

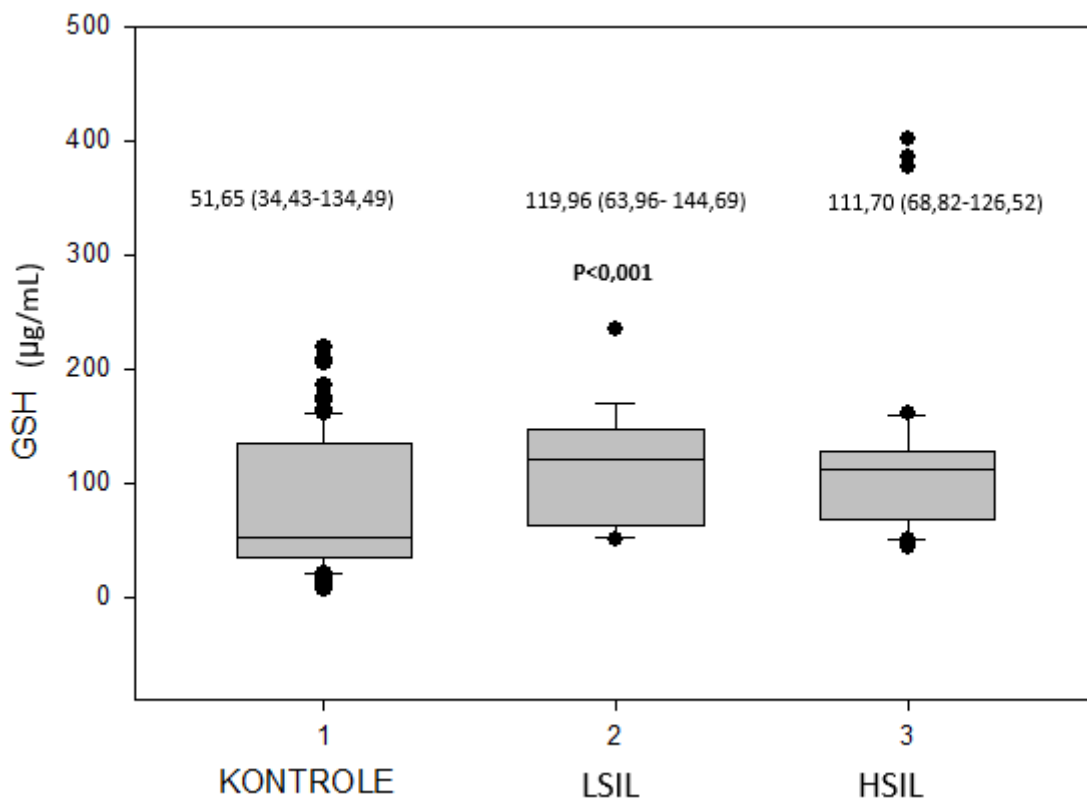
4.3. Koncentracija reduciranog glutationa

Na Slici 9. prikazane su koncentracije reduciranog glutationa u kontrolnoj skupini i skupini pacijentica s CIN-om. Koncentracija GSH bila je viša u skupini pacijentica s CIN-om ($P < 0,001$).



Slika 9. Koncentracija GSH u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanica s CIN-om. Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Testirano Mann-Whitney testom.

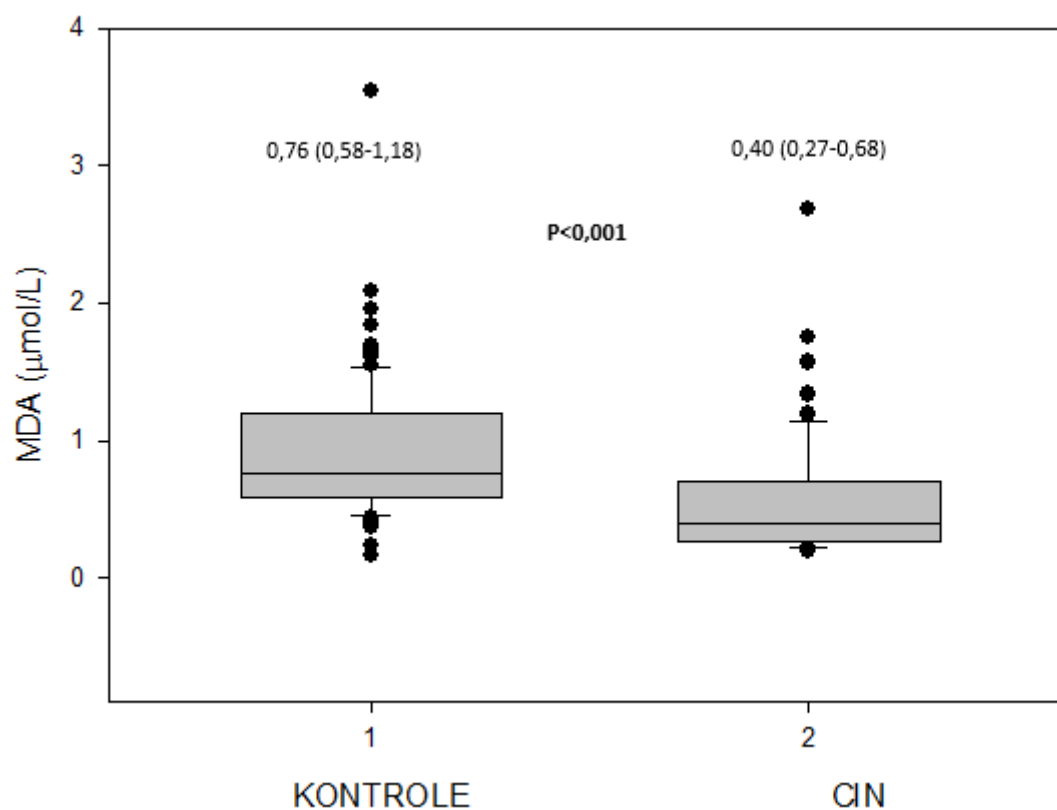
Koncentracija glutationa u kontrolnoj skupini ispitanica i skupini ispitanica s LSIL i HSIL promjenama prikazana je na Slici 10. Koncentracija glutationa značajno je različita između tri ispitivane skupine ($P < 0,001$). Posthoc testiranjem utvrđeno je kako je koncentracija GSH značajno viša u ispitanica s LSIL promjenama u odnosu na ispitanice s HSIL promjenama. Također smo utvrdili kako je koncentracija GSH niža u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu ispitanica s LSIL promjenama kao i u ispitanica s HSIL promjenama.



