

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

mr Ana U. Todorović

**EKSPRESIJA ANTIOKSIDATIVNIH
ENZIMA I TRANSKRIPCIONOG
FAKTORA Nrf2 KOD PACIJENTKINJA
SA BENIGNO, PREMALIGNO I MALIGNO
TRANSFORMISANIM
ENDOMETRIJUMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

mr Ana U. Todorović

**EXPRESSION OF ANTIOXIDANT
ENZYMES AND TRANSCRIPTION
FACTOR Nrf2 IN PATIENTS WITH
BENIGN, PREMALIGNANT AND
MALIGNANT ENDOMETRIAL
TRANSFORMATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Komisija za pregled i odbranu:

Mentori:

dr Snežana Pejić, naučni saradnik
Institut za nuklearne nauke "Vinča"

dr Siniša Đurašević, vanredni profesor
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Snežana B. Pajović, naučni savetnik
Institut za nuklearne nauke "Vinča";
redovni profesor
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

dr Zorica S. Saičić, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke "Vinča", pod neposrednim rukovodstvom dr Snežane Pejić.

Za pomoć u njenoj izradi želim da se zahvalim:

Mentoru, dr Snežani Pejić, na uvođenju u ovu aktuelnu oblast istraživanja, neposrednom rukovođenju, kao i nesebičnoj pomoći i podršci u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Mentoru, prof. dr Siniši Đuraševiću, na prihvatanju mentorstva, profesionalnoj i korektnoj saradnji, kao i na dragocenoj pomoći u finalnoj izradi ovog rada.

Prof. dr Snežani B. Pajović, na vremenu, trudu i pomoći u toku izrade ove doktorske disertacije, kao i na podršci i poverenju koje mi je ukazala tokom svih proteklih godina saradnje.

Dr Zorici S. Saičić na razumevanju i korisnim savetima, kritikama i sugestijama koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.

Za nesebičnu pomoć u eksperimentalnom delu ovog rada posebno zahvaljujem dr Snežani Pejić i dr Ljubici Gavrilović. Najtoplije zahvaljujem i svim ostalim kolegama iz Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, kao i svim kolegama iz Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ koji su mi na bilo koji način pomogli i pružili mi podršku u izradi ovog rada.

Hvala mojoj porodici i prijateljima što su bili uz mene tokom svih ovih godina.

Ana Todorović

Beograd, 2013.

Ekspresija antioksidativnih enzima i transkripcionog faktora Nrf2 kod pacijentkinja sa benigno, premaligno i maligno transformisanim endometrijumom

REZIME

Tokom čitavog životnog ciklusa aerobni organizmi su izloženi brojnim endogenim i egzogenim faktorima koji indukuju povećanje produkcije ROS-a. Prisutni u fiziološkim koncentracijama, reaktivni molekuli ROS-a imaju značajnu ulogu u važnim ćelijskim procesima kao što su regulacija signalnih kaskada i genske ekspresije. U visokim koncentracijama ROS mogu oksidovati ćelijske proteine, lipide i DNK i time dovesti do promena strukture i funkcije, oštećenja, pa i smrti ćelije. Kada koncentracija slobodnih radikala premaši fiziološki nivo, smatra se da se ćelija nalazi u stanju oksidativnog stresa. Kako bi sprečili nastanak i umanjili posledice ove vrste stresa, živi organizmi su razvili moćan antioksidativni sistem zaštite (AOS). Ovaj sistem uključuje seriju mehanizama kojima se nivo slobodnih radikala održava u uskom opsegu između fiziološke i toksične koncentracije. Najvažnije enzimske komponente AOS su: superoksid dismutaze (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx) i glutation reduktaza (GR). Ovi enzimi uklanjaju višak ROS-a i učestvuju u održavanju nivoa redukovanog glutationa, čime obezbeđuju očuvanje osnovnih životnih funkcija i sprečavaju nastanak oštećenja i bolesti ćelije. Zbog tako važne uloge AOS, regulacija funkcionalne ekspresije njegovih komponenti je naročito značajna za fiziološke i patološke procese u aerobnim organizmima. Jedan od najvažnijih regulatornih molekula u tom sistemu je Nrf2 (NF-E2 related factor 2). Nrf2 je transkripcioni faktor koji indukuje ekspresiju mnogih citoprotektivnih proteina uključujući i antioksidativne enzime, zbog čega ima značajnu ulogu u regulaciji oksidativnog stresa.

Savremena istraživanja na različitim model-sistemima ukazuju na povezanost oksidativnog stresa i kancerogeneze. Razvoj kancera je višestepeni proces koji se razvija kroz tri faze: inicijaciju, promociju i progresiju, a oksidativni stres je povezan sa svakim od ova tri stadijuma transformacije ćelije. Osim toga i sam antioksidativni profil je u ćelijama kancera izmenjen u odnosu na zdrave, normalne ćelije, pa ovi molekuli mogu biti i značajni biomarkeri u dijagnostici, proceni rizika i stepena kancerogeneze.

Kancer endometrijuma je jedno od tri najčešća oboljenja reproduktivnih organa žene. Pokazano je da benigne i premaligne promene na uterusu prethode samoj malignoj transformaciji tkiva, pa se ova stanja mogu smatrati fazama kancerogeneze. Uprkos brojnim istraživanjima, molekularni mehanizmi uključeni u višestepeni proces nastanka endometrijalnog kancera još uvek nisu potpuno razjašnjeni. Zato je cilj ove disertacije bio da se ispituju promene ekspresije četiri najvažnija antioksidativna enzima u krvi i tkivu pacijentkinja sa benignim, premaligim i malignim transformacijama endometrijuma, kao i mehanizam njihove regulacije transkripcionim faktorom Nrf2.

U istraživanju su korišćeni tkivo endometrijuma i venska krv pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex endometrii*, *hyperplasia complex endometrii* i *adenocarcinoma endometrii*. *Polypus endometrii* i *uterus myomatosus* su smatrani benignim, a *hyperplasia simplex* i *hyperplasia complex endometrii* premaligim transformacijama uterusa.

Nakon adekvatne pripreme, u uzorcima krvi i endometrijuma svih pet grupa pacijentkinja prvo je određivana koncentracija ukupnih proteina, a zatim urađena SDS PAGE elektroforeza, transfer na nitroceluloznu membranu i hemiluminiscentna detekcija proteinskih molekula za CuZnSOD, CAT, GPx, GR i Nrf2, kao i za aktin u odnosu na koga su količine ispitivanih proteina normalizovane. Osim toga, u uzorcima endometrijuma svih pet grupa pacijentkinja je izolovana RNK i nakon reverzne transkripcije RNK u cDNK, TaqMan Real-Time PCR metodom, u odnosu na POLR2 kao endogenu kontrolu, određene su količine mRNK za CuZnSOD, CAT, GPx, GR i Nrf2.

Rezultati ovih eksperimenata su pokazali sledeće:

1. U odnosu na ispitanice sa polipom i miomom, u endometrijumu pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks zabeleženo je smanjenje, a u tkivu adenokarcinoma povećanje nivoa Nrf2 proteina. Uočene promene regulisane su na nivou transkripcije, osim u tkivu adenokarcinoma u kome je porast nivoa Nrf2 proteina regulisan nekim posttranskripcionim mehanizmom.
2. Nivo CuZnSOD mRNK i količina CuZnSOD proteina u endometrijumu pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks značajno opadaju u odnosu na pacijentkinje sa polipom i miomom. U tkivu adenokarcinoma, međutim, vrednosti ovih parametara su značajno povećane u odnosu na obe benigne i obe premaligne

transformacije. Zabeležene promene CuZnSOD u različitim fazama transformacije su na nivou transkripcije i translacije određene promenama nivoa transkripcionog faktora Nrf2.

3. U odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom, nivo CAT mRNK i CAT proteina je značajno smanjen u tkivu pacijentkinja sa premalignim i malignim lezijama uterusa. Takođe je pokazano da Nrf2 ne utiče direktno na transkripciju gena za CAT, ali delujući na druge mehanizme uključene u translacione i posttranslacione procese u ekspresiji CAT verovatno može uticati na nivo ovog enzima u endometriju.

4. Tokom kancerogeneze, u premaligno transformisanom endometriju dolazi do povećanja, a u adenokarcinomu do smanjenja nivoa GPx proteina. Nivo GPx je pozitivno korelisan sa količinom transkripcionog faktora NRF2, a mehanizam regulacije ekspresije ovog enzima se menja sa stepenom transformacije tkiva.

5. U toku maligne transformacije endometrija zabeleženo je povećanje ekspresije glutation reduktaze. Porast GR proteina u toku kancerogeneze rezultat je ne samo intenzivirane transkripcije pod uticajem Nrf2, nego i postojanja dodatnog, posttranskripcionog mehanizma kojim se postiže povećanje nivoa GR proteina u transformisanim ćelijama uterusa.

6. Što se tiče ekspresije AOE u krvi ispitivanih pacijentkinja, uočeno je da u odnosu na kontrolnu grupu, kod ispitanica sa benignim promenama na uterusu (polip i miom) dolazi do smanjenja nivoa Nrf2 i GR, porasta nivoa GPx, dok relativne količine CuZnSOD i CAT proteina nisu značajno promenjene. Nešto izraženije promene su uočene u krvi pacijentkinja sa dijagnozama *hyperplasia simplex*, *hyperplasia complex* i *adenocarcinoma endometrii*, kod kojih je zabeležen pad nivoa Nrf2, CuZnSOD i GR proteina, porast nivoa GPx i nepromenjena ekspresija CAT. Takođe, pokazano je da je ekspresija sva četiri ispitivana AOE u krvi pozitivno korelisana sa nivoom transkripcionog faktora Nrf2.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na postojanje i značaj specifičnosti ekspresije antioksidativnih enzima i transkripcionog faktora Nrf2 kod ginekoloških pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex endometrii*, *hyperplasia complex endometrii* i *adenocarcinoma endometrii*.

Uočene promene potvrđuju važnu ulogu ispitivanih antioksidativnih enzima u kompleksnim molekulskim interakcijama koje se nalaze u osnovi transformacije ćelija endometrijuma. Očigledno je da ovi AO molekuli ne samo da utiču na nastanak lezija u tkivu uterusa, nego predstavljaju i važan faktor za progresiju benignih promena u premaligni i maligni fenotip.

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da rezultati ove doktorske disertacije značajno doprinose razumevanju molekulskih osnova kancerogeneze endometrijuma. Bolje poznavanje mehanizama maligne transformacije uterusa i primena ovih znanja u kliničkoj praksi mogli bi doprineti kvalitetu prevencije, dijagnostike i terapije ginekoloških oboljenja, čime bi se poboljšali tok i prognoza bolesti, a time povećala i stopa preživljavanja ovih pacijentkinja.

Ključne reči: superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza, Nrf2, kancer endometrijuma, polip, miom, hiperplazija, adenokarcinom

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biomedicina

UDK broj: [577.152.1:577.334]:618.14-006 (043.3)

Expression of antioxidant enzymes and transcription factor Nrf2 in patients with benign, premalignant and malignant endometrial transformation

ABSTRACT

During the life cycle aerobic organisms are exposed to a number of endogenous and exogenous sources of ROS. Present in low to moderate concentrations these reactive molecules play an important role in many physiological processes such as regulation of signaling cascades and gene expression. In high concentrations, ROS can oxidize cellular proteins, lipids and DNA, causing changes in structure and function, damage and even cell death. When the concentration of free radicals exceeds the physiological level, a cell is said to be in a state of oxidative stress. To prevent the onset and reduce the consequences of oxidative stress, living organisms have developed powerful antioxidant system (AOS). This system includes a set of mechanisms to maintain the level of free radicals in the narrow range between physiological and toxic concentrations. The most important enzyme components in AOS are: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). These enzymes are involved in the removal of ROS and participate in maintaining level of reduced glutathione, thus ensuring the preservation of physiological functions and inhibit the development of cell damage and disease. Because of such an important role of AOS, the regulation of the functional expression of its components is of particular importance for physiological and pathological processes in aerobic organisms. One of the most important regulatory molecules in this system is Nrf2 (NF-E2 related factor 2). Nrf2 is a transcription factor that induces expression of many cytoprotective proteins including antioxidant enzymes, and therefore play an important role in the regulation of oxidative stress.

Previous studies have clearly demonstrated a link between oxidative stress and carcinogenesis. Cancer is a multistage process that develops over three stages: initiation, promotion and progression and oxidative stress is associated with each of them. Moreover, antioxidant profile is altered in cancer cells compared with healthy, normal

tissue, so these molecules may be important biomarkers in the assessment of risk and the degree of carcinogenesis.

Endometrial cancer is one of the three most common diseases of female reproductive organs. It has been shown that benign and premalignant changes precede the malignant transformation of the uterus, which is why these conditions may be considered as stages of carcinogenesis. Despite numerous studies, the molecular processes involved in multi-stage development of endometrial cancer are not yet fully known. Therefore, the aim of this dissertation was to examine the changes in expression of the four most important antioxidant enzymes in the blood and tissues of patients with benign, premalignant and malignant endometrial transformations, as well as the mechanism of their regulation by transcription factor Nrf2.

In this research we used endometrial tissue and venous blood of patients diagnosed with: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex endometrii*, *hyperplasia complex endometrii* and *adenocarcinoma endometrii*. *Polypus endometrii* and *uterus myomatosus* were considered as benign, while *hyperplasia simplex* and *hyperplasia complex endometrii* were considered as premalignant transformation of the uterus.

After adequate sample preparation, we initially determined the total protein concentration in blood and endometrial tissue of all five groups of patients. Then we performed SDS PAGE electrophoresis, transfer to nitrocellulose membrane and chemiluminescent detection of CuZnSOD, CAT, GPx, GR and Nrf2 protein molecules. The protein levels were normalized with respect to β -actin.

Furthermore, in endometrial samples of all five groups of patients, RNA was extracted and underwent reverse transcription into cDNA, followed by the TaqMan Real-Time PCR method by which the amounts of CuZnSOD, CAT, GPx, GR and Nrf2 mRNA were determined in respect to POLR2 as endogenous control.

The results of these experiments showed the following:

1. In comparison to patients with polyps and myomas, in endometrium of women with hyperplasia simplex and hyperplasia complex decreased levels of Nrf2 were recorded, while in adenocarcinoma tissue Nrf2 protein level was increased. The observed changes were regulated at the transcriptional level, except in adenocarcinoma tissue in which increase in Nrf2 level was regulated by some post-transcriptional mechanism.

2. CuZnSOD mRNA level and the amount of CuZnSOD protein in the endometrium of patients with hyperplasia simplex and hyperplasia complex were decreased compared to patients with polyps and myomas. In adenocarcinoma tissue, however, the values of these parameters were significantly increased compared to both benign and both premalignant transformations. Observed transcriptional and translational CuZnSOD variability in different stages of endometrial transformation were the consequences of changes in the level of transcription factor Nrf2.

3. Compared to the control groups with polyps and myomas, levels of CAT mRNA and CAT protein were significantly decreased in the tissues of patients with premalignant and malignant lesions of the uterus. It is also shown that Nrf2 had no direct effect on the CAT gene transcription, but acting on other translational and posttranslational processes can probably influence the level of this enzyme in the endometrium.

4. During carcinogenesis, increase of GPx protein level was detected in premalignant endometrium, while decline in the the amount of this enzyme was measured in adenocarcinoma tissue. GPx level was positively correlated with the amount of transcription factor Nrf2, but mechanism that regulates the expression of this enzyme varied with the degree of tissue transformation.

5. In the course of malignant endometrial transformation, increased expression of glutathione reductase was observed. Consequent increased level of GR protein was the result not only of the intensified transcription under the influence of Nrf2, but also of an additional, posttranscriptional mechanism activated in transformed cells of the uterus.

6. As regards AOE expression in the blood of examined patients, it was observed that in comparison to the control group, in groups of women with benign endometrial changes a decline in Nrf2 and GR levels were measured, GPx level was increased, while the relative amounts of CuZnSOD and CAT protein did not change significantly. Somewhat more pronounced changes were observed in the blood of patients diagnosed with hyperplasia simplex, hyperplasia complex and adenocarcinoma, characterized by declined protein levels of Nrf2, CuZnSOD and GR, increased level of GPx and unaltered expression of CAT. It was also shown that the blood expression levels of all investigated AOE correlated positively with the amount of Nrf2.

The results of this dissertation indicate the existence and importance of the specific expression pattern of antioxidant enzymes and transcription factor Nrf2 in

gynecological patients diagnosed with: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex endometrii*, *hyperplasia complex endometrii* and *adenocarcinoma endometrii*. The observed changes confirm the important role of the examined enzymes in complex molecular interactions that underlie the transformation of endometrial cells. It is obvious that these AO molecules not only influence the development of lesions in the uterine tissue, but they are also an important factor for the progression of benign changes in premalignant and malignant phenotype.

It can be concluded that the results of this dissertation contribute significantly to a better understanding of the molecular processes involved in carcinogenesis. Implementation of this knowledge in clinical practice could contribute to the quality of prevention, diagnosis and treatment of gynecological patients, may lead to to improvement in the disease course and prognosis and, consequently, may result in increased survival rate of cancer patients.