Slika 10. Koncentracija GSH u kontrolnoj skupini i skupini ispitanica s LSIL i HSIL promjenama. Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Testirano Kruskal-Wallis testom.

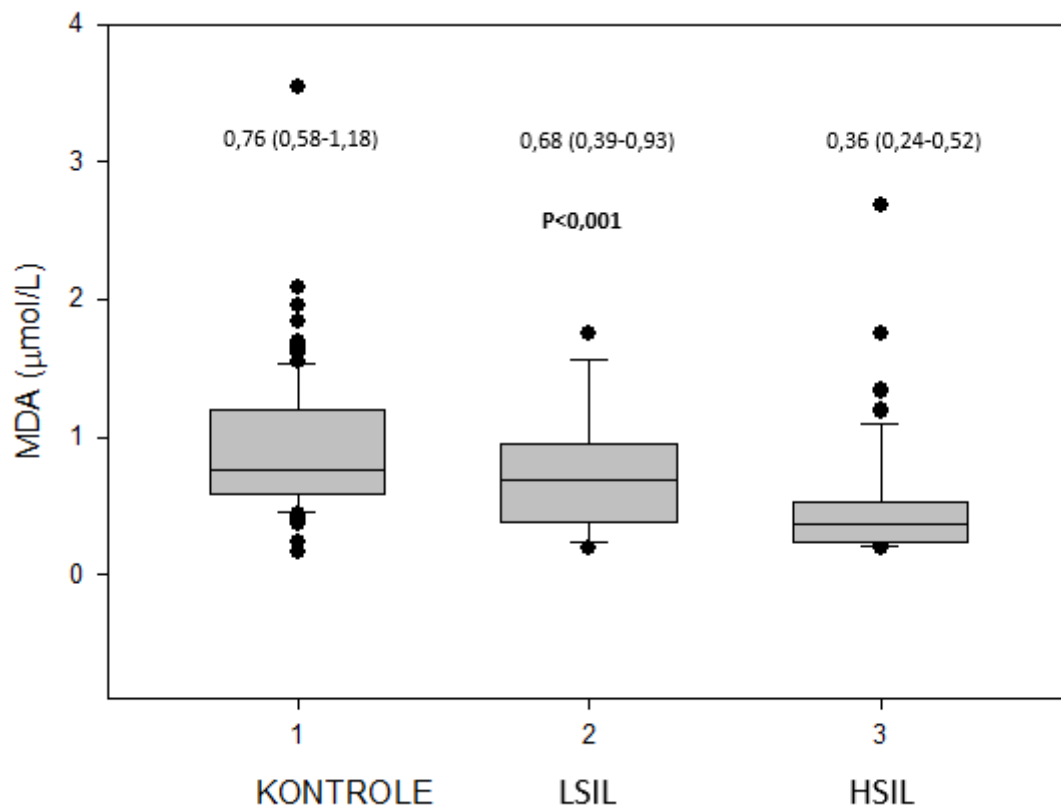
4.4. Koncentracija malondialdehida

Na Slici 11. prikazana je koncentracija malondialdehida u kontrolnoj skupini i skupini pacijentica s CIN-om. Usporedbom rezultata utvrđena je značajno niža koncentracija MDA u skupini ispitanica s CIN-om u odnosu na skupinu kontrolnih ispitanica ($P < 0,001$).



Slika 11. Koncentracija MDA u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanica s CIN-om. Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Testirano Mann-Whitney testom.

Slika 12. prikazuje koncentraciju MDA-a u kontrolnoj skupini, skupini pacijentica s LSIL promjenama te pacijentica s HSIL promjenama koja je značajno različita ($P < 0,001$). Posthoc testiranjem utvrđeno je da se koncentracija MDA u kontrolnoj skupini i skupini pacijentica s LSIL promjenama značajno ne razlikuju. S druge strane posthoc testiranje je dokazalo značajno višu koncentraciju MDA u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitanice s HSIL promjenama. Također je utvrđeno kako je koncentracija MDA u skupini pacijentica s LSIL promjenama značajno viša u odnosu na pacijentice s HSIL promjenama.



Slika 12. Koncentracija MDA u kontrolnoj skupini i skupini ispitanica s LSIL i HSIL promjenama. Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Testirano Kruskal-Wallis testom.

4.5. Univarijantna i multivarijantna regresijska analiza parametara oksidacijskog stresa

U Tablici 3. prikazani su rezultati univarijantne i multivarijantne analize za GSH i MDA. Univarijantnom regresijskom analizom pokazano je da se ispitivani parametri GSH i MDA mogu razmotriti kao prediktori CIN promjena. Korištenjem univarijantnog regresijskog modela za GSH postignut je AUC (od engl. *area under the curve*) (95 % CI) (od engl. *confidence interval*) od 0,694 (0,619-0761) te je 60,34 % ispitanica ispravno svrstano u skupinu pacijentica s CIN-om. Univarijantni regresijski model za MDA postigao je AUC (95 % CI) od 0,764 (0,694 – 0,825) i pri tom ispravno svrstao 78,16 % ispitanica u skupinu pacijentica s CIN-om. Multivarijantni regresijski model je postigao AUC (95 % CI) od 0,770 (0,700 – 0,830) i time je svrstano 70,69 % ispitanica u skupinu pacijentica s CIN-om.

Tablica 3. Univarijantna i multivarijantna logistička regresijska analiza parametara oksidacijskog stresa GSH i MDA.

	UNIVARIJANTA omjer izgleda (95% interval pouzdanosti)	P	MULTIVARIJANTA omjer izgleda (95% interval pouzdanosti)	P
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0,1354 (0,0511 – 0,3587)	<0,001	0,1310 (0,0475 – 0, 3614)	<0,001
GSH ($\mu\text{g/mL}$)	1,0099 (1,0043 – 1,0156)	0,001	1,0103 (1,0042 – 1,0163)	0,001

Koncentracija tiolnih skupina nije se razlikovala između ispitivanih skupina te nije uvršten kao parametar u regresijski model.

5. RASPRAVA

CIN je premaligna promjena vrata maternice za koju je nemoguće predvidjeti u kojem će se smjeru razvijati promjena (Kumar i sur., 2007). Dvije su mogućnosti daljeg napredovanja promjene. Premaligna promjena može napredovati prema malignoj promjeni uz prisutnost HPV infekcije visokog rizika i drugih faktora rizika. Neki od faktora rizika su povećani oksidacijski stres, pušenje, infekcije drugim mikroorganizmima, promjene hormonskog statusa, imunosupresija. Nije poznato koji su od sporednih faktora ključni u razvoju prema malignoj promjeni uz glavni faktor HPV. Druga mogućnost je regresija koja vodi prema ozdravljenju (Di Domenici i sur., 2012). Više od 90 % infekcija HPV-om prolaze bez posljedica tokom nekoliko mjeseci ili kroz dvije godine, bez obzira da li je infekcija uzrokovala citološke promjene (Stanley, 2006). U slučaju ranog otkrivanja oboljenja, efikasno liječenje može donijeti uspješne rezultate (Sturgeon i sur., 2010).

Povećana lipidna peroksidacija i promjene u enzimskim i neenzimskim antioksidacijskim sustavima utvrđene su u istraživanjima, u kojima su određivani parametri oksidacijskog stresa, u serumu bolesnica s rakom vrata maternice. Smanjenu koncentraciju GSH, vitamina E i C, smanjenu aktivnost GPx-a te povećanu koncentraciju lipidnih peroksida ustanovio je Ahmed sa suradnicima kod ispitanica s rakom vrata maternice (Ahmed i sur., 1999). Beevi i suradnici utvrdili su prisutnost oksidacijskog stresa uz porast MDA i smanjenje GPx-a u navedenih ispitanica (Beevi i sur., 2007). Manju i suradnici ustanovili su smanjenu koncentraciju GSH, vitamina C i E, povećanu koncentraciju lipidnih peroksida te sniženu aktivnost GPx-a, glutation S transferaze (GST) u ispitanica s rakom vrata maternice (Manju i sur., 2002a; Manju i sur., 2002b).

Slijede istraživanja u kojima su određivani parametri oksidacijskog stresa u bolesnica s CIN-om i rakom vrata maternice. Looi i suradnici ustanovili su porast koncentracije MDA u skupini ispitanica s CIN-om i rakom vrata maternice u usporedbi s kontrolnom skupinom (Looi i sur., 2008). Kim i suradnici ustanovili su kako je koncentracija MDA najveća u ispitanica s CIN-om, srednja u pacijentica s rakom vrata maternice i najniža u kontrolnoj skupini. Uočeno je smanjeno djelovanje antioksidacijskog sustava u skupini bolesnica s CIN-om i još veće smanjenje u pacijentica s rakom vrata maternice u odnosu na kontrolnu skupinu (Kim i sur., 2003).