Keywords: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, Nrf2, endometrial cancer, polyp, myoma, hyperplasia, adenocarcinoma

Scientific field: Biology

Special topic: Molecular Biomedicine

UDK number: [577.152.1:577.334]:618.14-006 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA I OKSIDATIVNI STRES	1
1.1.1. Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$).....	2
1.1.2. Vodonik peroksid (H_2O_2)	4
1.1.3. Hidroksil radikal ($\cdot OH$).....	7
1.1.4. Oksidativni stres i kancerogeneza	8
1.2. ANTIOKSIDATIVNI ENZIMI (AOE).....	10
1.2.1. Superoksid dismutaze (SOD).....	10
1.2.1.1. Bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD).....	11
1.2.1.2. Mangan superoksid dismutaza (MnSOD).....	14
1.2.1.3. Ekstracelularna superoksid dismutaza (EcSOD).....	16
1.2.2. Katalaza (CAT)	17
1.2.3. Glutation peroksidaza (GPx).....	19
1.2.4. Glutation reduktaza (GR).....	21
1.3. TRANSKRIPCIONI FAKTOR Nrf2	23
1.4. ULOGA AOE U NASTANKU I TERAPIJI KANCERA.....	25
1.5. KANCER UTERUSA (KANCER ENDOMETRIJUMA).....	27
1.5.1. Uterus	27
1.5.2. Patološke promene uterusa.....	28
1.5.2.1. Benigne promene uterusa.....	28
1.5.2.2. Hiperplazije	31
1.5.2.3 Maligne promene uterusa	33
1.5.2.3.1. Tipovi karcinoma endometrijuma	34
1.5.2.3.2. Karakteristike adenokarcinoma endometrijuma.....	35
1.5.2.4. Hiperplazije kao model sistem za proučavanje razvoja adenokarcinoma	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	38
3. MATERIJAL I METODE	40
3.1. OPŠTE NAPOMENE.....	40
3.2. SELEKCIJA PACIJENTKINJA I DEFINISANJE GRUPA UZORAKA.....	40
3.3. UZIMANJE UZORAKA.....	41
3.4. ANALIZA UZORAKA.....	41

3.4.1. SDS PAGE elektroforeza i Western blot	42
3.4.2. Određivanje ekspresije gena (RT-PCR)	45
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	50
4. REZULTATI	51
4.1. NIVO mRNK ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA I Nrf2 U ENDOMETRIJUMU	51
4.1.1. Nivo CuZnSOD mRNA u endometrijumu	51
4.1.2. Nivo CAT mRNA u endometrijumu	53
4.1.3. Nivo GPx mRNA u endometrijumu	54
4.1.4. Nivo GR mRNA u endometrijumu	56
4.1.5. Nivo Nrf2 mRNA u endometrijumu	58
4.2. NIVO ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA I Nrf2 U ENDOMETRIJUMU	60
4.2.1. Nivo CuZnSOD u endometrijumu	60
4.2.2. Nivo CAT u endometrijumu	61
4.2.3. Nivo GPx u endometrijumu	63
4.2.4. Nivo GR u endometrijumu	65
4.2.5. Nivo Nrf2 u endometrijumu	66
4.3. NIVO ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA I Nrf2 U KRVI	68
4.3.1. Nivo CuZnSOD u krvi	68
4.3.2. Nivo CAT u krvi	69
4.3.3. Nivo GPx u krvi	70
4.3.4. Nivo GR u krvi	72
4.3.5. Nivo Nrf2 u krvi	73
4.4. KORELACIJA TRANSKRIPCIONOG FAKTORA Nrf2 I AOE	75
4.4.1. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i CuZnSOD	75
4.4.2. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i CAT	76
4.4.3. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i GPx	77
4.4.4. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i GR	78
5. DISKUSIJA	79
6. ZAKLJUČCI	110
7. LITERATURA	116

PRILOZI

1. UVOD

1.1. REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA I OKSIDATIVNI STRES

Slobodni radikal je svaka hemijska vrsta koja u svojoj elektronskoj konfiguraciji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge 2007). Slobodni radikali mogu nastati od molekula – tako što raskidanjem hemijske veze svaki od dobijenih fragmenata zadržava po jedan elektron; od radikala - čijim „cepanjem“ nastaje drugi radikalski molekul; kao i u toku redoks reakcija (Asmus i Bonifacic 2000; Moad i Solomon 2005). Atomi i molekuli sa nesprenim elektronima imaju povećavanu hemijsku reaktivnost jer se ponasaju kao akceptori elektrona, sposobni da propagiraju lančanu reakciju u kojoj oduzimaju elektrone drugim atomima i molekulima i na taj način produkuju nove molekule slobodnih radikala (Cannio, Fiorentino i sar. 2000). Proces otpuštanja elektrona se naziva “oksidacija”, a slobodni radikali “oksidujućim agensima” jer mogu da indukuju otpuštanje elektrona. Slobodni radikali kod kojih se nespreni elektron nalazi u spoljnoj orbitali atoma kiseonika nazivaju se reaktivne vrste kiseonika (ROS). Grupu ROS-a osim slobodnih radikala kiseonika čine i jedinjena kiseonika koja nemaju nesparene elektrone, ali su veoma reaktivna (singlet kiseonik i vodonik peroksid npr.). Najzastupljeniji reaktivni metaboliti kiseonika su: $O_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} , H_2O_2 i HO^{\cdot} . Organski peroksidi, alkoksil- (RO^{\cdot}) i peroksil- (RO_2^{\cdot}) radikali, peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) i azot oksid ($^{\cdot}NO$) nastaju interakcijom ugljenikovih i azotnih radikala sa O_2 (Maher i Schubert 2000).

Tokom čitavog životnog ciklusa aerobni organizmi su izloženi brojnim endogenim i egzogenim faktorima koji indukuju povećanje produkcije ROS-a. Endogeno, slobodni radikali mogu nastati kao produkti aktivnosti ćelija (npr. neutrofila) ili enzima (NO-sintaze, ksantin-oksidaze). Oksidativni metabolizam u mitohondrijama i različite vrste bolesti i patoloških stanja (kao što su ishemija, infekcija, kancer) takođe se karakterišu povećanim nivoom ROS-a. U egzogene faktore koji mogu povećati produkciju reaktivnih vrsta kiseonika ubrajaju se: duvanski dim, alkohol, teški metali, različiti oksidanti u hrani i lekovima, ksenobiotici i toksini (Đorđević, Pavlović i sar. 2000; Kohen i Nyska 2002). Nakon što na različite načine dospeju u organizam, ove

egzogene supstance se razlažu ili metabolišu u slobodno radikalske čestice. Stres, povećan fizički napor, UV zračenje i ultrazvuk takođe predstavljaju egzogene faktore koji mogu indukovati povećanje koncentracije ROS-a.

Kada su prisutni u niskim i umerenim koncentracijama ROS imaju važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima kao što su: regulacija intraćelijskih signalnih kaskada i genske ekspresije (Griendling, Sorescu i sar. 2000), diferencijacija neurona (Suzukawa, Miura i sar. 2000), kontrola transkripcije (Meyer, Schreck i sar. 1993), regulacija ćelijskog ciklusa, apoptoza (Ghosh i Myers 1998; Deshmukh i Trivedi 2013), imuno reakcije (Yin, Yin i sar. 1995), starenje (Beckman i Ames 1998; Clancy i Birdsall 2013) i dr. Kada koncentracija slobodnih radikala premaši fiziološki nivo, smatra se da je ćelija u stanju oksidativnog stresa. Ovo stanje nastaje kao posledica disbalansa u brzini formiranja i neutralizacije ROS-a. Posledično, povećana količina slobodnih radikala može oksidovati ćelijske proteine, lipide i DNK i time dovesti do promena strukture i funkcije, oštećenja i smrti ćelije (Valko, Rhodes i sar. 2006; Panieri, Gogvadze i sar. 2013). Do sada je otkriveno preko 200 bolesti i patoloških stanja povezanih sa povećanom produkcijom slobodnih radikala kiseonika (Žikić, Štajn i sar. 2000; Kohen i Nyska 2002; Kanazir, Pajović i sar. 2004.; Štajn, Žikić i sar. 2007)

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

Superoksid anjon radikal je proizvod jednovalentne redukcije molekulskog kiseonika i produkuje se u skoro svim aerobnim ćelijama (Richmond, Halliwell i sar. 1981). U zavisnosti od pH vrednosti sredine, $O_2^{\cdot-}$ ($pK_a=4,8$) može postojati u dve forme. U fiziološkim uslovima, dominantna je šaržirana forma - superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), dok je na nižim pH vrednostima većina superoksida u protonizovanoj formi hidroperoksida (HO_2^{\cdot}) (Schafer i Buettner 2001).



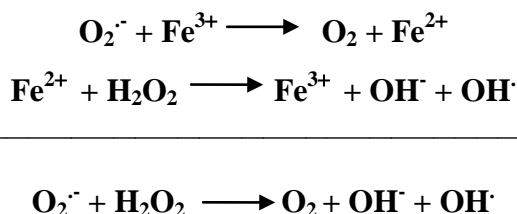
Superoksid anjon radikal se u ćeliji oslobađa u toku normalnih fizioloških procesa kao što su oksidativna respiracija u mitohondrijama, autooksidacione reakcije kateholamina, tetrahidrofolata i redukovanih flavina (Dawson i Dawson 1996). Ovaj radikal je i produkt aktivnosti ćelija imunog sistema: neutrofila, monocita, makrofaga i

mikroglije. Istraživanja su pokazala da se pri kontaktu sa stranim česticama ili imunim kompleksima više od 90% kiseonika utrošenog u procesu "respiratorne eksplozije" u fagocitima transformiše u O_2^- (Nauseef 1999; Đorđević, Pavlović i sar. 2000; Babior, Lambeth i sar. 2002).

Superoksid anjon je najviše i najčešće produkovana vrsta slobodnih radikala u živim organizmima, zbog čega se ovaj reaktivni metabolit kiseonika uglavnom nalazi na početku kaskade unutarćelijskog oksidativnog stresa (Cannio, Fiorentino i sar. 2000). U fiziološkim uslovima, O_2^- može delovati kao redukujući agens prevodeći npr. Fe^{3+} u Fe^{2+} . Takođe, O_2^- je i moćni nukleofil sposoban da "napada" pozitivno šaržirane centre, ali i da u svojstvu oksidujućeg agensa reaguje sa donorima H^+ kao što su askorbat i tokoferol (Kohen i Nyska 2002).

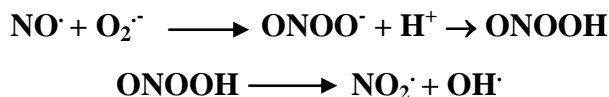
Difuzija intracelularno produkovanog O_2^- je zbog naelektrisane prirode ovog molekula sprečena membranama (Benzie 2000), a ekstracelularno oslobođeni molekul ima difuzioni limit oko 20 μm (Beckman 1994). Sintetisan unutar ćelijske membrane O_2^- je veoma toksičan. Kao nukleofilni redukujući agens on može delovati na karbonilne grupe estarskih veza između masnih kiselina i glicerola i time oštetiti fosfolipide membrane. Povećanje koncentracije O_2^- može dovesti i do oštećenja DNK (Touati i Farr 1990), lipidne peroksidacije (Nelson, Bose i sar. 1994) i inaktivacije enzima kao što su katalaza (Kono i Fridovich 1982), glutation-peroksidaza (Blum i Fridovich 1985), adenilat-ciklaza (Palmer 1987), glutamin-sintetaza (Schor 1988) i dr.

Toksičnost superoksid anjon radikala se ipak najvećim delom zasniva na njegovom učešću u gvoždem katalizovanoj Haber-Weissovoj reakciji. U ovoj višestepenoj reakciji O_2^- i H_2O_2 u prisustvu Fe^{3+} formiraju ekstremno reaktivni hidroksil radikal (Cannio, Fiorentino i sar. 2000):



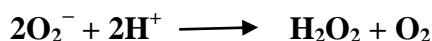
Osim u Haber-Weissovoj reakciji, O_2^- može doprineti formiranju OH^\cdot i interakcijom sa endogeno sintetisanim azot oksidom (NO^\cdot), pri čemu nastaje

peroksinitrit (ONOO^-) koji u prisustvu H^+ daje peroksiazotnu kiselina (ONOOH). Proizvodi dekompozicije ONOOH su azot dioksid radikal i OH^\cdot :



Reakcija formiranja peroksinitrita (ONOO^-) je ekstremno brza. Konstanta brzine ove reakcije od $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ je oko tri puta veća od konstante brzine disocijacije posredovane bakar-cink superoksid dismutazom (CuZnSOD), pa na taj način koncentracija NO^\cdot značajno utiče na koncentraciju i „sudbinu“ O_2^- . Značajno je i da formiranje ONOO^- ne zahteva prisustvo prelaznih metala, kao i da poluživot peroksinitrita iznosi oko 0.9s što mu omogućava da oksiduje lipide, proteine i dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) i na udaljenosti od nekoliko ćelijskih dijametara od mesta svoje sinteze (M Flint 1996).

Po hemijskim osobinama superoksid anjon radikal predstavlja slabu kiselinu, a zbog vrednosti redoks potencijala sistema O_2/O_2^- on je češće redukciono nego oksidaciono sredstvo. U vodenoj sredini O_2^- podleže reakciji dismutacije u kojoj učestvuju dva molekula superoksid anjon radikala, od kojih se jedan oksiduje a drugi redukuje, dajući kao proizvod reakcije vodonik peroksid (Nordberg i Arnér 2001).

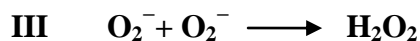
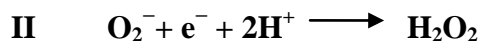
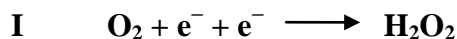


Ova reakcija se može odvijati spontano, ili uz katalitičko dejstvo superoksid dismutaze. Spontano teče veoma brzo u kiseloj sredini (pH 4,8), dok se u neutralnoj ili alkalnoj sredini odvija sporo, pa se može smatrati da se *in vivo* O_2^- uglavnom uklanja enzimski.

1.1.2. Vodonik peroksid (H_2O_2)

Vodonik peroksid (H_2O_2) je nastabilniji intermedijer redukcije kiseonika. Ne poseduje nesporeni elektron, pa u pravom smislu reči i nije slobodni radikal. Hemijski može nastati direktno dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika (I),

jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala (II), ili enzimskom dismutacijom pod dejstvom superoksid dismutaze (SOD) (III):



U aerobnim organizmima vodonik peroksid se stvara u plazma membrani, citosolu i različitim ćelijskim organelema uključujući mitohondrije, peroksizome, endoplazmatski retikulum, nukleus i skoro 100 različitih enzimskih sistema (Harman 1957; Thannickal i Fanburg 2000). Produkuje se i u toku autooksidacije askorbinske kiseline i kateholamina kao što su dopamin, norepinefrin i serotonin (Halliwell 1992). Pokazano je da se H_2O_2 sintetiše i u nukleusu epitelnih ćelija, što predstavlja redoks signal za promenu genske ekspresije (Grivaux, Grizot i sar. 1999; Li i Shah 2002).

Vodonik peroksid je hidrosolubiln molekul i lako difunduje kroz biološke membrane. Njegova fiziološka koncentracija u ćeliji iznosi oko 10^{-8} M (Forman i Boveris 1982), a relativno mala povećanja koncentracije ovog molekula mogu izazvati značajna oštećenja ćelije i njenih komponenti. Pokazano je da u koncentracijama od 20-50 μM H_2O_2 ima toksičan efekat na mnoge vrste ćelija (Halliwell, Clement i sar. 2000). Štetni efekti vodonik peroksida rezultat su kako direktne, tako i indirektno hemijske aktivnosti. Direktne efekti su posledica oksidacionih svojstava H_2O_2 i uključuju degradaciju hem proteina, oslobađanje gvožđa, inaktivaciju enzima, oksidaciju DNK, lipida, SH grupa i ketokiselina. U indirektnim putevima svog štetnog delovanja H_2O_2 je izvor mnogo toksičnijih vrsta kao što su OH^\cdot ili HClO^\cdot (Kohen i Nyska 2002). U Haber-Weissovoj reakciji H_2O_2 u prisustvu metala sa promenljivom valencom (gvožđe, bakar, mangan) reaguje sa superoksid anjon radikalom stvarajući visoko reaktivni hidroksil radikal. Ove reakcije se *in vivo* mogu sprečiti aktivnošću katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) koje razlažu vodonik peroksid, ali i aktivnošću SOD, koja uklanjajući O_2^- onemogućava Haber-Weissov reakciju (MatÉs, Pérez-Gómez i sar. 1999).