Slobodne tiolne skupine u serumu su pretežno prisutne na albuminima. Albumini reagiraju sa slobodnim radikalima te dolazi do njihove oksidacije. Oni su značajni antioksidansi koji imaju ograničeni kapacitet (Mallikarjunappa i sur., 2007). De Marco je pokazao kako je povećana razina oksidiranih tiolnih skupina proteina u uzorcima tkiva raka vrata maternice u usporedbi s normalnim tkivom (De Marco, 2013).

U provedenom istraživanju nismo utvrdili razliku u koncentraciji tiolnih skupina između kontrolne skupine i skupine pacijentica s CIN-om. Također nije ustanovljena statistički značajna razlika u koncentraciji tiola između kontrolne skupine, skupine pacijentica s LSIL i HSIL promjenama.

Glutation je važan član antioksidacijskog obrambenog sustava organizma. On je po sastavu tripeptid (L- γ -glutamil-L-cisteinil glicin) u kojem posebno važnu ulogu ima sulfidrilna skupina. Navedena se skupina u reakciji sa slobodnim radikalima, čija je koncentracija povišena kada je narušena homeostaza organizma, oksidira u disulfidni oblik. Na taj način glutacion ostvaruje svoju obrambenu ulogu u organizmu (Xiong i sur., 2011).

Koncentracija reduciranog GSH u provedenom istraživanju je viša u skupini pacijentica s CIN-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, koncentracija reduciranog GSH nije pokazala statistički značajnu razliku između skupine pacijentica s LSIL i HSIL promjenama. Međutim, koncentracija reduciranog GSH je niža u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu ispitanica s LSIL promjenama kao i u odnosu na skupinu ispitanica s HSIL promjenama. Povećana koncentracija reduciranog GSH u bolesnica s CIN-om ukazuje na aktivaciju antioksidacijskog obrambenog sustava organizma.

U istraživanju smo također mjerili koncentraciju MDA. Parametar oksidacijskog stresa MDA nastaje u lančanoj reakciji lipidne peroksidacije kao sekundarni produkt. Navedena reakcija odvija se pri visokoj koncentraciji slobodnih radikala (Černe i sur., 2006).

Koncentracija MDA niža je u skupini pacijentica s CIN-om nego u kontrolnoj skupini. Nadalje, koncentracija MDA je viša u kontrolnoj skupini ispitanica nego u pacijentica s HSIL promjenama. Također je utvrđeno kako je koncentracija u skupini s LSIL promjenama viša u odnosu na pacijentice s HSIL promjenama. Dobiveni rezultati potvrđuju prethodno iznesen zaključak o aktivaciji antioksidacijskog sustava koji moguće posljedično sprječava lipidnu peroksidaciju i nastanak MDA u žena s CIN-om.

Univarijantnom i multivarijantnom regresijskom analizom ispitani su parametri MDA i GSH kao mogući prediktori CIN-a te su se ovi parametri pokazali kao potencijalni prediktori ove promjene.

Univarijantni regresijski model za GSH postigao je AUC (95 % CI) od 0,694 (0,619 - 0,761) te ispravno svrstao 60,34 % ispitanica u skupinu pacijentica s CIN-om. Dok je univarijantni regresijski model za MDA postigao AUC (95 % CI) od 0,764 (0,694 – 0,825) i pri tom ispravno svrstao 78,16 % ispitanica u skupinu pacijentica s CIN-om. U multivarijantnom logističkom regresijskom modelu uz AUC (95 % CI) od 0,770 (0,700 – 0,830) ispravno je svrstano 70,69 % ispitanica u skupinu pacijentica s CIN-om.

6. ZAKLJUČAK

Koncentracija tiola između kontrolne skupine i skupine pacijentica s CIN-om nije pokazala statistički značajnu razliku. Koncentracija tiola, također, se nije razlikovala između kontrolne skupine, skupine pacijentica s LSIL i HSIL promjenama.

Koncentracija reduciranog glutaciona viša je u skupini pacijentica s CIN-om nego u kontrolnoj skupini. Koncentracija reduciranog glutaciona značajno je veća u skupini ispitanica s LSIL promjenama u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica. Također skupina ispitanica s LSIL promjenama ima značajno veću koncentraciju glutaciona u odnosu na skupinu ispitanica s HSIL promjenama. Koncentracija reduciranog glutaciona nije se razlikovala između kontrolne skupine i skupine ispitanica s HSIL promjenama.

Koncentracija MDA niža je u skupini pacijentica s CIN-om nego u kontrolnoj skupini. Nadalje, koncentracija MDA je viša u kontrolnoj skupini ispitanica nego u pacijentica s HSIL promjenama. Također, koncentracija MDA u skupini s LSIL promjenama viša je u odnosu na pacijentice s HSIL promjenama. Koncentracija MDA nije se razlikovala između kontrolne skupine i skupine pacijentica s LSIL promjenama.

U univarijantnom modelu parametri oksidacijskog stresa MDA i GSH, obrađeni univarijantnom regresijskom analizom, pokazali su se kao prikladni parametri za predviđanje CIN-a jer je ispravno klasificirano 78,16 % i 60,34 % ispitanica s CIN-om. Multivarijantni logistički regresijski model koji uključuje MDA i GSH ispravno klasificira u skupinu CIN-a 70,69 % ispitanica.

7. LITERATURA

1. Ahmed MI, Fayed ST, Hossein H, Tash FM. Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinom. *Dis Markers*, 1999, 15, 283-291.
2. Antelmann H, Helmann JD. Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14, 1049-1063.
3. Antioksidansi-početak, 2015., <https://www.plantagea.hr/zbirka-tekstova/antioksidansi-pocetak/>, pristupljeno 9.12.2018.
4. Ario DT, Camuzcuoglu H, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O. Assessment of serum paraoxonase and arylesterase activity in patients with endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2009, 30, 679-682.
5. Balci H, Genc H, Papila C, Can G, Papila B, Yanardag H, Uzun HJ. Serum lipid hydroperoxide levels and paraoxonase activity in patients with lung, breast, and colorectal cancer. *Clin Lab Anal*, 2012, 26, 155-160.
6. Basta A, Jordan J, Singer A. The Cervix. Massachusetts, Blackwell Publishing, 2006, str. 122.
7. Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*, 2007, 375, 119-123.
8. Buico A, Cassino C, Ravera M, Betta PG, Osella D. Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma. *Redox Rep*, 2009, 14, 125-131.
9. Bukan N, Sancak B, Yavuz O, Koca C, Tuken F, Ozcelikay AT, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Biochem Biophy*, 2000, 40, 447-450.

10. Cai Z, Yan LJ. Protein Oxidativ Modifications: Beneficial Roles Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res*, 2013, 1, 15-26.
11. Camuzcuoglu H, Arioz DT, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2009, 112, 481-485.
12. Cao G, Prior RL, Sofic E. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids-structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22, 749-760.
13. Castle PE, Giuliano AR. Genital tract infections, cervical inflammation and antioxidant nutrients assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Inst Monogr*, 2003, 31, 29-34.
14. Cervical Intraepithelial Neoplasia, Cervical Cancer Stages, 2011., https://www.google.com/search?q=Cervical-Intraepithelial-Neoplasia-and-Cervical-Cancer.&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi3x7SB-P7hAhVSw4sKHZJqDZIQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=p23I_t6PZXvVZM, pristupljeno 3.11.2018.
15. Chandra N, Lobo V, Patil A, Phatak A. Free radicals, antioxidants and functional foods-impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4, 118-126.
16. Chung HS, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, Van Eyk JE. Cysteine Oxidative Posttranslational Modifications Emerging Regulation in the Cardiovascular System. *Circ Res*, 2013, 112, 382-392.
17. Čepelak I. Slobodni radikali i antioksidansi. U: Štrausova medicinska biokemija. Čepelak I, Čvorišćec D, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 638-648.
18. Černe D, Lukač-Bajalo J. Oxidative stress assays for disease risk stratification. *Acta Pharm*, 2006, 56, 1-17.

19. Ćorušić A, Babić D. Rak vrata maternice. U: Ginekološka onkologija. Ćorušić A, Babić D, Šamija M, Šobat H, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2005, str. 149-159.
20. Daim MA, Zakhary NI, Aleya L, Bungau SG, Bohara RA, Siddiqi NJ. Aging, Metabolic, and Degenerative Disorders: Biomedical Value of Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018, 1-2.
21. Delimaris I, Faviou E, Antonakos G, Stathopoulou E, Zachari A, Dionyssiou-Asteriou A. Oxidized LDL serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer. *Clin Biochem*, 2007, 40, 1129-1134.
22. De Marco F. Oxidative Stress and HPV Carcinogenesis. *Viruses*, 2013, 5, 708-731.
23. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26, 202-226.
24. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64, 1019-1026.
25. Di Domenici F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M. Antioxidant in cervical cancer chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822, 737-747.
26. Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Zanić-Grubišić T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomed Chromatogr*, 2014, 29, 41-46.
27. Domitrović R, Štefan L, Tepšić T, Tota D, Urukalo M, Zavidović T. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis*, 2007, 43, 84-93.
28. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*, 2002, 82, 47-95.

29. Drury JA, Nycyk JA, Cooke RWI. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin Chim Acta*, 1997, 263, 177-185.
30. Esterbauer H, Shaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11, 81-128.
31. Gopalakrishnan VK, Starlin T. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn.- an in vitro study. *Asian J Pharma Clin Res*, 2013, 4, 68-71.
32. Held JM, Gibson BW. Regular control or oxidative damage? Proteomic approaches to interrogate the role of cysteine oxidation status in biological processes. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11, 1-14.
33. How antioxidants work?, 2017., <http://www.dayahsprinter.com/2017/05/jenis-jenis-antioksidan-dan-manfaat-pada.html>, pristupljeno 20.1 2019.
34. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*, 1994, 233, 380-385.
35. Kesavulu MA, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diab Res Clin Pract*, 2001, 53, 33-39.
36. Kim SY, Kim JW, Ko YS, Koo JE, Chung HY, Lee-Kim YC. Changes in lipid peroxidation and antioxidant trace elements in serum of women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Nutr Cancer*, 2003, 47, 126-130.
37. Kumar V, Abbas AK, Nelson F, Mitchel R. Robbins Basic Pathology. Chicago, Elsevier, 2007, str. 718.
38. Kurman RJ, Lora Hedrick EL, Ronnett BM. Blaustein's Patology of the Female Genital Tract. New York, Springer, 2011, str. 253.