Vodonik peroksid, kao i ostali slobodni radikali, ne ispoljava samo štetne efekte na ćeliju. Njegovo prisustvo je neophodno za mnoge fiziološke procese kao što su:

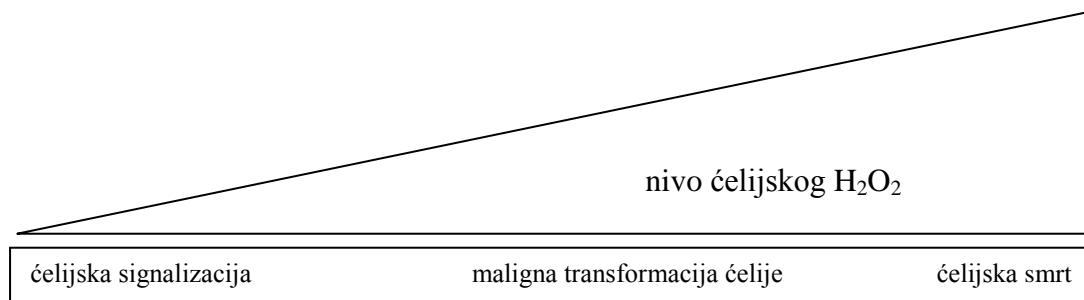
regulacija vaskularnog tonusa, ovulacija, sinteza tireoidnih hormona i stimulacija produkcije interferona (Miller, De Silva i sar. 2007; Ohye i Sugawara 2010; Eguchi, Fujiwara i sar. 2011; Shkolnik, Tadmor i sar. 2011). Zbog svojih hemijskih i fizičkih osobina (mali, difuzibilni molekul koji se u odgovoru na spoljne nadražaje može brzo sintetisati, modifikovati i uništiti) vodonik peroksid je u subtoksičnim koncentracijama idealan unutarćelijski, ali i međućelijski glasnik (Rhee 1999; Rhee, Bae i sar. 2000; Holmquist, Stuchbury i sar. 2007). Pokazano je takođe da ovaj molekul ima značajnu ulogu u procesu starenja (Giorgio, Trinei i sar. 2007).

U reproduktivnom sistemu H_2O_2 utiče na ciklične promene u ovarijumu tokom luteolize (Riley i Behrman 1991). Takođe, ispoljava značajnu antigonadotropnu aktivnost u lutealnim i granuloznim ćelijama i blokira kako bazalnu tako i stimulisanu produkciju progesterona (Behrman i Preston 1989; Margolin, Aten i sar. 1990). Poznato je da povećanje ćelijske koncentracije H_2O_2 ima za posledicu oštećenje DNK, mutacije i genetsku nestabilnost (Imlay i Linn 1988; Henle i Linn 1997; Hunt, Sim i sar. 1998; Park, You i sar. 2005). Eksperimentalni podaci pokazuju da vodonik peroksid može indukovati i ćelijsku proliferaciju (Roy H 1995; Polyarchou, Hatziapostolou i sar. 2005), rezistenciju na apoptozu (Brown, Miller Jr i sar. 1999; Del Bello, Paolicchi i sar. 1999), povećanu angiogenezu (Arbiser, Petros i sar. 2002; Qian, Luo i sar. 2003) kao i invaziju i metastaze kancera (Nelson, Ranganathan i sar. 2003; Nishikawa, Tamada i sar. 2004; Polyarchou, Hatziapostolou i sar. 2005). Iste studije su pokazale i da povećanje nivoa enzima koji uklanjaju H_2O_2 imaju upravo suprotan efekat na ove procese.

Generalno, stav o ključnoj ulozi H_2O_2 u kancerogenezi podržan je eksperimentalnim podacima koji pokazuju da:

- i) ćelije kancera najčešće imaju povećan nivo vodonik peroksida (Szatrowski i Nathan 1991; Roy H 1995; Lim, Sun i sar. 2005),
- ii) H_2O_2 može indukovati maligne transformacije (Okamoto, Kawai i sar. 1996; Okamoto, Reddy i sar. 1997; Arnold, Shi i sar. 2001) i
- iii) povećana ekspresija katalaze i glutation peroksidaze, enzima koji uklanjaju H_2O_2 , u ćelijama kancera može indukovati reverziju malignog fenotipa (Arnold, Shi i sar. 2001; Policastro, Molinari i sar. 2004).

Sa druge strane, brojni podaci pokazuju da porast koncentracije ćelijskog H_2O_2 može biti efikasan način za ubijanje ćelija kancera. Na shemi 1. je grafički prikazano kako povećanje nivoa vodonik peroksida može efikasno indukovati apoptozu (smrt) ćelije (Hirpara, Clément i sar. 2001; Ahmad, Iskiar i sar. 2004), ali i rezistenciju na apoptozu (malignu transformaciju ćelije) (Del Bello, Paolicchi i sar. 1999).



Shema 1. Mogući fiziološki efekti različitih intracelularnih koncentracija vodonik peroksida. Niske koncentracije H_2O_2 imaju značajnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji. Povećanje produkcije celularnog H_2O_2 povezano je sa procesom kancerogeneze, a visoki nivoi ovog molekula mogu indukovati ćelijsku smrt.

1.1.3. Hidroksil radikal ($\cdot OH$)

Kao što je već rečeno, toksičnost $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 se najvećim delom zasniva na njihovoj sposobnosti da u fiziološkim uslovima generišu hidroksil radikal ($\cdot OH$). Hidroksil radikal nastaje primanjem tri elektrona, tj. nepotpunom redukcijom molekuskog kiseonika. On je hemijski najreaktivniji radikal kiseonika i najodgovorniji je za njegove citotoksične efekte.

Hidroksil radikal ima izuzetno kratak poluživot (10^{-9} s) i sposoban je da interaguje sa svakim molekulom ili ćelijskom stukturom sa kojima, ograničen samo brzinom svoje difuzije, može da dođe u kontakt. Velikom brzinom reaguje sa većinom organskih i neorganskih molekula u ćeliji (Halliwell i Gutteridge 1999) pri čemu su moguća tri tipa reakcija:

1. reakcija oduzimanje vodonika,
2. reakcija adicije na aromatične strukture (npr. purinske i pirimidinske baze DNK) i
3. transfer elektrona.

Oduzimanjem vodonikovog atoma, tj. oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina u biomembranama inicira se proces lipidne peroksidacije koji se dalje može propagirati sekundarno stvorenim slobodnim radikalima.

Osim ekstremne reaktivnosti hidroksil radikala, važno je istaći i to da ne postoji nijedan specifični antioksidativni mehanizam koji uspešno uklanja već nastali $\cdot\text{OH}$, što ukazuje na značaj antioksidativnih strategija koje se zasnivaju na sprečavanju njegove produkcije. Ove strategije obuhvataju dismutaciju $\text{O}_2^{\cdot-}$, razlaganje H_2O_2 do vode, vezivanje jona gvožđa i bakra, kao i prevenciju formiranja i neutralizaciju već formiranih ROS- a (Benzie 2000).

1.1.4. Oksidativni stres i kancerogeneza

U uslovima hroničnog oksidativnog stresa, dugotrajna produkcija ROS-a može indukovati somatske mutacije i neoplastične transformacije ćelije (Fang, Seki i sar. 2009; Khandrika, Kumar i sar. 2009). Povezanost kancera sa produkcijom ROS pokazana je, između ostalih, na kanceru pluća (Azad, Rojanasakul i sar. 2008), pankreasa (Edderkaoui, Hong i sar. 2005), želuca (Oliveira, Kassab i sar. 2003), jetre (Calvisi, Ladu i sar. 2004), prostate (Khandrika, Kumar i sar. 2009), bešike (Miyajima, Nakashima i sar. 1997), dojke (Brown i Bicknell 2001) i jajnika (Chan, Liu i sar. 2008).

Kancer je višestepeni proces koji se razvija kroz tri stadijuma: inicijaciju, promociju i progresiju (Schulte-Hermann, Timmermann-Trosiener i sar. 1990; Ames i Gold 1992; Guyton i Kensler 1993) a oksidativni stres je povezan sa svakim od ova tri stadijuma ćelijske transformacije. U toku faze inicijacije slobodni radikali indukuju genske mutacije i strukturne promene DNK. U fazi promocije ROS blokiraju međućelijsku komunikaciju, modifikuju sisteme sekundarnih glasnika i doprinose abnormalnoj genskoj ekspresiji, što rezultuje povećanjem ćelijske proliferacije i/ili smanjenjem apoptoze u iniciranoj ćelijskoj populaciji. Konačno, oksidativni stres može da utiče na fazu progresije kancera indukujući dodatne izmene na DNK već transformisanih ćelija (Klaunig, Xu i sar. 1998).

Reaktivne vrste kiseonika mogu takođe povećati stopu ćelijske migracije i time uticati na invazivnost i metastaze tumora. Pokazano je da tokom transformacije u invazivni karcinom epitelne ćelije trpe značajne promene u morfologiji i adhezivnim

svojstvima, što rezultira gubljenjem normalne polarizacije i diferencijacije epitela i prelazak u pokretniji, invazivniji fenotip. Ovakva promena se javlja kao posledica smanjenog adhezivnog afiniteta tumorske ćelije za bazalnu laminu, ili, alternativno, zbog povećane aktivnosti proteina koji regulišu ćelijsku pokretljivost (Kundu, Zhang i sar. 1995; Roebuck 1999).

Direktni efekti visokih koncentracija ROS-a obuhvataju prekide lanaca DNK, tačkaste mutacije, neregularno DNK umrežavanje i mutacije proto-onkogeni i tumor-supresor gena, što može podstaći neoplastičnu transformaciju ćelije (Hussain, Hofseth i sar. 2003; Meira, Bugni i sar. 2008). Sa druge strane, niske ili kratkotrajno povećane koncentracije ROS mogu aktivirati ćelijsku proliferaciju, kao i NF- κ B, AP-1, ERK/MAPK i PI3K/Akt signalne puteve.

Veliki broj istraživanja ukazuje na to da ROS predstavljaju i vezu između hronične upale i kancerogeneze (Weitzman i Gordon 1990; Rosin, Saad El Din Zaki i sar. 1994; Schetter, Heegaard i sar. 2010). Pokazano je da je bitna karakteristika tumorskih promotera njihova sposobnost da podstaknu produkciju ROS-a u inflamatornim ćelijama (Shacter, Beecham i sar. 1988; Frenkel 1992). Promocija tumora u animalnim modelima, na primer, može biti inhibirana upotrebom agenasa kao što su antioksidanti i retinoidi koji inhibiraju "respiratornu eksploziju" u fagocitnim ćelijama (Frenkel 1992; Rosin, Saad El Din Zaki i sar. 1994).

U poređenju sa normalnim ćelijama, jedna od ključnih karakteristika ćelija kancera je njihova povećana sposobnost preživljavanja. Slobodni radikali se smatraju kancerogenim zbog sposobnosti da povećaju proliferaciju, opstanak i migraciju ćelija. ROS mogu izazvati oštećenje DNK i time stvoriti genetske lezije koje za posledicu imaju inicijaciju i progresiju tumora. Sa druge strane, povećana produkcija ROS dovodi do starenja i smrti ćelije, te se mogu smatrati i antikancerogenim agensima. Da li će ROS promovisati preživljavanje ćelija kancera, ili će delovati kao antikancerogeni agensi zavisi od vrste ćelija i tkiva, lokacije produkcije slobodnih radikala, koncentracije pojedinačnih vrsta ROS-a i aktivnosti antioksidativnog sistema (AOS).

1.2. ANTIOKSIDATIVNI ENZIMI (AOE)

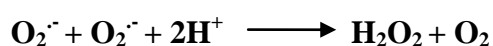
Kako bi sprečili nastanak oksidativnog stresa i održali nivo slobodnih radikala u uskom opsegu između fiziološke i toksične koncentracije, živi organizmi su razvili seriju mehanizama koji im omogućavaju očuvanje redoks homeostaze (Cadenas 1997). Ovi mehanizmi obuhvataju: (i) mehanizme prevencije, (ii) mehanizme reparacije oksidativnih oštećenja (iii) fizičku odbranu i (iv) enzimsku zaštitu od štetnih efekata slobodnih radikala. Prema Halliwellu (Halliwell i Gutteridge 2007) glavni kriterijum po kome neko jedinjenje pripada antioksidativnom sistemu je sposobnost da, u malim koncentracijama u poređenju sa supstratom koji se oksiduje, značajno odloži ili spreči njegovu oksidaciju. Ovom definicijom obuhvaćeni su ne samo enzimi, nego i neenzimske komponente poput vitamina E, askorbata, β karotena, glutaciona, polifenola i metal-vezujućih proteina, npr. ferritina (Cannio, Fiorentino i sar. 2000).

U najvažnije enzime direktno uključene u neutralizaciju slobodnih radikala ubrajaju se: superoksid dismutaze, katalaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza. Ovi enzimi štite celularne strukture od štetnog delovanja ROS-a i time sprečavaju nastanak oštećenja i bolesti ćelije.

1.2.1. Superoksid dismutaze (SOD)

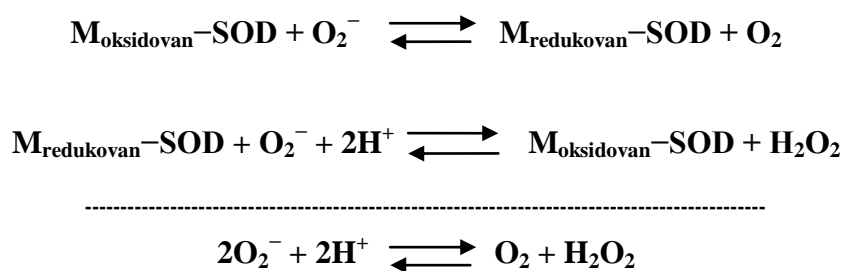
Superoksid dismutaze (SOD) (EC 1.15.1.1.) su široko rasprostranjene komponente antioksidativnog sistema, opisane od strane McCorda i Fridovicha kao proteini koji, kalizujući višak superoksid anjon radikala u vodonik peroksid, štite redoks senzitivnu ćelijsku mašineriju od oštećenja (McCord i Fridovich 1969).

Dismutacija se zasniva na činjenici da $O_2^{\cdot-}$ može biti i oksidant i reduktant, pa superoksid dismutaze koriste jedan molekul superoksid anjon radikala da bi oksidovali drugi $O_2^{\cdot-}$ molekul. Mehanizam delovanja SOD omogućen je redukcijom i reoksidacijom metala u aktivnom centru enzima. Reakcija je drugog reda a njena konstanta brzine iznosi oko $2 \times 10^9 M^{-1}/s^{-1}$ (Hassan 1989).



Superoksid dismutaze su u sisarskom organizmu jedini enzimi sposobni da prevode superoksid anjon radikal u vodonik peroksid. Do sada su u sisarskim ćelijama identifikovane i okarakterisane tri izoforme ovog enzima: bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD), mangan superoksid dismutaza (MnSOD) i ekstracelularna superoksid dismutaza (EcSOD) (Zelko, Mariani i sar. 2002). Gvožđe superoksid dismutaza (Fe SOD), četvrta izoforma superoksid dismutaze, prisutna je uglavnom u ćelijama prokariota.

Sve izoforme SOD se međusobno razlikuju po molekulskoj masi, vrsti prelaznog metala u aktivnom centru, lokalizaciji, mehanizmima regulacije i ulozi koju imaju u specifičnim fiziološkim i patološkim procesima. Zajednički za sve izoforme je princip reakcionog mehanizma u kome prelazni metal u aktivnom centru enzima (M) svojom redoks aktivnišću obezbeđuje katalitičko razlaganje superoksid anjon radikala. Reakcija se odvija po sledećoj shemi:



1.2.1.1. Bakar-cink superoksid dismutaza (CuZnSOD)

Bakar-cink superoksid dismutaza se eksprimira u svim eukariotskim ćelijama, a identifikovana je i u nekoliko bakterijskih vrsta. Ipak, prisustvo ovog enzima kod prokariota se pre smatra izuzetkom nego pravilom. Kod sisara i *S. cerevisiae* najveći deo CuZnSOD je lokalizovan u citosolu, a manji u međumembranskom prostoru mitohondrija (Lindenau, Noack i sar. 2000; Sturtz, Diekert i sar. 2001; Field, Furukawa i sar. 2003). Imunohemijskim metodama prisustvo CuZnSOD je detektovano i u nukleusu, lizozomima i peroksizomima (Chang, Slot i sar. 1988). Sisarska CuZnSOD je visoko ekspimirana u jetri i bubrezima (Asayama i Burr 1985) a i u motornim neuronima su detektovane znatne količine ovog enzima (Pardo, Xu i sar. 1995).

Hromozomska lokacija i karakteristike gena za CuZnSOD identifikovane su kod glodara, goveda i ljudi (Hsu, Visner i sar. 1992; Schmutz, Cornwall i sar. 1996). U humanom genomu, gen za CuZnSOD je lociran na 21q22 hromozomu (Levanon, Lieman-Hurwitz i sar. 1985). Sastoji se od pet egzona i četiri introna, a razlike u veličini intronskih sekvenci su povezane sa genskim polimorfizmom u različitim humanim tkivima i ćelijskim linijama.

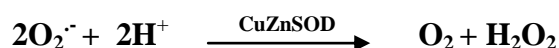
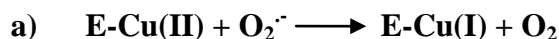
Sekvenca i struktura CuZnSOD su visoko konzervirane od prokariotskih do eukariotskih organizama (Bordo, Djinović i sar. 1994). Sintetisani protein je homodimer molekulske mase od 32 kD i sa konstantom disocijacije od $\sim 1.0 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ (Khare, Caplow i sar. 2004). Svaka subjedinica se sastoji od 151 aminokiseline organizovane u 8 antiparalelnih nizova β -sekundarne strukture koji povezani sa sedam zavojnica i petlji čine β -cilindar (Tainer, Getzoff i sar. 1982; Getzoff, Tainer i sar. 1990) Aktivni centar svake subjedinice sadrži po jedan atom cinka i bakra lokalizovane između petlji IV i VII, na dnu kanala aktivnog centra enzima. Sam kanal se sastoji od 21 aminokiselinskog ostatka i obezbeđuje optimalni elektrostatički potencijal za difuziju superoksid anjon supstrata do Cu^{2+} u aktivnom centru (Roberts, Fisher i sar. 1991).