39. Lipid peroxidation, 2018., <https://alchetron.com/Lipid-peroxidation>, pristupljeno 16.2.2019.
40. Looi ML, Mohd Dali AZ, Md Ali SA, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer Prev*, 2008, 17, 555-560.
41. March WJ, Thimmesch AR, Pierce JT, Pierce JD. Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung. *Nursing Res Pract*, 2011, 2011, 1-7.
42. Mallikarjunappa S, Prakash M. Urine protein thiols in chronic renal failure patients. *Indian J Nephrol*, 2007, 17, 7-9.
43. Manju V, Balasubramanian V, Nalini N. Oxidative stress and tumor markers in cervical cancer patients. *J Biochem Mol Biol Biophys*, 2002a, 6, 387-390.
44. Manju V, Kalaivani Sailaja J, Nalini N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. *Clin Biochem*, 2002b, 35, 621-625.
45. Marino SM, Gladyshev VN. A structure based approach for the detection of thiol oxidoreductases and their catalytic redox active cysteine residue. *PloS Comput Biol*, 2009, 383, 3-13.
46. Meo DS, Reed TT, Venditti P, Manuel VV. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016, 1-44.
47. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 2002, 359, 1085-1092.

48. Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N Engl J Med*, 2003, 348, 518-527.
49. Patel RP, Freeman BA, Jo H, McAndrew J, Sellak H, Usmar VMD, White R. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Bochim Byophys Acta*, 1999, 1441, 385-400.
50. Patterson RE, White E, Kristal AR. Vitamin supplements and cancer risk: the epidemiologic evidence. *Cancer Causes and Control*, 1997, 8, 786-802.
51. Pine SH. Slobodni radikali. U: *Organska kemija*. Runje V, Bešlić D, urednice, Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 910-940.
52. Poon HF. Free radicals and brain aging. *Clin Geriatr Med*, 2004, 20, 329-359.
53. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 1969, 195, 386-393.
54. Rumora L, Domjan AM, Žanić Grubišić T, Peraica M. Mycotoxin fumonosin B1 alters cellular redox balance and signaling pathways in rat liver and kidney. *Toxicology*, 2007, 242, 31-38.
55. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 2007, 370, 890-907.
56. Slattery ML, Robison LM, Schuman KI, French TK, Abbott TM, Overall JC Jr. Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer. *JAMA*, 1989, 261, 1593-1598.
57. Solomon D, Davey D, Kurman R. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting of cervical cytology. *JAMA*, 2002, 287, 2114-2119.
58. Stanley M. Immune response to human papillomavirus. *Vaccine*, 2006, 24, 16-22.

59. Stryer L. Put pentoza fosfata i glukoneogeneza. U: Biokemija. Runje V, urednik, Zagreb, Školska knjiga, 1991, str. 296-298.
60. Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, Lamerz R, Fritsche HA. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Liver, Bladder, Cervical and Gastric Cancer. *Clin Chem*, 2010, 56, 1-48.
61. Turkan I. ROS and RNS: key signalling molecules in plants. *J Exp Bot*, 2018, 69, 3313-3315.
62. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39, 50-75.
63. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006, 160, 1-40.
64. Viac J, Guerin-Reverchon I, Chardonnet Y, Bremond A. Langerhan's cells and epithelial modifications in cervical intraepithelial neoplasia: correlation with human papillomavirus infection. *Immunobiology*, 1990, 180, 328-338.
65. Vujić G, Ćorušić A. Zloćudni tumori vrata maternice. *Ginekološka onkologija*, 2004, 52, 110-115.
66. Xiong Y, Joachim DU, Uys JD, Townsend DM. S-Glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15, 233-270.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Oksidacijski stres ima važnu ulogu u patogenezi brojnih bolesti pa tako između ostalog i raku vrata maternice. Dvije su važne komponente koje vežemo uz oksidacijski stres prooksidanse i antioksidanse. Učinak prooksidansa na organizam očituje se narušavanjem strukture lipida, proteina i nukleinskih kiselina, dok je uloga antioksidansa vezanje slobodnih radikala i spriječavanje oksidacijskog stresa. Upravo narušavanje ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa doprinijet će oksidacijskom stresu i time razvitku bolesti.

Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) početni je stadij raka vrata maternice. Još je uvijek nepoznato da li će ona napredovati do malignog stadija ili će doći do regresije. HPV infekcija zajedno s drugim kofaktorima, uključujući povećani oksidacijski stres, pridonosi napredovanju invazivnog karcinoma.

Cilj ovog istraživanja je ispitati parametre oksidacijskog stresa, koncentraciju tiola, MDA i GSH u ispitanica s CIN-om.

Istraživanje je obuhvatilo 62 pacijentice kojima je dijagnosticiran CIN i 112 zdravih žena. Skupina pacijentica s CIN-om podijeljena je u dvije podskupine od 19 žena s skvamoznim intraepitelnim lezijama niskog stupnja (LSIL) i 42 žene s lezijama visokog stupnja (HSIL). Koncentracija tiolnih skupina i glutaciona određena je upotrebnom DTNB (5,5' – ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina) dok je koncentracija MDA određena tiobarbiturskim kiselinama u prisutnosti antioksidansa butiriliranog hidroksitoluena (BHT). Za statističku obradu podataka primijenjeni su programi SigmaStat inačica 3.5 te Medcalc inačica 17.9.2.

Koncentracija slobodnih tiola nije se razlikovala između kontrolne skupine i skupine pacijentica s CIN-om [(0.360 (0.332-0.379) u odnosu na 0.359 (0.312-0.406) mmol / L; P = 0.898)]. Koncentracija slobodnih tiola nije se razlikovala niti između kontrolne skupine, skupine pacijentica s HSIL promjenama i skupine pacijentica s LSIL promjenama. Koncentracija MDA bila je niža u skupini pacijentica s CIN-om nego u kontrolnoj skupini [0,76 (0,58-1,18) u odnosu na 0,40 (0.27-0.68) μ mol / L; P <0,001]. Kontrolne ispitanice imale su veću koncentraciju MDA u usporedbi s pacijenticama s HSIL promjenama [0.76 (0.58-1.18) u odnosu na 0.36 (0.24-0.52) μ mol / L, P <0.001]. Podskupina pacijentica s LSIL

promjenama imala je veće koncentracije MDA od podskupine s HSIL promjenama [0.68 (0.39-0.93) nasuprot 0.36 (0.24-0.52) $\mu\text{mol} / \text{L}$, $P < 0.001$]. Koncentracija GSH bila je viša [51,65 (34,43-134,49) u odnosu na 112,40 (67,12-132,72) $\mu\text{g} / \text{L}$; $P < 0,001$] u bolesnika s CIN-om nego u kontrolnoj skupini. Koncentracija GSH bila je niža kod kontrolne skupine ispitanica u usporedbi s podskupinom pacijentica s LSIL [51.65 (34.43-134.49) u odnosu na 119.96 (63.96-144.69) $\mu\text{g} / \text{L}$; $P < 0,001$], kao i s HSIL promjenama [51,65 (34,43-134,49) naspram 111,70 (68,82-126,52) $\mu\text{g} / \text{L}$; $P < 0,001$] u odnosu na LSIL promjene.

Univarijantni regresijski model koji je uključivao GSH ispravno je klasificirao 60,34 % ispitanica u skupinu s CIN-om, dok je model koji je uključivao MDA ispravno klasificirao 78,16 % ispitanica. Multivarijantni regresijski model koji uključuje oba parametra ispravno je klasificirao 70,69 % ispitanica te su se oba parametra pokazala kao potencijalni prediktori CIN-a.

Zaključno, naši rezultati ukazuju na mogućnost aktivacije obrambenog antioksidacijskog sustava u pacijentica s CIN-om te značaj primjene MDA i GSH kao prediktora CIN-a.

SUMMARY

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of many diseases including cervical cancer. There are two important components associated with the oxidative stress prooxidants and antioxidants. The effect of prooxidase on the organism is manifested by the destruction of lipids, proteins and nucleic acids, while the role of antioxidants is binding free radicals and preventing oxidative stress. Disturbing the balance between prooxidants and antioxidants in favor of the prooxidants will contribute to oxidative stress and thus the development of the disease.

Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is the initial stage of cervical cancer. It is still unknown whether it will progress to a malignant stage or regress. HPV infection with other cofactors, including increased oxidative stress, contributes to the development of invasive cancer.

The aim of this study is to examine the parameters of oxidative stress, concentration of thiol, MDA and GSH in women with CIN.

The study included 62 patients diagnosed with CIN and 112 healthy women. A group of patients with CIN was subdivided into two subgroups of 19 women with low squamous intraepithelial lesion (LSIL) and 42 women with high squamous intraepithelial lesion (HSIL). The concentration of thiol groups and glutathione was determined by the use of DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) while the concentration of MDA was determined by thiobarbituric acids in the presence of antioxidant butyrylated hydroxytoluene (BHT). SigmaStat version 3.5 and Medcalc version 17.9.2 were used for statistical data processing.

The concentration of free thiol was not different between the control group and patients with CIN [(0.360 (0.332-0.379) compared to 0.359 (0.312-0.406) mg / L; P = 0.898)]. The concentration of free thiol was not different neither between the control group, the group of patients with HSIL lesions and group of patients with LSIL lesions. Concentration of MDA was lower in the CIN than in the control group [0.76 (0.58-1.18) compared to 0.40 (0.27-0.68) $\mu\text{mol} / \text{L}$; P <0.001]. Control group had a higher MDA concentration compared to patients with HSIL lesion [0.76 (0.58-1.18) versus 0.36 (0.24-0.52) $\mu\text{mol} / \text{L}$, P <0.001]. Subsequently, the subgroup of patients with LSIL lesion had higher concentrations of MDA

than subgroup with HSIL lesion [0.68 (0.39-0.93) vs 0.36 (0.24-0.52) $\mu\text{mol} / \text{L}$, $P < 0.001$]. GSH concentration was higher [51.65 (34.43-134.49) compared to 112.40 (67.12-132.72) $\mu\text{g} / \text{L}$; $P < 0.001$] in patients with CIN than in the control group. The GSH concentration was lower in the control group compared to the subgroup of patients with LSIL [51.65 (34.43-134.49) compared to 119.96 (63.96-144.69) $\mu\text{g} / \text{L}$; $P < 0.001$] as well as in subgroup with HSIL lesion [51.65 (34.43-134.49) versus 111.70 (68.82-126.52) $\mu\text{g} / \text{L}$; $P < 0.001$] compared to LSIL.