Katalitički model dismutacije superoksida CuZnSOD-om predložen od strane Roberta i saradnika 1991. godine, zasniva se na brojnim biohemijskim podacima i ispitivanju kristalografskih struktura oksidovane, redukovane i inhibitor-vezane forme enzima. Proces dismutacije je omogućen cikličnom redukcijom i reoksidacijom bakra u aktivnom centru enzima i odvija se u nekoliko koraka:

a) molekul O_2^- se vezuje za Cu(II) u aktivnom centru oksidovane forme enzima, predaje mu jedan elektron i oslobađa se kao O_2 . Pri tome dolazi do redukcije Cu(II) do Cu(I) i protonacije N atoma imidazolnog prstena His 61, čime se histidinski most prekida na mestu Cu-N veze i enzim se nalazi u redukovanoj formi.

b) sledeći molekul O_2^- koji kroz kanal aktivnog mesta stigne do katalitičkog centra simultano prima jedan elektron od Cu(I), jedan proton od N atoma imidazolnog prstena His 61 i formira HO_2^- . Istovremeno, Cu(I) reoksiduje u Cu(II) a veza između Cu i His 61 se ponovo formira. Adicijom H^+ iz molekula vode, oslobođeni HO_2^- se protonuje do H_2O_2 . Ovim je jedan katalitički ciklus završen i enzim se ponovo nalazi u početnoj, oksidovanoj formi.

Opisani mehanizam dismutacije superoksid anjon radikala do O_2 i H_2O_2 može se shematski predstaviti na sledeći način:



Konstanta brzine ove reakcije je blizu difuzionog limita od $2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i nezavisna je od pH vrednosti u opsegu od 5 do 9.5 pH jedinica (Klug, Rabani i sar. 1972; Rotilio, Bray i sar. 1972). Pokazano je da prisustvo atoma bakra omogućava katalitičku funkciju, a Zn^{2+} enzimsku stabilnost CuZnSOD molekula (Borgstahl, Parge i sar. 1992; Fridovich 1995). Za katalitičku aktivnost ovog enzima bitna je i aktivnost bakar čaperona (CCS) koji omogućava ugradnju bakra u CuZnSOD apoenzim, a takođe se smatra specifičnim i senzitivnim biomarkerom dostupnosti Cu^{2+} jona (Harvey i McArdle 2008).

Osim što obezbeđuju katalitičku funkciju CuZnSOD, joni metala su od fundamentalnog značaja za pravilno uvijanje i stabilnost monomernih subjedinica, kao i za ostvarivanje hidrofobnih interakcija neophodnih za formiranje dimerne strukture enzima (Assfalg, Banci i sar. 2003). Zbog sposobnosti vezivanja Cu^{2+} , smatra se da je CuZnSOD protein sa bifunkcionalnom ulogom u antioksidativnoj zaštiti - osim što uklanja $O_2^{\cdot-}$, ovaj enzim funkcioniše i kao ćelijski pufer za jone bakra (Ciriolo, Battistoni i sar. 2001).

Za razliku od MnSOD "knock-out" miševa koji umiru u prvih 10 dana neonatalnog života, jedinke koje ne ekspimiraju CuZnSOD izgledaju zdravo i ne razlikuju se od svojih normalnih parnjaka, osim nakon traumatskih povreda. Studije su pokazale da je eliminacija funkcionalnog gena za CuZnSOD povezana sa neplodnošću ženki (Matzuk, Dionne i sar. 1998), hepatokancerogenezom (Elchuri, Oberley i sar. 2005), alkoholom izazvanim oštećenjem jetre (Kessova, Ho i sar. 2003) i skraćenjem životnog veka ovih životinja (Elchuri, Oberley i sar. 2005). Što se tiče veze između CuZnSOD i humanih bolesti, najbolje je proučena amiotrofična lateralna skleroza (ALS). Otkriveno je preko stotinu mutacija u humanom CuZnSOD genu koje mogu

dovesti do pojave neke od naslednjih formi ove bolesti (Valentine, Doucette i sar. 2005). Takođe je pokazano da mutacije u genu za CuZnSOD mogu promeniti afinitet enzima za različite supstrate (Bertini, Manganl i sar. 1998) i narušiti sposobnost enzima da vezuje cink (Hottinger, Fine i sar. 1997; Mera-Adasme, Mendizabal i sar. 2012).

Dobro je proučena i uloga CuZnSOD u dijabetesu. Zna se da je kod ljudi sa ovom bolešću nivo glikacije u eritrocitima povećan (Arai, Iizuka i sar. 1987). Kako glikacija može dovesti do fragmentacije ovog enzima (Ookawara, Kawamura i sar. 1992) gubljenje CuZnSOD aktivnosti može biti uzrok mnogih fizioloških problema dijabetičara (Haskins, Kench i sar. 2004).

Ekspresija CuZnSOD u fiziološkim i patološkim stanjima može biti modulirana na više načina. Slično MnSOD i CuZnSOD u promotorskoj sekvenci sadrži vezujuća mesta za transkripcione faktore kao što su: AP-1, AP-2, NF κ B, HSE (heat shock response element) i MRE (metal responsive elements) (Kim, Kim i sar. 1994). Ipak, citokini, oksidansi, hiperoksija, i citotoksični lekovi ne indukuju CuZnSOD u onoj meri u kojoj povećavaju ekspresiju MnSOD (Shull, Heintz i sar. 1991; Janssen, Marsh i sar. 1992; Janssen, Van Houten i sar. 1993; Lakari, Pääkkö i sar. 1998). Na nekim ćelijskim kulturama je pokazano da i nivo CuZnSOD mRNA može biti indukovana nekim tipovima stresa, radijacijom i ksenobioticima (Inoue, Ramasamy i sar. 1996; Isoherranen, Peltola i sar. 1997; Yoo, Chang i sar. 1999) što ukazuje na potencijalni uticaj ovog enzima na rast i rezistenciju ćelija kancera.

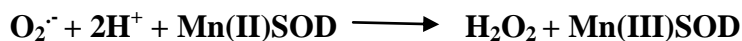
1.2.1.2. Mangan superoksid dismutaza (MnSOD)

Mangan superoksid dismutaza se eksprimira u skoro svim aerobnim organizmima, od bakterije do čoveka, a njeno prisustvo je zabeleženo čak i kod nekih anaeroba (Ravindranath i Fridovich 1975). Može se reći da količina MnSOD u ćeliji odgovara intenzitetu metaboličke aktivnosti tkiva, pa je najviši nivo ovog enzima zabeležen u srcu, mozgu, jetri i bubrezima (Beyer, Imlay i sar. 1991). Aktivnost ovog enzima u većini tkiva sisara iznosi 10-15% ukupne SOD aktivnosti (Tsan 2001). Kod prokariota MnSOD je lokalizovana u citoplazmi (Steinman, Weinstein i sar. 1994), a u eukariotskim ćelijama distribucija ovog enzima je isključivo mitohondrijalna (Weisiger i Fridovich 1973; Shimoda-Matsubayashi, Matsumine i sar. 1996).

Enzimski aktivna forma MnSOD je homotetramer čija svaka subjedinica ima molekulsku masu od 23 kDa (Barra, Schinina i sar. 1984). Jedinstvena genetska organizacija ovog enzima pokazuje veoma malo sličnosti sa CuZnSOD i EcSOD. Primarna struktura MnSOD gena je visoko konzervirana i pokazuje preko 90% homologije u cekvenci kodirajućih regiona (Marlhens, Nicole i sar. 1985).

Ekspresija MnSOD je regulisana brojnim transkripcionim faktorima koji imaju svoja vezivna mesta na promotoru gena koji kodira ovaj enzim. Najpoznatiji transkripcioni faktori MnSOD su AP-1, AP-2, SP-1 i NFκB (Wan, Devalaraja i sar. 1994; Yeh 1998), a poslednjih godina se sve više ispituje i značaj transkripcionog faktora Nrf2 (Lee, Kang i sar. 2011).

Na osnovu kinetičkih ispitivanja Mn SOD iz *T. Thermophilus*, Bull i saradnici (Bull, Niederhoffer i sar. 1991) su predložili bimolekulski mehanizam katalize, prema kome se reakcija dismutacije odvija u dva koraka. U prvom koraku dolazi do oksidacije O_2^- supstrata do molekulskog kiseonika. U drugom, reduktivnom koraku, sledeći molekul O_2^- biva konvertovan u H_2O_2 :



Konstante brzine za navedene reakcije oksidacije i redukcije su blizu difuzionog limita ($2.0 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$; $2.2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) zbog čega je Mn SOD jedan od najefikasnijih poznatih enzima (Bull, Niederhoffer i sar. 1991; Ludwig, Metzger i sar. 1991).

Od sve tri izoforme SOD, MnSOD je jedina neophodna za opstanak aerobnih organizama (Carlioz i Touati 1986). Fiziološka uloga ovog enzima potvrđena je ekstremno kratkim životom MnSOD-knockout miševa koji uginu ubrzo nakon rođenja sa izraženim neurodegenerativnim poremećajima i kardiopatijama (Lebovitz, Zhang i sar. 1996). Osim za opstanak u aerobnoj sredini, uloga MnSOD je potvrđena i u nastanku i razvoju velikog broja bolesti i patoloških stanja. Među njima su dijabetes tipa II (Nakanishi, Yamane i sar. 2008), hipertenzija (Hirooka 2008), poremećaji raspoloženja (Pae, Yoon i sar. 2006), Alchajmerova bolest (Thome, Gsell i sar. 1997;

Ventriglia, Bocchio Chiavetto i sar. 2005), hronične inflamacije (Wen, Dhiman i sar. 2008; Li i Zhou 2011) i starenje (Miyazawa, Ishii i sar. 2009).

1.2.1.3. Ekstracelularna superoksid dismutaza (EcSOD)

EcSOD je treća izoforma superoksid dismutaze. Ovaj metaloenzim u aktivnom centru takođe ima jedan atom bakra i jedan atom cinka (Marklund 1982), ali je, za razliku od CuZnSOD izoforme, lociran u međucelijskom prostoru tkiva, ekstracelularnim fluidima, i čini najveći deo SOD aktivnosti izmerene u plazmi, limfi i sinovijalnoj tečnosti (Marklund 1980).

Gen za EcSOD je kod ljudi lociran na 4q21 hromozomu i sastoji se od tri egzona i dva introna (Hendrickson, Fisher i sar. 1990). Nakon transkripcije i uklanjanja signalnog peptida zreli EcSOD protein je sastavljen iz tri domena: aminoterminalnog domena na kome se nalazi sekvenca za glikozilaciju, domena koji pokazuje izrazitu homologiju sa CuZnSOD i na kome se nalazi aktivno mesto i kratkog karboksi-terminalnog domena (Folz i Crapo 1994). Interesantno je da se humani EcSOD peptid može uvijati na dva načina, pri čemu se formiraju različite mreže disulfidnih veza i produkuju enzimski aktivne i neaktivne subjedinice (Petersen, Oury i sar. 2003; Petersen, Kristensen i sar. 2008). Ove razlike u posttranskripcionoj obradi mogu značajno uticati na proteolitičku obradu i nivo enzimske aktivnosti EcSOD molekula.

Po svojim fizičko-hemijskim osobinama EcSOD je sekretorni, homotetramerni glikoprotein molekulske mase 135 kDa sa visokim afinitetom za glikozaminoglikane kao što su heparin i heparinsulfat. Smatra se da tkivna EcSOD predstavlja 90-99% ukupne telesne EcSOD (Marklund 1984), a najviša ekspresija ovog enzima detektovana je u krvnim sudovima, plućima, uterusu i tiroidnoj žlezdi (Marklund 1984). Ekspresija EcSOD u sisarskim tkivima regulisana je aktivnošću citokina (Strålin i Marklund 2000), nekih hormona (Mruk, Cheng i sar. 1998), nivoom cikličnog adenzin monofasfata (cAMP) (Adachi, Yamada i sar. 1999) i različitim oksidujućim agensima (Stralin i Marklund 1994). Aktivnost ovog enzima može značajno varirati i u zavisnosti od količine ishranom unetog cinka (Olin, Golub i sar. 1995).

Nivo EcSOD i njene katalitičke aktivnosti povezan je sa mnogim patofiziološkim procesima uključujući inflamaciju (Ghio, Suliman i sar. 2002),

aterosklerozu (Fukai, Galis i sar. 1998), hipertenziju (Fukai, Siegfried i sar. 1999), dijabetes (Adachi, Ohta i sar. 1991), infarkt miokardijuma (Hatori, Sjoquist i sar. 1992), reumatoidni artritis (Shingu, Todoroki i sar. 1987), kao i različite neurološke poremećaje (Delanty i Dichter 1998) i memorijske funkcije (Levin, Brucato i sar. 2000).

1.2.2. Katalaza (CAT)

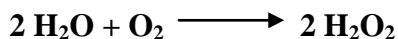
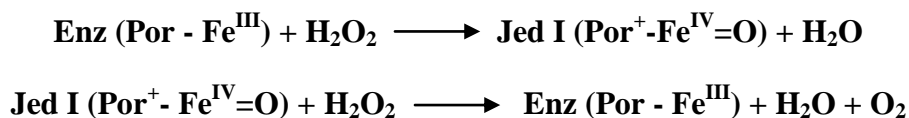
Katalazu (CAT) (EC 1.11.1.6), enzim koji razlaže vodonik peroksid u vodu i kiseonik otkrio je i prema njenoj katalitičkoj aktivnosti imenovao Oscar Loew 1900 godine (Loew 1900). Ovaj enzim je prisutan u gotovo svim eukariotskim ćelijama (Barth 1984). Sisari, uključujući ljude, eksprimiraju katalazu u svim tkivima. Visoke koncentracije ovog enzima nađene su u jetri, bubrezim i eritrocitima (Deisseroth i Dounce 1970). Nedostatak CAT je detektovan kod ljudi i nekih životinjskih vrsta, a u zavisnosti od stepena deficinijencije može se podeliti u dve grupe: akatalasemije (ispoljava se manje od 10% normalne katalazne aktivnosti) i hipokatalasemija (ispoljava se oko 50% normalne katalazne aktivnosti) (Góth i Eaton 2000). Naučnici su pre nekoliko godina uspjeli da uzgaje miševe koji ne eksprimiraju katalazu ("null" mutacije). Pokazano je da su ove životinje zdrave do 1 godine starosti i da njihova plodnost nije promjenjena u odnosu na normalne životinje. Hematološki profil ovih životinja je takođe normalan, kao i stepen osetljivosti njihovih pluća na hiperoksiju. Mitohondrije u njihovom mozgu, međutim, pokazuju promene u oksidativnoj fosforilaciji nakon traume (Ho, Xiong i sar. 2004). Schriener i saradnici su ispitivali miševe sa suprotnim poremećajem - povećanom ekspresijom katalaze. Ovi autori su pokazali da je životni vek tih životinja povećan za 20%, da se kod njih detektuje smanjenje mitohondrijskih delecija, srčanih patologija kao i odložen razvoj katarakte (Schriener, Linford i sar. 2005).

CAT je kodirana pojedinačnim, evolutivno visoko konzerviranim genom. Kod miševa, pacova i ljudi gen za CAT je dugačak oko 33 kb i izgrađen je od 13 egzona i 12 introna (Quan, Korneluk i sar. 1986; Nakashima, Yamamoto i sar. 1989; Reimer, Bailley i sar. 1994). Kao i drugi peroksisomalni enzimi, CAT se sintetiše na slobodnim polizomima i post-translaciono upućuje u peroksisome (Suresh 1996). U biološki aktivnoj formi ovaj enzim je izgrađen od četiri identične, tetraedarno aranžirane

subjednice, od kojih svaka u aktivnom centru sadrži feriprotoporfirinsku grupu i ima molekulsku masu od 60 kDa (Halliwell i Gutteridge 2007). Ekspresija CAT u sisarskim ćelijama regulisana je na nivou tkivno specifične transkripcije, post-transkripcije i post-translacije (Masters, Pegg i sar. 1986; Reimer, Bailley i sar. 1994).

U većini eukariotskih ćelija CAT je primarno lokalizovana u peroksizomima (Subramani 1993). Ove ćelijske organele predstavljaju centre nekoliko ključnih metaboličkih procesa kao što su: β -oksidacija masnih kiselina, sinteza holesterola, žučnih kiselina i plazmalogena a važne su i za metabolizam purina, poliamina, amino kiselina, glioksilata i reaktivnih vrsta kiseonika (Singh 1997). CAT je takođe detektovana u citosolu eritrocita (Chen, Liang i sar. 2004) u kojima ima ključnu ulogu u regulaciji koncentracije vodonik peroksida (Mueller, Riedel i sar. 1997). Pokazano je da kada je koncentracija njenog primarnog supstrata - H_2O_2 niska, katalaza može oksidovati i donore elektrona kao što su etanol i fenoli (Percy 1984).

Katalaznu aktivnost pokazuje veliki broj različitih proteina uključujući monofunkcionalne hem-katalaze, bifunkcionalne katalaze-peroksidaze i nehem-katalaze. Iako se radi o heterogenoj grupi proteina, mehanizam njihovog katalitičkog delovanja je principijelno isti i odvija se u dva koraka (Switala i Loewen 2002). U prvom koraku molekul vodonik peroksida oksiduje hem grupu aktivnog centra u oksiferil grupu, prevodeći na taj način slobodnu, aktivnu formu enzima u takozvano "jedinjenje I". U sledećem koraku, drugi molekul H_2O_2 deluje kao reduktant "jedinjenja I" vraćajući enzim u početno Fe(III) stanje i oslobađajući kao produkte reakcije vodu i molekulski kiseonik:



CAT karakteriše izuzetno velika brzina konverzije od $10^6/\text{s}$ (Nicholls, Fita i sar. 2000), a aktivnost ovog enzima je osetljiva na prisustvo brojnih jedinjenja koja mogu da

interaguju sa hem grupom u njenom aktivnom centru. U tu grupu jedinjenja spadaju cijanidi, azidi, hidroksilamin, aminotriazol i merkaptoetanol (Switala i Loewen 2002).

Što se tiče učešća katalaze u nastanke i razvoju bolesti, pokazano je da ovaj enzim ima važnu ulogu u molekulskim mehanizmima inflamacije (Jang, Paik i sar. 2005), mutageneze (DeRose i Claycamp 1991), apoptoze (Bechtel i Bauer 2009) i tumorogeneze (Finch, Tome i sar. 2006). Prema Kwei-u i saradnicima nivo CAT je značajno snižen u većini tumora, a njegova ekspresija opada sa progresijom bolesti (Kwei, Finch i sar. 2004).

1.2.3. Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza (GPx) (EC 1.11.1.9) je zajedničko ime za grupu enzima sa peroksidaznom aktivnošću, tj. sposobnošću redukcije vodonik peroksida i lipidnih hidroperoksida do vode i odgovarajućih alkohola. Od osam poznatih GPx četiri pripadaju selen-zavisnim izoformama (GPx1, GPx2, GPx3 i Gpx4) a drugih četiri (Gpx5, GPx6, GPx7 i GPx8) su selen-nezavisni enzimi. U humanom tkivu GPx6 izoforma u aktivnom centru ima selenocistein, dok je u aktivnom centru ovog enzima kod miševa i pacova cisteinski ostatak (Kryukov, Castellano i sar. 2003). Najvažnija fiziološka razlika između ove dve grupe glutacion peroksidaza je ta što selen-zavisne izoforme mogu da katalizuju redukciju i organskih i neorganskih supstrata, dok selen-nezavisne izoforme redukuju isključivo organske peroksidge (Chambers, Frampton i sar. 1986); (Perry, Jones i sar. 1992). Osim po supstratnoj specifičnosti, ove izoforme se razlikuju po ćelijskoj lokalizaciji i genu koji ih kodira.

Ćelijska GPx (GPx1, cGPx) je najzastupljenija izoforma GPx familije enzima. Poznata je već više decenija (Mills 1957) a njena tkivna distribucija je dobro proučena u mnogim vrstama. U uslovima adekvatne snabdevenosti selenom sve ćelije eksprimiraju određenu količinu GPx1. Naročito velike količine ovog enzima su nađene u tkivima sa visokom produkcijom peroksida kao što su eritrociti, jetra, bubrezi i pluća (Flohé 1987).

Gastrointestinalna GPx (GPx2, giGPx) se kod pacova eksprimira samo u epitelu gastrointestinalnog trakta (Chu i Esworthy 1995), ali je njeno prisustvo kod ljudi detektovano i u jetri (Chu, Doroshov i sar. 1993). Zbog ovako specifične tkivne

distribucije pretpostavlja se da ova izoforma predstavlja prvu liniju zaštite od lipidnih hidroperoksida unetih hranom.

Plazma (ekstraćelijska) GPx (GPx3, pGPx) je otkrivena u krvnoj plazmi, kada je i utvrđeno da se ovaj enzim razlikuje od GPx1 (Takahashi, Avissar i sar. 1987). Glavni izvor GPx3 u plazmi su bubrezi u čijim se ćelijama GPx3 sintetise i otpušta u krvotok (Yoshimura, Watanabe i sar. 1991).

Fosfolipid hidroperoksidna GPx (GPx4, PHGPx) se eksprimira u skoro svim sisarskim ćelijama, ali u znatno manjoj količini od GPx1. Njena osnovna uloga je sprečavanje lipidne peroksidacije biomembrana. Sposobnost GPx4 da redukuje hidroperokside u HDL (High Density Lipoprotein) i LDL (Low Density Lipoprotein) (Sattler, Maiorino i sar. 1994) ukazuje na značaj ovog enzima u aterogenezi.

Olfaktorna GPx (GPx6) detektovana je samo u epitelu olfaktornog sistema (Brigelius-Flohé 2006).

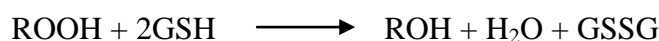
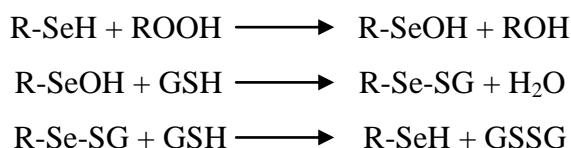
Sve izoforme glutacion peroksidaze redukuju vodonik peroksid i alkil hidroperokside oksidujući glutacion. Ipak, njihovi afiniteti prema hidroperoksidnim supstratima se međusobno značajno razlikuju. Tako GPx1 redukuje samo rastvorne hidroperokside poput H_2O_2 i nekih organskih hidroperoksida kao što su hidroperoksi masne kiseline ili t-butil hidroperoksid (Forstrom, Stults i sar. 1979). GPx4, a delimično i GPx3 mogu redukovati i hidroperokside nekih kompleksnijih lipida poput fosfatidilholin hidroperoksida (Ursini, Maiorino i sar. 1985; Yamamoto i Takahashi 1993). Pokazano je da GPx4 efikasno redukuje i timin (Bao, Jemth i sar. 1997), lipoproteine (Sattler, Maiorino i sar. 1994) i holesterol estre (Thomas, Maiorino i sar. 1990), ali je jedinstven po sposobnosti da redukuje membranske hidroperokside (Ursini i Bindoli 1987). Prema raspoloživim podacima supstratna specifičnost GPx2 je najbližnja specifičnosti GPx1 (Chu, Doroshov i sar. 1993) iako još nije sistematično ispitana.

Sve glutacion peroksidaze za redukciju hidroperoksida koriste glutacion kao tiol-supstrat. Pokazano je, međutim, da GPx3 kao redukujuće sredstvo može koristiti i tioredoksin (Björnstedt, Xue i sar. 1994).

Osim GPx4 koja je monomer od 19 kDa (Brigelius-Flohe, Aumann i sar. 1994) ostale izoforme GPx su homotetrameri, izgrađeni od četiri identične subjedinice molekulske mase od 19-25 kDa (Arthur 2000). Smatra se da su mala veličina i

hidrofobna površina GPx4 značajne za sposobnost ovog enzima da reaguje sa lipidima membrane. Svaka subjedinica u svom aktivnom mestu sadrži selenocistein (Cys^{Se}).

Katalitički ciklus glutation peroksidaze se odvija kroz tri glavna koraka. Vodonik peroksid (H₂O₂), ili neki drugi organski peroksid (ROOH), oksiduje selenol grupu (-SeH) selenocisteina (SeCys) u aktivnom centru GPx do selenenične kiseline (-SeOH) koja zatim postepeno biva redukovana sa dva molekula glutationa. Reakcija zahteva deprotonizaciju SeCys (-Se⁻) koja se na fiziološkom pH odvija lako jer je pK SeH niska (oko 5.2) u odnosu na pK cisteina (oko 8.2). Reakcija GPx sa H₂O₂ je ekstremno brza ($k'_A = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) što omogućava efikasno uklanjanje H₂O₂, naročito kada je koncentracija ovog molekula visoka. Pokazano je da je GPx1 efektivnija od katalaze u uklanjanju unutarćelijskih peroksida pod mnogim fiziološkim uslovima (Cohen i Hochstein 1963; Antunes, Han i sar. 2002).



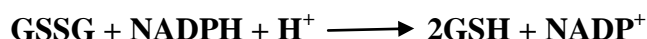
Značajna uloga GPx u patofiziološkim procesima pokazana je u viralnom miokarditisu (Beck, Esworthy i sar. 1998), neplodnosti muškaraca (Imai, Suzuki i sar. 2001), replikaciji virusa kod HIV infekcije (Human immunodeficiency virus) (Cohen, Boya i sar. 2004) i u kancerogenezi (Brigelius-Flohé i Kipp 2009). GPx "knockout" miševi izgledaju normalno, ali su osetljivi na oksidativni stress (Cheng, Ho i sar. 1998).

1.2.4. Glutation reduktaza (GR)

Glutation reduktaza (GR) (EC 1.8.1.7) pripada familiji NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) zavisnih oksidoreduktaza i prisutna je u mnogim prokariotskim i eukariotskim organizmima (Bauer, Fritz-Wolf i sar. 2006). Ovaj enzim katalizuje redukciju glutacion disulfida (GSSG) u sulfhidrilnu formu (GSH) istovremeno

oksidujući NADPH. GR je FAD (flavin adenin dinukleotid) vezujući homodimerni protein čija je svaka subjedinica izgrađena od četiri dobro definisana domena (Dym i Eisenberg 2001) i ima molekulska masu od oko 55 kDa. Uočeno je da u odsustvu tiola molekuli GR imaju tendenciju da formiraju tetramere i veće molekulske formacije. Iako su i ove velike forme katalitički aktivne, u fiziološkim uslovima prisustvo GSH izgleda održava enzim u dimernoj formi (Worthington i Rosemeyer 1975). Dimerna struktura enzima je kritična za njegovu funkciju jer obe subjedinice doprinose izgradnji aktivnog centra (Karplus i Schulz 1989).

Katalitički ciklus GR se odvija u dve faze koje se mogu nazvati „reduktivnom polureakcijom“ i „oksidativnom polureakcijom“. Za vreme reduktivne polureakcije, FAD, prostetična grupa glutation reduktaze se redukuje uz pomoć NADPH i redukcion ekvivalenti se transferuju do redoks-aktivnog disulfida. U oksidativnoj polureakciji rezultujući ditiol reaguje sa glutation disulfidom i finalni akceptor elektrona GSSG se redukuje u dva molekula GSH i nepromenjeno aktivno mesto GR.



GR pokazuje visoku supstratnu specifičnost. NADPH je jedini nukleotidni koenzim u ćeliji koji u fiziološkim uslovima može dati značajnu aktivnost ovog enzima, mada i NADH može funkcionisati kao donor elektrona. Kako je za optimalnu aktivnost GR neophodna i adekvatna dostupnost FAD, koenzima koji je derivat riboflavina (vitamina B2), nedostatak ovog vitamina može biti uzrok smanjene aktivnosti GR (Glatzle, Korner i sar. 1970).

Deficijencije GR su veoma retke, ali mutacije u genu za GR i nutritivni nedostatak riboflavina mogu uticati na normalnu aktivnost ovog enzima. Pokazano je da je Gly330 visoko konzerviran ostatak u superfamiliji NADPH-zavisnih disulfid reduktaza. Prva identifikovana mutacija u GR genu koja ima za posledicu kliničku deficijenciju je G330- A i ona utiče na termostabilnost enzima. Postoje i druge mutacije koje mogu dovesti do smanjene aktivnosti ovog enzima (Kamerbeek, Van Zwieten i sar. 2007).

Kako je primarna uloga GR da obezbedi optimalnu količinu glutationa (GSH) čija SH grupa ima redukujuća i nukleofilna svojstva (Deneke i Fanburg 1989; Sies

1999), promene u aktivnosti GR mogu izmeniti antioksidativni kapacitet ćelije i njenu sposobnost da eliminiše toksične supstance. Pokazano je da u fiziološkim uslovima odnos GSH/GSSG prelazi 100, dok u različitim modelima oksidativnog stresa ovaj odnos iznosi svega 1-10 (Lu 2001; Pastore, Federici i sar. 2003; Wu, Fang i sar. 2004). U slučaju da oksidativni stres ili neki drugi faktor (npr. deficijencija glukozo-6-fosfat dehidrogenaze koja smanjuje količinu dostupnog NADPH) inhibira aktivnost GR, dolazi do akumulacije GSSG (Deneke i Fanburg 1989). To za posledicu može imati promenu tiol redoks statusa i aktivaciju antioksidativnog odgovora ćelije (Lu 1998; Lu 2001; Filomeni, Aquilano i sar. 2005), ili sekreciju GSSG u vanćelijsku sredinu (Akerboom i Sies 1989; Griffith 1999).

Promene aktivnosti GR i nivoa GSH su povezane sa mnogim bolestima i patološkim stanjima kao što su: ateroskleroza (Schutte, Schutte i sar. 2009), hepatitis (Barbaro, Di Lorenzo i sar. 1996), cistična fibroza (Roum, Buhl i sar. 1993), HIV (Garaci, Palamara i sar. 1997), astma (Reynaert 2011), Parkinsonova bolest (Martin i Teismann 2009), Alchajmerova bolest i starenje (Liu, Wang i sar. 2004).

1.4. TRANSKRIPCIONI FAKTOR Nrf2

Nuklearni faktor Nrf2 (NF-E2 related factor 2) je transkripcioni faktor koji je u humanim ćelijama kodiran NFE2L2 genom (Baird i Dinkova-Kostova 2011). Brojna istraživanja su pokazala da Nrf2 indukuje ekspresiju mnogih citoprotektivnih proteina uključujući i antioksidativne enzime zbog čega može imati važnu ulogu u regulaciji oksidativnog stresa. Transkripcioni faktor Nrf2 pripada CNC (Cap 'n' Collar) familiji regulatornih proteina sa motivom leucinskog "rajfešlusa" (leucine-zipper family). U ovoj familiji se, osim Nrf2, nalaze još i Nrf1, Nrf3, Bach1 i Bach2 proteini (Motohashi, O'Connor i sar. 2002). Nuklearni faktor Nrf2 je prvi put kloniran i okarakterisan kao molekul sposoban da se vezuje za NF-E2/AP-1 ponavljajuću sekvencu u promotoru gena za β -globin (Baird i Dinkova-Kostova 2011). Sada se zna da je Nrf2 605 amino kiselina dug protein koji ima 6 visoko konzerviranih Neh1-6 domena (Moi, Chan i sar. 1994). Neh1 domen npr. omogućava interakciju sa ZIP domenom malih Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma) proteina i vezivanje sa DNK, a Neh2 posreduje u

vezivanju za citosolni repressor Keap1 (Kelch ECH Associating Protein 1) (Motohashi, O'Connor i sar. 2002).

Mehanizam kojim Nrf2 aktivira ekspresiju citoprotektivnih gena zavisi od redoks stanja u ćeliji i proteina citoskeleta Keap1. U bazalnim uslovima, Keap1 ima ulogu represora transkripcije. On je sposoban da se istovremeno veže za filamente aktina i molekule Nrf2 i na taj način spreči nukleanu translokaciju Nrf2. U ovom kompleksu Keap1 ne samo da “drži” Nrf2 u citoplazmi, nego i omogućava ubikitinizaciju, a posledično i proteozomalnu degradaciju ovog transkripcionog faktora (Motohashi, O'Connor i sar. 2002; Motohashi i Yamamoto 2004). Zbog intenzivne degradacije posredovane Keap1 proteinom, poluživot Nrf2 u bazalnim uslovima je svega 13-21 min (Hong, Sekhar i sar. 2005; Kobayashi i Yamamoto 2006).

Ranije se smatralo da u uslovima oksidativnog stresa dolazi do raskidanja veze između Keap1 i Nrf2 bilo indukcijom fosforilacije Nrf2, bilo direktnom modifikacijom cisteinskih ostataka na Keap1 (Wakabayashi, Dinkova-Kostova i sar. 2004). Novija istraživanja pokazuju da oksidativni stresori zapravo ne utiču na afinitet Nrf2 i Keap1 molekula (Egglar, Liu i sar. 2005; He, Chen i sar. 2006; Tong, Katoh i sar. 2006; Kobayashi, Li i sar. 2009), ali menjaju konformaciju Keap1 čime se smajuje njegova sposobnost da “izloži” Nrf2 molekul ubikitinizaciji i proteozomalnoj degradaciji. Na taj način se poluživot Nrf2 molekula u uslovima oksidativnog stresa može produžiti na 100-200 minuta (Hong, Sekhar i sar. 2005; Kobayashi, Kang i sar. 2006).

U svakom od pomenutih scenarija molekulskih događaja indukovanih oksidativnim stresom dolazi do stabilizacije Nrf2 i njegove translokacije u nukleus gde formira heterodimer sa malim Maf proteinom (Zhang, Lo i sar. 2004). Ovaj heterodimer se zatim vezuje za ARE (antioxidant response element) (Dinkova-Kostova, Holtzclaw i sar. 2002; Bellezza, Mierla i sar. 2010) u promotoru mnogih citoprotektivnih gena čime se pokreće mašinerija za njihovu transkripciju (Huang, Nguyen i sar. 2002; Furukawa i Xiong 2005). Ovako koordinisana regulacija ARE-kontrolisanih gena omogućava održavanje bazalnog nivoa citoprotektivnih enzima, ali i efikasnu adaptaciju ćelije na povećanu koncentraciju ROS, reaktivnih vrsta azota i brojnih elektrofilnih jedinjenja.