By the univariate regression model that included GSH parameter, 60.34 % patients were correctly classified in the CIN group, while the model that included MDA correctly classified 78.16 % patients. Multivariate regression model that includes both parameters correctly classified 70.69 % patients and both parameters were shown as potential predictors of CIN.

In conclusion, our results indicate the possibility of activating the defensive antioxidant system in patients with CIN and the importance of using MDA and GSH as a CIN predictors.

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

AUC pripadajuća površina ispod krivulje (od engl. *area under the curve*)

CAT katalaza

CI interval pouzdanosti (od engl. *confidence interval*)

CIN cervikalna intraepitelna neoplazija (od engl. *cervical intraepithelial neoplasia*)

CIS karcinom *in situ*

GGT γ -glutamil transferaza

GPx glutationska peroksidaza

GSH reducirani glutation

GSSG oksidirani oblik glutationa

GST glutation S-transferaza

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (od engl. *high performance liquide chromatography*)

HPV humani papiloma virus

HSIL skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja (od engl. *high squamous intraepithelial lesion*)

LSIL skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja (od engl. *low squamous intraepithelial lesion*)

MDA malondialdehid

MPO mijeloperoksidaza

NOS NO sintaza

PAPA-test Papanicolau test

PHD patohistološka dijagnoza

RES reaktivni elektrofilni spojevi (od engl. *reactive electrophile species*)

RNS reaktivni dušikovi spojevi

ROS reaktivni kisikovi spojevi (od engl. *reactive oxygen species*)

SIL skvamozna intraepitelna lezija (od engl. *squamous intraepithelial lesion*)

SOD superoksid dismutaza

WHO Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. *World Health Organization*)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Parametri oksidacijskog stresa u premalignim promjenama vrata maternice

Kristina Eraković

SAŽETAK

Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) je premaligna promjena vrata maternice. Ona može napredovati u invazivni rak vrata maternice ili preći u regresiju. Smatra se kako njezinoj progresiji može doprinijeti oksidacijski stres. Oksidacijski stres nastaje kada dođe do poremećaja ravnoteže oksidansa i antioksidansa. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti koncentracije parametara oksidacijskog stresa tiola, malondialdehida (MDA), reduciranog glutationa (GSH) u ispitanica s CIN-om te u ispitanica podijeljenih u dvije podskupine s promjenama niskog (LSIL) i visokog rizika (HSIL). Tioli nisu pokazali razliku u koncentracijama u svim analiziranim skupinama. Međutim, koncentracija glutationa viša je kod pacijentica s CIN-om nego u kontrolnoj skupini, dok je koncentracija MDA niža. Dobiveni rezultati ukazuju na aktivaciju antioksidacijskog obrambenog sustava u pacijentica s CIN-om koji za posljedicu ima smanjenje lipidne peroksidacije. Još jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je određivanje dijagnostičke vrijednosti parametara oksidacijskog stresa u svrhu razlikovanja kontrolne skupine i skupine pacijentica s CIN-om. Ovdje su rezultati ukazali na mogućnost primjene MDA i GSH kao prediktora CIN-a.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 12 grafičkih prikaza, 3 tablica i 66 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: CIN, oksidacijski stres, parametri oksidacijskog stresa, MDA, GSH, tioli, LSIL CIN, HSIL CIN, prediktori CIN-a.

Mentor: **Doc. dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čapo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Doc. dr. sc. Petra Turčić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of medical biochemistry and
hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Parameters of oxidation stress in cervical premalignant lesions

Kristina Eraković

SUMMARY

Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is a premalignant cervical lesion. It can progress to invasive cervical cancer or regress. It is believed that its progression can contribute to oxidative stress. Oxidative stress occurs when there is a breakdown of balance between oxidants and antioxidants. The aim of this study was to determine the concentrations of the oxidation stress parameters thiol, malonaldehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) in the CIN patient group and in the patients divided into two subgroups of patients with low (LSIL) and high squamous intraepithelial lesion (HSIL). Thiols did not show a difference in the concentrations between all analyzed groups. However, the glutathione concentration is higher in patients with CIN than in the control group, while the MDA concentration is lower. The obtained results indicate the activation of the antioxidant defense system in patients with CIN, which results in a reduction of lipid peroxidation. Also one of the aims was to determine the diagnostic value of the parameters of oxidative stress to distinguish the control group and the group of patients with CIN. The results indicated the possibility of using MDA and GSH as CIN predictors.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 12 figures, 3 tables and 66 references. Original is in Croatian language.

Keywords: CIN, oxidative stress, parameters of oxidative stress, MDA, GSH, thiol, LSIL CIN, HSIL CIN, CIN predictors.

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Dubravka Vitali Čapo, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Petra Turčić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: May 2019.