Fiziološki značaj Nrf2 pokazan je na “knockout” miševima koji razvijaju kompleksne patogene manifestacije uključujući multiorganske inflamatorne lezije, intravaskularnu depoziciju kompleksa imunoglobulina i preranu smrt zbog brzo

napredujućeg glomerularnog nefritisa (Ma, Battelli i sar. 2006). Novije studije su pokazale da ovaj transkripcijski faktor ima značajnu ulogu i u patogenezi mnogih bolesti kao što su autoimuna oboljenja (Johnson, Amirahmadi i sar. 2010), astma (Dworski, Han i sar. 2011), opstruktivne bolesti pluća (Malhotra, Thimmulappa i sar. 2009), bolesti jetre i gastrointestinalnog trakta (Aleksunes i Manautou 2007; Bae, Sung i sar. 2013), gastritis (Arisawa, Tahara i sar. 2007), kolitis (Arisawa, Tahara i sar. 2008), ateroskleroza (Barajas, Che i sar. 2011) i kancer (Martin-Montalvo, Villalba i sar. 2011; Slocum i Kensler 2011; Lee, Khor i sar. 2013).

1.3. ULOGA AOE U NASTANKU I TERAPIJI KANCERA

U predhodnim poglavljima ove disertacije je istaknuto da su dosadašnje biohemijske i imunološke studije dokazale postojanje veze između oksidativnog stresa i kancerogeneze, kako u humanim ćelijama tako i u eksperimentalnim animalnim modelima. Objašnjeno je da hronični i kumulativni oksidativni stres mogu dovesti do modifikacija makromolekulskih komponenti kao što su DNK, lipidi i proteini i tako rezultovati oštećenjima strukture i funkcije ćelije koja kao krajnji ishod mogu imati malignu transformaciju (Ziech, Franco i sar. 2010). Takođe, dobro je poznato da su biološki efekti AOE posledica ne samo njihove sposobnosti da uklanjajući slobodne radikale sprečavaju nastanak oksidativnog stresa, nego i da menjajući oksido-redukcionu ravnotežu modulišu različite puteve ćelijske signalizacije (MatÉs, Pérez-Gómez i sar. 1999). Na ovim osnovnim principima fiziološkog delovanja AOE se zasniva i njihova uloga u nastanku i promociji kancera. Naime, uklanjanjem slobodnih radikala i modulacijom signalnih puteva u ćeliji ovi enzimi mogu značajno uticati na regulaciju ćelijskog ciklusa, inflamaciju, proliferaciju, apoptozu, angiogenezu i invazivnost tumora. Osim toga, i sam antioksidativni profil je u ćelijama kancera izmenjen u odnosu na zdrave, normalne ćelije, pa ovi biomolekuli mogu biti i značajni biomarkeri postojanja ili stepena kancerogeneze (Pajović, Saičić i sar. 2006). Rezultati velikog broja dosadašnjih istraživanja su pokazali da su u tkivu kancera nivoi MnSOD, CAT i CuZnSOD manji nego u normalnom tkivu, a nivo GPx varira (Sun 1990; Kwei, Finch i sar. 2004; Brigelius-Flohé i Kipp 2009; Martin, Li i sar. 2010). Ipak, količina

pojedinih AOE može pokazivati i atipičan obrazac promene u zavisnosti od vrste tkiva i tipa kancera, kao što je pokazano na primeru MnSOD čiji je nivo značajno povećan u nekim tipovima malignih tumora (Izutani, Asano i sar. 1998; Kahlos, Anttila i sar. 1998).

Abnormalni nivoi i abnormalna regulacija antioksidativnih enzima predstavljaju jednu od osnovnih karakteristika tumorskih ćelija. Ovaj disbalans predstavlja i osnov za razvoj brojnih terapijskih pristupa koji se zasnivaju na razlikama u oksidoredukcionom statusu normalnih i maligno transformisanih ćelija. Mnoge studije su pokazale da dopunska terapija antioksidativnim preparatima kod pacijenata na hemoterapiji povećava osetljivost tumora i preživljavanje pacijenata, a smanjuje toksične efekte terapije. Ipak, posebno je važno oprezno koristiti antioksidativnu terapiju pacijenata sa kancerom, budući da njeni efekti zavise od stadijuma kancerogeneze u kome se ova terapija primenjuje (Dreher i Junod 1996; Valko, Izakovic i sar. 2004). Poznato je, na primer, da kako je apoptoza indukovana povećanim nivoom slobodnih radikala, indukcija i/ili administracija antioksidativnih molekula može smanjiti količinu ovih reaktivnih vrsta i time stimulisati preživljavanje oštećene ćelije, njenu proliferaciju i neoplastičnu transformaciju. Takođe, antioksidativna terapija u progresivnoj fazi kancera može da favorizuje preživljavanje tumorske ćelije i na taj način stimuliše rast tumora. Treba imati u vidu i da, u zavisnosti od koncentracije i sredine u kojoj se primenjuju, neki oksidanti mogu imati i pro-oksidativni efekat (Mortensen, Skibsted i sar. 2001; Valko, Izakovic i sar. 2004).

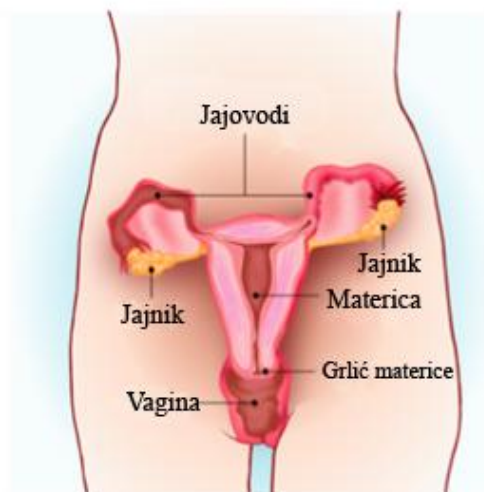
Svi navedeni podaci, osim na važnost AOE u nastanku i terapiji kancera, ukazuju i na neophodnost boljeg poznavanja molekulskih mehanizama delovanja ovih enzima u zdravim i patološki izmenjenim ćelijama. Poseban značaj u ovoj oblasti imaju rezultati koji doprinose razjašnjavanju uloge AOE i specifičnosti AO promena u kancerogenezi određenog tipa tkiva. Rezultati takvih istraživanja svakako bi mogli značajno doprineti prevenciji, dijagnostici i terapiji malignih oboljenja čime bi se poboljšali tok i prognoza bolesti i povećala stopa preživljavanja onkoloških pacijenata.

1.5. KANCER UTERUSA (KANCER ENDOMETRIJUMA)

1.5.1. Uterus

Materica (*uterus*) je šuplji, sluzokožno-mišićni reproduktivni organ žene (slika 1). Smeštena je u sredini male karlice, između mokraćne bešike i završnog dela debelog creva. Ima oblik naopako okrenute kruške - veći deo je okrenut na gore (telo materice – *corpus uteri*), a uži deo (vrat materice - *cervix uteri*) na dole. Ukupna dužina materice kod odrasle žene je 7 do 8 cm (telo je dužine oko 4.5, a vrat oko 3.5 cm). Težina materice iznosi 50 – 60 g, mada se njena veličina tokom trudnoće drastično povećava, tako da ona zauzima čitavu trbušnu šupljinu, sve do donjih rebara.

Biološki zadatak tela materice je da prihvati oplođenu jajnu ćeliju, omogućiti razvoj embriona i pri porođaju istisne fetus u spoljašnji svet. Vrat materice pre trudnoće onemogućava ulazak bakterija u matericu, u vreme ovulacije obezbeđuje transport sperme, a tokom trudnoće fizički sprečava ispadanje ploda u razvoju (Strauss Iii i Lessey 2009).



Slika 1. Građa ženskog reproduktivnog sistema

(modifikovano; dostupno na:
<http://exchange.smarttech.com/details.html?id=46b10f39-fa3a-4308-85e3-4c42efc36f85>).

Na poprečnom preseku materice zapažaju se tri sloja:

1. spoljašnji glatki sloj - perimetrijum – tanak sloj epitelnih ćelija koji okružuje matericu,
2. debeli srednji mišićni sloj – miometrijum – izgrađen od glatkih mišićnih ćelija, zapreminski čini najveći deo materice i
3. unutrašnji sloj sluznice - endometrijum

Endometrijum je naročito važan za menstrualni ciklus i reproduktivnu funkciju, jer se u njemu smešta oplodena jajna ćelija i embrion hrani za vreme njegovog materičnog života. Debljina endometrijuma iznosi 2 – 6 mm, zavisno od faze menstrualnog ciklusa. U toku trudnoće endometrijum zadebljava i postaje ispunjen krvnim sudovima, čime se obezbeđuju smeštaj i potpora razvoju fetusa. Ukoliko do začeća ne dođe, endometrijum se ljušti i odlazi kao deo menstrualnog krvarenja. Menstrualno krvarenje je zapravo ciklično krvarenje koje nastaje usled deskvamacije sekretorno transformisanog endometrijuma u intervalima od 28 ± 7 dana i traje prosečno 3 - 5 dana. Svako krvarenje koje ne ispunjava ove kriterijume je nenormalno uterusno krvarenje (NUK) (Petković 2004.). Kod žena u reproduktivnom periodu NUK podrazumeva svako odstupanje u ritmu i karakteru krvarenja (trajanje i intenzitet), kao i pojavu naknadnih cikličnih i acikličnih (organskih i disfunkcionalnih) krvarenja. Nenormalnim krvarenjem se smatra i svako krvarenje iz genitalnog trakta koje se javlja nakon jedne godine od menopauze. NUK je najčešći simptom koji pacijentkinje dovodi kod ginekologa. Uzroci krvarenja mogu biti različita stanja i promene genitalnih organa kao što su: difunkcionalno krvarenje (poremećaj menstrualnog ciklusa bez uočljivog organskog uzroka), poremećena funkcija jajnika, različite benigne (npr. endometrioza, polipi i miomi), prekancerogene (hiperplazije) i kancerogene (npr. adenokarcinom) promene na uterusu.

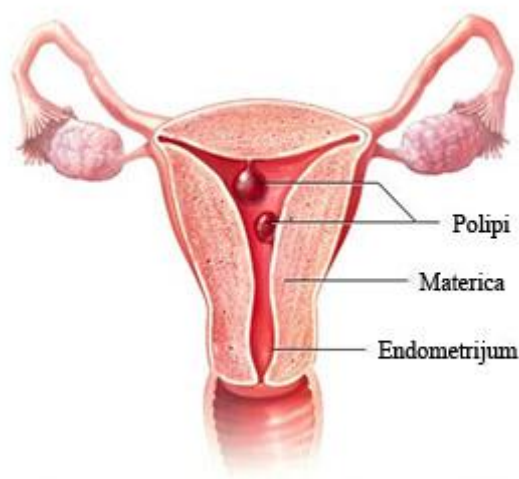
1.5.2. Patološke promene uterusa

1.5.2.1. Benigne promene uterusa

POLIP

Polip endometrijuma (PE) je benigna lokalizovana proliferacija žlezda i strome endometrijuma. Pokrivena je epitelom i projektuje se iznad ravni okolne sluzokože (slika 2).

Slika 2. Polip endometrijuma
(modifikovano; dostupno na:
http://www.riversideonline.com/health_reference/Womens-Health/DS00699.cfm?RenderForPrint=1).

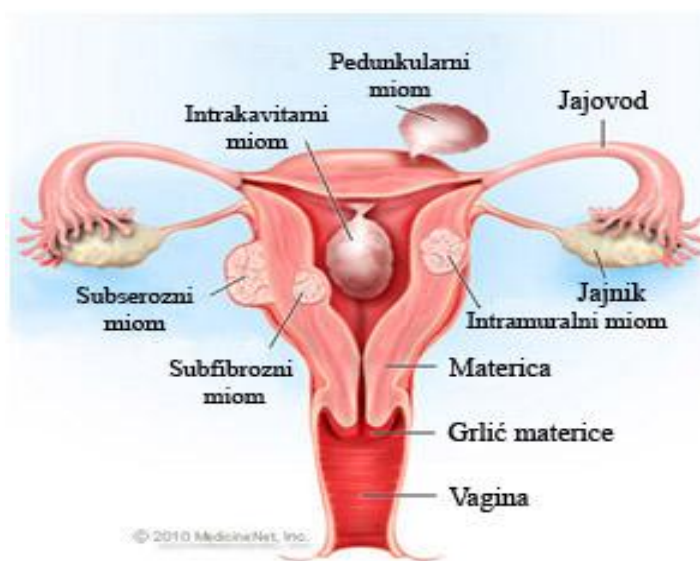


Polip nastaje usled fokalne proliferacije bazalnog sloja endometrijuma, a u osnovi PE obično se nalaze krvni sudovi zadebljanog zida (Kurman i Blaustein 2002). Većina PE se javlja u fundusu uterusa, a za endometrijum ih vezuje široka osnova (sesilni polip) ili peteljka različite dužine i debljine (pedunkulusni polip). Polipi su različite veličine od diskretnih izraštaja endometrijuma do velikih masa koje ispunjavaju čitavu duplju materice. PE su česti i obično se javljaju kod žena u perimenopauzi, a premenarhe su izuzetno retki (DeWaay, Syrop i sar. 2002; Goldstein, Montegudo i sar. 2002; Mazur i Kurman 2005). Procenjena zastupljenost PE u opštoj populaciji žena iznosi oko 24%, a kod 20% bolesnica polipi su multipli. Kod simptomatskih PE vodeći klinički simptom je patološko uterusno krvarenje (Petković 2004.). Smatra se da PE nastaje kao posledica estrogene stimulacije sluzokože materice i nejednake osetljivosti pojedinih delova endometrijuma na delovanje ovog hormona (Kurman i Blaustein 2002). Pod dejstvom steroidnih hormona estrogena i progesterona funkcionalni polipi pokazuju ciklične promene svojstvene normalnom endometrijumu. Atrofični polipi javljaju se kod žena u postmenopauzi i pretpostavlja se da nastaju kao rezultat regresije hiperplastičnih i funkcionalnih PE.

U polipu mogu da se razviju različiti tipovi hiperplazije i karcinoma endometrijuma (Thor 1996). Prema nekim kliničkim podacima, zastupljenost PE sa malignim tumorom je 0 – 13%, a 12 – 34% bolesnica sa karcinomom endometrijuma istovremeno ima i PE (Ben-Arie, Goldchmit i sar. 2004). S obzirom na to da polip odražava sklonost endometrijuma ka razvoju proliferativnih lezija, smatra se da bolesnice sa PE imaju povećan rizik od nastanka karcinoma endometrijuma.

MIOM

Miomi (*Myoma uteri*) (slika 3) su najučestaliji benigni tumori materice i uopšte, svih genitalnih organa žene (Wallach i Vlahos 2004). Oni predstavljaju dobroćudne izraštaje glatkih mišića uterusa. U zavisnosti da li u sastavu tumora preovlađuju glatke mišićne ćelije, ili fibrozno vezivno tkivo, zovu se i leiomiomi ili fibromiomi ("fibroidi").



Slika 3. Miomi materice (modifikovano; dostupno na: http://www.emedicinehealth.com/uterine_fibroids/article_em.htm).

Većina mioma ne daje nikakve simptome (Duhan i Sirohiwal 2010) i otkriva se slučajno, tokom rutinskog ginekološkog pregleda. Svega oko 20 - 50% pacijentkinja sa miomom ima simptome koji mogu predstavljati prve znake bolesti. Najčešći simptomi su: abnormalno krvarenje iz materice, osećaj bola, pritiska ili težine u dnu trbuha, učestalo mokrenje ili pak nemogućnost izmokravanja, a može se javiti i otežana defekacija kao posledica kompresije velikih i fiksiranih mioma u karlici koji prave pritisak na završni deo debelog creva ili rektum.

Miomi se javljaju kod 20 - 40% žena u reproduktivnom periodu. Ovaj procenat je realno možda i veći, na šta ukazuje studija na uzorcima histerektomije u kojoj su, bez obzira na indikacije za operaciju, miomi pronađeni u 77% slučajeva (Cramer i Patel 1990). Miomi se izuzetno retko javljaju pre puberteta, a posle klimakterijuma (menopauze) u oko 3 - 4 % slučajeva.

Etiologija mioma je, uprkos intenzivnom izučavanju, jos uvek nedovoljno poznata. U osnovi svi tumori, pa i miomi, nastaju kada se poremete kontrolni

mehanizmi koji regulišu rast i razvoj ćelije. Podaci o postojanju razlika u učestalosti pojave mioma između porodica potvrđuju značajnu ulogu naslednog faktora u njegovom nastanku. Takođe je pokazana veza hormonskog statusa i rasta ove vrsta tumora. Klinička ispitivanja potvrđuju da se miomi javljaju u generativnom ili reproduktivnom periodu života žene, kada je lučenje hormona najintenzivnije. Ovome ide u prilog i činjenica da se rast mioma povećava tokom trudnoće (Neiger, Sonek i sar. 2006), a posle menopauze dolazi do njihovog povlačenja. Stimulacija estrogenom, sistemska ili lokalna, takođe utiče na porast mioma.

Svi miomi su u početku lokalizovani u mišiću materičnog zida. Daljim rastom oni se utiskuju prema materičnoj duplji ("submukozni miomi") ili idu prema površini ("subserozni miomi"). Maligne alteracije mioma su jako retke i javljaju se kod manje od 0,5 % svih slučajeva (Parker, Fu i sar. 1994).

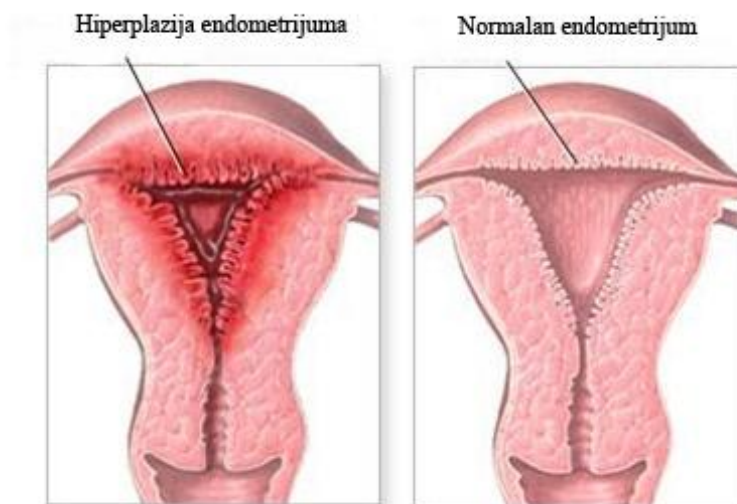
1.5.2.2. Hiperplazije (prekancerogene promene endometrijuma)

Hiperplazija endometrijuma je proliferativna promena endometrijuma tj. nepravilan rast sluznice materice, njeno zadebljanje i pojava atipičnih promena na ćelijama epitela, žlezdanim ćelijama, ili ćelijama strome (Horn, Lax i sar. 2001; Marsden i Hacker 2003). Hiperplazija se javlja kao posledica delovanja različitih faktora u čijoj osnovi stoji produženo delovanje estrogena bez pratećeg suprimirajućeg efekta progesterona. Produženo delovanje estrogena može bi rezultat terapije estrogenom, anovulatornih ciklusa, sindroma policističnih jajnika ili gojaznosti, a bez obzira na uzrok povećava šanse za razvoj endometrijalne hiperplazije i kancera (Anderson, Judd i sar. 2003; Lethaby, Suckling i sar. 2004).

Hiperplazija se u najvećem broju slučajeva dijagnostikuje u dobi oko menopauze, kada su anovulatorni ciklusi najčešći. U mlađoj populaciji ovo oboljenje se obično javlja uz policistične jajnike i menstrualne poremećaje. Osim toga, povećan rizik za pojavu hiperplazija imaju sve žene izložene povećanim koncentracijama estrogena, bez obzira na životno doba.

Makroskopski, izgled hiperplastičnog endometrijuma varira. Obično je difuzno zadebljan, često i više od 1 cm, nodularan, mekan (slika 4). Što se mikroskopskog izgleda tiče, kako se u osnovi svih hiperplazija nalazi proliferacija epitela žlezda,

poremećen odnos žlezda i strome u korist žlezda je zajednička karakteristika svih hiperplazija (Tavassoli, Devilee i sar. 2003; Mazur 2005). Pravilna identifikacija i klasifikacija hiperplazija je naročito važna jer se na osnovu postavljene dijagnoze pacijent upućuje na odgovarajuću kliničku terapiju (Kaufmann 2006) koja u zavisnosti od vrste hiperplazije može biti značajno različita.



Slika 4. Hiperplazija endometrijuma
(modifikovano; dostupno na: <http://www.fitsugar.com/Abnormal-menstrual-periods-1927350>).

Danas važeća klasifikacija deli hiperplazije na:

I) u odnosu na citološke karakteristike: hiperplazije bez atipija i one sa atipijama¹ i
 II) u odnosu na regularnost građe: i) jednostavnu hiperplaziju (*hyperplasia simplex*) kod koje se javlja povećan broj žlezda, ali je njihova građa normalna i ii) složenu hiperplaziju (*hyperplasia complex*) koju karakteriše nagomilavanje žlezda neregularne, izmenjene građe² (Kurman, Kaminski i sar. 1985; Baak, Wisse-Brekelmans i sar. 1992; Horn, Schnurrbusch i sar. 2004).

HYPERPLASIA SIMPLEX (ranije opisivana kao "cistična hiperplazija") se karakteriše povećanjem broja žlezda koje su obično proširene, ponekad cistično, i ne pokazuju

¹ *Atipija* predstavlja odstupanje izgleda ćelije od normalnog u smislu nejednakosti u obliku i veličini ne samo ćelija već i njihovih jedara, poremećaju sazrevanja i odnosa citoplazma/jedro.

² *Neregularna građa* se uočava kao promena kompleksnosti žlezda i količine strome koja odvaja žlezde, bez obzira na prisustvo ili odsustvo atipija.

znatnije promene u građi. Odnos žlezda i strome je lagano poremećen. Epitel žlezda je pseudostratificiran, ćelije izgledaju kao da su u uznapredovaloj fazi proliferacije. Razlikovanje od nepravilne proliferacije je vrlo često teško, a ponekad čak i nemoguće. HYPERPLASIA COMPLEX (ranije opisivana kao "adenomatozna hiperplazija"). Odlikuju je atipije u građi i/ili nagomilavanje žlezda (odnos žlezda/stroma veći od 2:1) (Mazur i Kurman 2005), stroma je oskudna, a žlezde često postavljene "leđa uz leđa". Žlezde su nepravilnog oblika, nazubljene, često izgledaju kao "prsti rukavice". Epitel je proliferativnog tipa kao i u hiperplaziji simpleks.

1.5.2.3. Maligne promene uterusa

U zavisnosti od vrste tkiva zahvaćenog malignom promenom, na uterusu razlikujemo nekoliko tipova kancera:

1. *Leiomyosarcomas* - kancer glatkih mišića. Ovo je redak oblik neoplastičnih promena koji se javlja kod svega 1% obolelih od kancera uterusa (Cramer i Patel 1990; Kurman i Blaustein 2002). Iako podaci o petogodišnjoj stopi preživljavanja dosta variraju, zna se da su ovi tumori klinički agresivni, imaju lošu prognozu i visok rizik rekurencije (Giuntoli, Metzinger i sar. 2003). Uprkos nekim istraživanjima (Lee, Tzeng i sar. 1994) koja ukazuju na mogućnost da leiomiosarkom, osim *de novo*, može nastati i iz benigne forme fibroma, ne postoji jasna evidencija o postojanju ovakve vrste transformacije kod ljudi. Smatra se da je, ako i postoji, incidenca transformacije fibroma u leiomiosarkom manja od 0.1% (Morton 2000; Robboy, Bentley i sar. 2000).

2. *Sarcoma* - razne forme kancera strome endometrijuma. Zastupljeni su sa oko 0.2% slučajeva svih malignih tumora uterusa. Javljaju se kod žena između 40 i 55 godina. Najčešći simptomi ove bolesti su abnormalno krvarenje, bol u karlici i dismenoreja, mada se dijagnostikuje i do 25% asimptomatskih slučajeva (Chang, Crabtree i sar. 1990). Sarkomi strome endometrijuma su indolentni (sporo progredirajući) tumori sa povoljnom prognozom (Dionigi, Oliva i sar. 2002). Međutim, zbog pojave kasnih recidiva, čak i kod osoba u I stadijumu bolesti, poželjno je dugotrajno praćenje pacijentkinja sa ovom dijagnozom. Recidivi se javljaju kod otprilike svakog trećeg pacijenta, najčešće u abdomenu, ređe u plućima i vagini (Agarwal, Gupta i sar. 2005).

3. *Adenocarcinomas* - kancer žlezdanog tkiva. Od svih kancera uterusa, 95% pripada ovom tipu, pa se i termin "kancer uterusa" najčešće odnosi upravo na adenokarcinom endometrijuma.

1.5.2.3.1. Tipovi karcinoma endometrijuma

Sve do 1980-ih, endometrijalni kancer je karakterisan kao jedan, jedinstveni tip oboljenja. Tek su zapažanja Lauchlan-a, Hendrickson-a i Bokhman-a (Lauchlan 1981; Hendrickson, Ross i sar. 1982; Bokhman 1983) ukazala na postojanje dva različita tipa kancera. Danas na osnovu razlika u epidemiologiji, prezentaciji i biološkom ponašanju, razlikujemo tip I i tip II karcinoma endometrijuma.

Tip I (estrogen zavisni ili endometrioidni tip) čini 80 - 90% ukupnog broja obolelih od karcinoma endometrijuma (Doll, Abal i sar. 2008). Javlja se kod mlađih perimenopauznih žena sa hiperlipidemijom, prekomernom telesnom masom, hiperestrogenemijom, anovulatornim krvarenjima, infertilitetom, kasnom menopauzom, hiperplazijom strome jajnika i hiperplazijom endometrijuma. Ovaj tip je najčešće dobro diferenciran, superficijalan, osetljiv na hormonsku terapiju i sa dobrom prognozom (Kurman i Blaustein 2002; Tavassoli i Devilee 2003). Histološki, ovi tumori mogu biti adenokarcinomi sa ili bez skvamoznih diferencijacija (Ryan, Susil i sar. 2005).

Tip II karcinoma endometrijuma (estrogen nezavisni ili neendometrioidni tip) se javlja kod starijih žena u postmenopauzi u odsustvu hiperestrogenemije i hiperplazije endometrijuma. Smatra se da progredira od atrofičnog endometrijuma (*atrophic endometrium*), preko prekursorских lezija EmGD (endometrial glandular dysplasia) (Lax, Kendall i sar. 2000; Kaaks, Lukanova i sar. 2002; Yi i Zheng 2008). Obično je slabo diferenciran, duboko invazivan, neosetljiv na hormonsku terapiju i sa lošijom prognozom.

U patohistološkom pogledu, tip I je endometrioidni adenokarcinom, dok je tip II serozni ili svetloćelijski adenokarcinom endometrijuma (Kurman i Blaustein 2002; Mazur i Kurman 2005). U kliničkoj praksi je poznat i **mešoviti tip** - karcinom u kome koegzistiraju obrasci tipa I i tipa II adenokarcinoma endometrijuma. Ako manje zastupljeni tip čini 10 ili više procenata ukupne zapremine tumora, takav karcinom se karakterise kao "mešoviti" (Silverberg i Kurman 1992). Patološki opis mešovitog

karcinoma treba da sadrži vrste tumora i njihove relativne proporcije, a od ovih parametara zavisi kako terapija, tako i prognoza bolesti. Ako karcinom tipa II čini više od 25% mešovitog tumora, prognoza bolesti je loša i tumor treba tretirati kao serozni karcinom (Sherman, Bitterman i sar. 1992).

1.5.2.3.2. Karakteristike adenokarcinoma endometrijuma

Ako nije preciznije definisan, termin “adenokarcinom” korišćen u ovoj disertaciji odnosi se na adenokarcinom tipa I, kao što je to najčešći slučaj i sa naučnom literaturom.

U razvijenim zemljama adenokarcinom endometrijuma je najčešća maligna neoplazma genitalnog sistema žena. Uglavnom se dijagnostikuje kod pacijentkinja starosne dobi između 50 i 60 godina (Creasman, Odicino i sar. 2001). Značajni faktori rizika ove bolesti su: gojaznost udružena sa hipertenzijom i/ili dijabetesom, rana menarha (prva menstruacija) i kasna menopauza, kao i dijagnostikovana kompleksna atipična hiperplazija endometrijuma (Brinton, Berman i sar. 1992; Courneya, Karvinen i sar. 2005; Crosbie, Zwahlen i sar. 2010). Uzimanje preparata estrogena u periodu premenopauze i menopauze i upotreba Tamoxifena (Nolvadexa) u okviru lečenja karcinoma dojke takođe povećavaju rizik od pojave adenokarcinoma (Grimes i Economy 1995; Ferguson, Soslow i sar. 2006; Allen, Tsilidis i sar. 2010). Ustanovljeno je i da žene koje nisu rađale češće obolevaju od ovog tipa karcinoma. Glavni simptomi ove vrste kancera su: perimenopauzno ili postmenopauzno vaginalno krvarenje, obilno menstrualno krvarenje, obilan vaginalni sekret, a u kasnijim stadijumima se mogu javiti i opstipacija i bol u maloj karlici.

1.5.2.4. Hiperplazije kao model sistem za proučavanje razvoja adenokarcinoma

Hiperplazije - proliferacije žlezda u većoj meri nego u proliferacijskoj fazi ciklusa, ali u manjoj meri nego u karcinomu, predmet su mnogih istraživanja i rasprava. Rizik od progresije netretirane hiperplazije u adenokarcinom se ispituje već 50 godina (Hertig i Sommers 1949; Te Linde, Jones i sar. 1953; Copenhaver 1959), ali je relativno

mali broj prospektivnih studija u kojima su, nakon biopsijom dijagnostikovane hiperplazije, pacijentkinje praćene bar nekoliko godina kako bi se utvrdio eventualni ishod bolesti. Donošenje jedinstvenog zaključka otežano je i izmenom terminologije, kao i činjenicom da su pacijentkinje često podvrgavane različitim vrstama nehirurške terapije, najčešće hormonalne ili radijacione, pre obavljanja hysteroktomije i uspostavljanja definitivne dijagnoze. Uprkos varijacijama u dijagnostičkim kriterijumima, terminologiji i uslovima praćenja, brojne studije su omogućile stvaranje konsenzusa da određeni tipovi endometrijalne hiperplazije, naročito oni sa citološkom atipijom, nose znatno veći rizik od progresije u odnosu na tipove hiperplazija bez atipija (Kurman, Kaminski i sar. 1985; Ferenczy i Gelfand 1989).

Biološko ponašanje hiperplazija, odnosno da li je hiperplazija i u kolikoj mjeri prekursor invazivnog karcinoma, teško je precizno odrediti. Rezultati nekih od studija koje se bave rizikom progresije različitih tipova endometrijalne hiperplazije u endometrijalni adenokarcinom (karcinom tipa I) prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Rizik od nastanka endometrijalnog adenokarcinoma kod različitih tipova hiperplazija. Za svaku od tri vrste hiperplazija dat je broj pozitivnih/ukupan broj ispitanih slučajeva, a u zagradi procentualne vrednosti učestalosti adenokarcinoma.

	Hiperplazija simpleks	Hiperplazija kompleks	Atipična hiperplazija
Kurman et al, 1985	1/93 (1.1%)	1/29 (3.4%)	10/35 (28.6%)
Baak et al, 1992	0/8 (0%)	1/6 (16.7%)	5/11 (45.4%)
Horn et al, 2004	–	8/390 (2.0%)	58/112 (51.8%)
Ukupno	1/101 (1.0%)	15/425 (3.5%)	73/158 (46.2%)

Novije epidemiološke studije ukazuju da višestepena kancerogeneza endometrijalnog kancera tipa I počinje kao hiperplazija simpleks, progredira u hiperplaziju kompleks i dalje se razvija u prekursorske lezije - endometrijalne intraepitelijalne neoplazije (Mutter, Zaino i sar. 2007; Epplein, Reed i sar. 2008; Lacey, Mutter i sar. 2008). Zbog toga su hiperplazije odličan i često korišćen model sistem za proučavanje pojedinih stadijuma i molekularnih mehanizama kancerogeneze. Najveći broj studija proučava povezanost kancerogeneze sa genetičkim, hormonskim i antioksidativnim parametrima. Ipak, uprkos brojnim istraživanjima, molekularni

dogadjaji uključeni u višestepeni proces nastanka endometrijalnog kancera još uvek nisu potpuno poznati. Zna se da je za inicijaciju i progresiju kancera potrebna serija genetskih aberacija (Todorovic-Rakovic 2011). Istraživanja su pokazala da se kod endometrijalnog kancera mikrosatelitska nestabilnost javlja u oko 25% sporadičnih slučajeva (Gurin, Federici i sar. 1999), a uočeno je i prisustvo mutacija i inaktivacija različitih onkogeni i tumor supresor gena kao što su: *c-erb-2*, *c-myc*, *PTEN* i *TP53* (Berchuck i Boyd 1995; Burton i Wells 1998). Ipak, sa izuzetkom *PTEN*-a u čijem genu su promene detektovane u oko 40% slučajeva, učestalost promena na ostalim genima je relativno niska, pa se ne može dovesti u direktnu vezu sa nastankom i progresijom adenokarcinoma.

Što se tiče uticaja hormona, brojna istraživanja pokazuju da je razvoj endometrijalne hiperplazije inicijalni rezultat produženog izlaganja estrogenima. U ovom stadijumu bolest je u većini slučajeva, ako se tretira odgovarajućom hormonskom terapijom, reverzibilna. Produžena stimulacija, međutim, može dovesti do nuklearnih atipija i progresije hiperplazije u invazivni karcinom (Kurman, Kaminski i sar. 1985; Grady, Gebretsadik i sar. 1995; Lethaby, Suckling i sar. 2004).

Uticaj pojedinačnih antioksidativnih enzima na višestepeni proces nastanka endometrijalnog kancera, kao i značaj regulacije ekspresije AOE transkripcionim faktorom Nrf2 biće detaljno razmatrani u diskusiji ove disertacije, u skladu sa dobijenim eksperimentalnim rezultatima. U svakom slučaju, osim direktnog delovanja na poremećaj redoks ravnoteže, promena antioksidativnog statusa ima značajan uticaj i na pomenute genetičke i hormonske mehanizme u procesu transformacije endometrijuma, što još jednom potvrđuje složenost i povezanost molekularnih događaja koji stoje u osnovi ovih ginekoloških oboljenja.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kancer uterusa predstavlja jedno od tri najčešća oboljenja reproduktivnih organa žene. Mehanizam njegovog nastanka je višestepeni proces. Smatra se da benigne i premaligne promene na uterusu prethode samoj malignoj transformaciji tkiva. Takođe je poznato da slobodni radikali i antioksidativni enzimi imaju značajnu ulogu u fiziološkim procesima reproduktivnih organa, ali i u patološkim mehanizmima i kancerogenezi ovog tkiva. Zbog svega toga, poznavanje mehanizama AO procesa u različitim tipovima transformisanog endometrijuma može da doprinese boljem razumevanju molekulskih osnova ovih bolesti i time pruži osnovu za dizajn novih strategija u njihovoj prevenciji, dijagnostici i kliničkom tretmanu.

Opšti ciljevi istraživanja

Pri definisanju opštih ciljeva ove doktorske disertacije pošlo se od dva osnovna principa na kojima se zasnivaju ostali teorijski i praktični aspekti ovog istraživanja. Prvi princip predstavlja potrebu da se uoče i izbegnu problemi i nedostaci u dosadašnjoj kliničkoj i eksperimentalnoj praksi, te da se, ukoliko je to moguće, doprinese njihovom rešenju. Navedeni problemi obuhvataju: nesistematičan pristup kojim se ispituju promene samo jednog antioksidativnog enzima i na osnovu toga izvode zaključci o ukupnom AO statusu ćelije i tkiva; ispitivanje promena enzima na samo jednom nivou (najčešće samo aktivnost ili količina proteina); neadekvatnost *in vitro* dobijenih rezultata (koji predstavljaju veliku većinu raspoloživih podataka) u *in vivo* procesima uključenim u kancerogenezu, kao i nedostatak uporednih analiza AO parametara u različitim stepenima transformacije tkiva.

Drugi princip u određivanju ciljeva ovog istraživanja predstavlja potrebu da dobijeni rezultati mogu biti potencijalno značajni za aktuelnu kliničku praksu, što je posebno važno s obzirom da standardna terapija kancera nije uspela da smanji stepen mortaliteta u poslednje tri decenije.

U skladu za iznetim principima, kao opšti cilj ove doktorke disertacije određeno je da se ispituju *in vivo* promene ekspresije (transkripcije i translacije) četiri najvažnija antioksidativna enzima u krvi i tkivu pacijentkinja sa benignim, premalignim i malignim

transformacijama endometrijuma, kao i mehanizam njihove regulacije transkripcionim faktorom Nrf2.

Neposredni ciljevi istraživanja

Da bi se postigao opšti cilj, za neposredne ciljeve istraživanja određeno je da se ispituju sledeći parametri:

- 1) nivo mRNK antioksidativnih enzima: CuZnSOD, CAT, GPx i GR u endometrijalnom tkivu pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex*, *hyperplasia complex* i *adenocarcinoma endometrii*,
- 2) relativna količina CuZnSOD, CAT, GPx i GR proteina u endometrijalnom tkivu pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex*, *hyperplasia complex* i *adenocarcinoma endometrii*,
- 3) nivo mRNK i relativna količina transkripcionog faktora Nrf2 u endometrijalnom tkivu pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex*, *hyperplasia complex* i *adenocarcinoma endometrii*,
- 4) relativna količina antioksidativnih enzima: CuZnSOD, CAT, GPx i GR, kao i Nrf2 proteina u krvi pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex*, *hyperplasia complex* i *adenocarcinoma endometrii* i
- 5) korelisanost ekspresije transkripcionog faktora Nrf2 sa ekspresijom ispitivanih antioksidativnih enzima: CuZnSOD, CAT, GPx i GR u tkivu i krvi pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex*, *hyperplasia complex* i *adenocarcinoma endometrii*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. OPŠTE NAPOMENE

Ova studija je urađena u saradnji sa Ginekološko-akušerskom klinikom u Banjaluci (Republika Srpska; Bosna i Hercegovina). Korišćeni materijal je uziman od pacijentkinja koje su dobrovoljno učestvovala u studiji, što je potvrđeno od strane Kliničkog centra Banjaluka.

3.2. SELEKCIJA PACIJENTKINJA I DEFINISANJE GRUPA UZORAKA

Pacijentkinje koje su učestvovala u ovom ispitivanju su na pregled dolazile zbog neregularnih krvarenja iz uterusa, ili na redovni ginekološki pregled. Ukupno je ispitano 88 pacijentkinja. Od tog broja, 30 pacijentkinja nije imalo nepravilno krvarenje iz uterusa, ali je pregledom utvrđeno postojanje benignih endometrijalnih promena i to 18 *polypus endometrioides* (PE) i 12 *uterus myomatosus* (UM). U delu ispitivanja na tkivu uterusa ove pacijentkinje sa benignim promenama činile su tzv. kontrolnu grupu pacijentkinjama sa premalignim i malignim promenama, jer bi uzimanje uzoraka endometrijuma zdravih osoba radi formiranja "apsolutne" kontrole bilo etički i medicinski neopravdano. Preostalih 58 pacijentkinja uključenih u studiju imalo je nepravilno krvarenje iz uterusa, a patohistološkom analizom potvrđeno je postojanje premaligno (*hyperplasia glandularis endometrii simplex* – SH (31) i *hyperplasia glandularis endometrii complex* – CH (22)) ili maligno (*adenocarcinoma endometrii* – ACE (5)) transformisanih ćelija endometrijuma.

U delu istraživanja na uzorcima krvi, grupe PE, UM, SH, CH i ACE odgovaraju istoimenim grupama tkiva endometrijuma. U cilju poređenja ispitivanih AO parametara u krvi pacijentkinja iz ovih grupa sa potpuno zdravim ispitanicama, uzeti su uzorci krvi 15 zdravih žena i ta grupa ispitanica je označena kao čista kontrola (K).

3.3. UZIMANJE UZORAKA

Sve pacijentkinje u ovoj studiji pregledane su najpre ultrazvučnim aparatom (Eccocee SSA-340, Toshiba Co., Tokyo, Japan) pri čemu je transvaginalnom sondom utvrđeno postojanje patoloških promena u maloj karlici. Nakon pregleda, tkivo endometrijuma je dobijeno eksplorativnom kiretažom pacijentkinja u skladu sa propisanim procedurama medicinske prakse. Uzorkovana tkiva su na Patološko-histološkom odeljenju Kliničkog centra Banjaluka histopatološki analizirana i u zavisnosti od dijagnoze svrstana u odgovarajuću eksperimentalnu grupu: polypus endometrii (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) ili adenocarcinoma (ACE). Venska krv je od pacijentkinja uzimana neposredno pre kiretaže i do pripreme lizata krvnih ćelija je čuvana na -70 °C.

3.4. ANALIZA UZORAKA

Priprema uzoraka i određivanje antioksidativnih parametara u krvi i endometrijumu pacijentkinja urađeni su u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u Beogradu. U svim uzorcima (grupe PE, UM, SH, CH i ACE u endometrijumu; grupe K, PE, UM, SH, CH i ACE u krvi) je analizirana ekspresija antioksidativnih enzima i transkripcionog faktora Nrf2. Ove analize obuhvatile su određivanje relativnih nivoa CuZnSOD, CAT, GPx i GR proteina u krvi i tkivu pacijentkinja, kao i određivanje relativnog nivoa mRNK za CuZnSOD, CAT, GPx i GR u tkivu endometrijuma pacijentkinja sa nekom od ispitivanih transformacija uterusa. U svim uzorcima endometrijuma merene su i relativne količine Nrf2, i to na nivou proteina i mRNK. U uzorcima krvi kontrolnih i ispitanica sa nekom od bolesti endometrijuma određivane su relativne količine Nrf2 proteina.

3.4.1. SDS PAGE elektroforeza i Western blot

3.4.1.1. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka krvi (lizata krvnih ćelija)

Puna krv je nakon uzorkovanja čuvana na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Da bi od pune krvi dobili lizat, uzorke smo posle otapanja vorteksovali i u svaki dodali dvostruko veću zapreminu destilovane vode ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uzorak je zatim ponovo vorteksovan 1 minut i nakon toga centrifugiran 10 minuta na 8600 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany) čime su ćelijske membrane oborene u talog, a supernatant (lizat) je odvajan i čuvan na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do Western Blot analize.

Priprema uzoraka endometrijuma

Tkivo endometrijuma je nakon uzorkovanja čuvano na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. U cilju pripreme uzoraka za Western Blot analizu tkivo je otopljeno, izmerena mu je težina i isprano je u fiziološkom rastvoru (0.85% NaCl). Tkivo je zatim homogenizovano u fosfatnom puferu (0.05 M KH_2PO_4 , 0.0001 M EDTA, pH 7.8) u odnosu, težina tkiva (g) : volumen pufera (ml) = 1 : 2, sa 30 prolaza na 2000 obrtaja u električnom homogenizeru (Spindler&Hoyer, Gottingen). Homogenati su zatim, da bi se izvršilo raskidanje i taloženje membrana, držani 24 h na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, a nakon otapanja i vorteksovanja centrifugirani 20 min na 8600 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatanti su odvojeni od taloga i čuvani na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do do Western Blot analize.

3.4.1.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowry-ju

Koncentracija proteina u svim uzorcima krvi i endometrijuma je određivana spektrofotometrijski, makro metodom (Lowry i sar., 1951). Princip metode je biuretska reakcija peptidnih veza aromatičnih aminokiselina i Cu^{2+} jona u alkalnoj sredini. Kompleksno jedinjenje koje nastaje u ovoj reakciji je plave boje čiji je intenzitet direktno proporcionalan koncentraciji proteina.

Eksperimentalni postupak

Reagensi:

- reagens A: 1% CuSO₄,
- reagens B: 2% K–Na tartarat,
- reagens C: 2% Na₂CO₃ u 0.1 N NaOH,
- reagens D: 1 ml reagens A + 1 ml reagens B + 98 ml reagens C i
- Folin-Chicalteau reagens: pravi se neposredno pred upotrebu razblaživanjem jednog dela ovog reagens sa dva dela vode.

U 20 µl uzorka je dodavano po 200 µl 0.1 N NaOH, 3 ml reagens D, smeša je kratko vorteksovana i inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je u svaki uzorak dodato 600 µl Folin-Chicalteau reagens, dobro izvorteksovano i ostavljeno 35 min na sobnoj temperaturi. Po isteku ovog vremena u svakom uzorku je očitana apsorbanca na 500 nm, u odnosu na blank koji je sadržao vodu umesto uzorka.

Izvođenjem Lowry-jeve reakcije sa serijom poznatih koncentracija albumina iz govedeg seruma (Albumin from bovine serum lyophilized powder, ≥99%, Sigma-Aldrich Co. LLC.) napravljena je standardna kriva (A_{500} u odnosu na koncentraciju proteina) pomoću koje je na osnovu očitavanih apsorbanca (A_{500}) izračunavana koncentracija ukupnih proteina u uzorku. Dobijena koncentracija proteina izražavana je u mg/ml.

3.4.1.3. SDS PAGE elektroforeza i Western blot - postupak

Svi uzorci su razblaživanjem Tris-HCl puferom (15 mM, pH 7.9) svedeni na koncentraciju proteina od 2.0 µg/µl, a zatim razblaženi SBL-om (Sample Buffer Laemmli: 0.5M TRIS, glicerol SDS, 0.1% bromfenolblu, β-merkaptotanol) u odnosu v:v = 1:1. Tako pripremljena smeša je inkubirana 5 min na 100 °C čime je izvršena denaturacija proteina. Smeša je zatim ohlađena i po 10 µl je nanošeno u bunariće poliakrilamidnog gela za elektroforezu. Gel se sastojao od 5%-nog gela za koncentrovanje (1M TRIS pH 6.8, akrilamid, bisakrilamid, 10% SDS, 10% APS, TEMED i H₂O) i 10%-tnog gela za razdvajanje proteina (1.5M TRIS pH 8.8, akrilamid, bisakrilamid, 10% SDS, 10% APS, TEMED i H₂O). Osim ispitivanih uzoraka, na svaki gel je radi preciznijeg određivanja položaja proteinskih traka nanošen proteinski marker

(SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen), a zbog kontrole preciznosti izvođenja procedure i tkzv. "standardni uzorak" dobijen pulovanjem ispitivanih uzoraka.

Ovako pripremljeni gelovi su priključeni na aparat za elektroforezu 1.5 h/100 V (Mini-Protean II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) a zatim je izvršen "semi-dry" transfer sa gela na nitroceluloznu membranu (Nitrocellulose Membrane cat.162-0112, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Transfer je rađen istovremeno na po dva mini-gela, pod uslovima 10 V/0,32 A/ 20 min (Trans-Blot Cell, Bio-Rad, Ca, USA).

3.4.1.4. Imunodetekcija i kvantifikacija

Nakon transfera membrana je 3x ispirana u TBST puferu (Tris-Buffered Saline: TRIS, NaCl, Tween i H₂O) a zatim 2 h inkubirana u rastvoru za blokiranje (1% BSA u TBST) kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje primarnih antitela za membranu. Posle blokiranja, membrana je ponovo 3 puta po 15 min ispirana u TBST-u, a potom inkubirana 90 min sa primarnim antitelima, specifičnim za protein koji se ispituje (Rabbit Anti-CuZnSOD Polyclonal Antibody, SOD-100, Stressgen, Canada; razblaženje 1:7500; Goat Anti-catalase Polyclonal Antibody sc-34285, Santa Cruz Biotechnology, Inc, razblaženje 1:500; Goat Anti-GpX1 Polyclonal Antibody sc-22146, Santa Cruz Biotechnology, Inc, razblaženje 1:500, Goat Anti-Glutathione reductase Polyclonal Antibody sc-32408, Santa Cruz Biotechnology, Inc, razblaženje 1:500; Goat Anti-Nrf2 Polyclonal Antibody sc-30915, Santa Cruz Biotechnology, inc, razblaženje 1:500).

Nakon inkubacije sa primarnim antitelom membrana je 3x po 15 min ispirana u TBST-u i potom inkubirana 1h u rastvoru sekundarnog antitela konjugovanog sa HRP-om (horseradish peroxidase): (za Anti-CuZnSOD: Goat Anti-Rabbit IgG-HRP, SAB-300, Stressgen, Canada; razblaženje: 1:5000; za CAT, GpX1, GR, Nrf2 i ACT: Donkey Anti-Goat IgG-HRP, sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Inc, razblaženje 1:5000). Za normalizaciju je korišćen aktin (primarno antitelo: Goat Anti-beta Actin Polyclonal Antibody ab8229, Abcam, razblaženje: 1:500).

Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom membrana je 3x po 15 min ispirana u TBST-u, posle čega su proteinske trake detektovane ECL (Enhanced chemiluminescence) metodom. Ova metoda se zasniva na HPR-om katalizovanoj oksidaciji luminola u 3-aminofalat preko nekoliko intermedijera. Reakcija je praćena emisijom svetlosti na 428 nm, koja se višestruko pojačava u prisustvu p-kumarične kiseline.

Postupak ECL metode:

10 ml ECL pufera (1 M Tris pH 8.5) , 22 μ l 90 mM p-kumarične kiseline u DMSO, 50 μ l 250 mM luminola u DMSO (dimetil sulfoksid) i 3 μ l 30% H₂O₂ je izmešano, izliveno na membranu i ostavljeno da stoji 90 sec (postupak je obavljan u mračnoj sobi sa crvenom lampom). Nakon inkubacije, rastvor sa luminolom je odliven, membrane su uvijene u providnu zaštitnu foliju i izvršena je dvominutna ekspozicija filma (Fuji Super HR-U30) u kaseti za ekspoziciju (Hypercassette, Amersham Life Science). Film je zatim razvijen (razvijač Tetenal Eukobrom Paper Developer (1:7); fiksir Tetenal Superfix Plus (1:4)), osušen i skeniran, a intenzitet traka je kvantifikovan upotrebom „Image J.“ programa. Sve vrednosti intenziteta traka su normalizovane na aktin i izražene kao relativna količina odgovarajućeg proteina.

3.4.2. Određivanje ekspresije gena (RT-PCR)

3.4.2.1. Izolovanje RNK

Za izolaciju RNK iz tkiva endometrijuma korišćena je metoda fenolske ekstrakcije sa Trizolom. Tkivo endometrijuma (50 mg) je homogenizovano u 500 μ l Trizola (Invitrogen Life Technologies) i smeša inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, homogenatu je dodato 100 μ l hloroforma (-20 °C), smeša je vorteksovana, inkubirana 3min na sobnoj temperaturi, centrifugirana 15 min na 12.000 g (4 °C) i sačuvana je gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK. Da bi se

istaložila RNK, ovoj fazi je dodavano 250 μ l izopropanola (-20°C), smeša je pažljivo promešana i nakon inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi centrifugirana (10 min, 12.000 g, 4°C). Nakon odlivanja supernatanta talog RNK je ispiran je sa 1 ml 75% etanola, a potom sa 1 ml 96% etanola. Nakon svakog dodavanja etanola smeša je kratko vorteksovana i centrifugirana 10 min na 12.000 g. Tako ispran talog je sušen 5 min na sobnoj temperaturi a zatim rastvoren u 30 ml vode tretirane dietilpirokarbonatom (DPC- H_2O). Koncentracija ovako dobijene RNK određivana je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm, na aparatu GENE QUANT PRO.

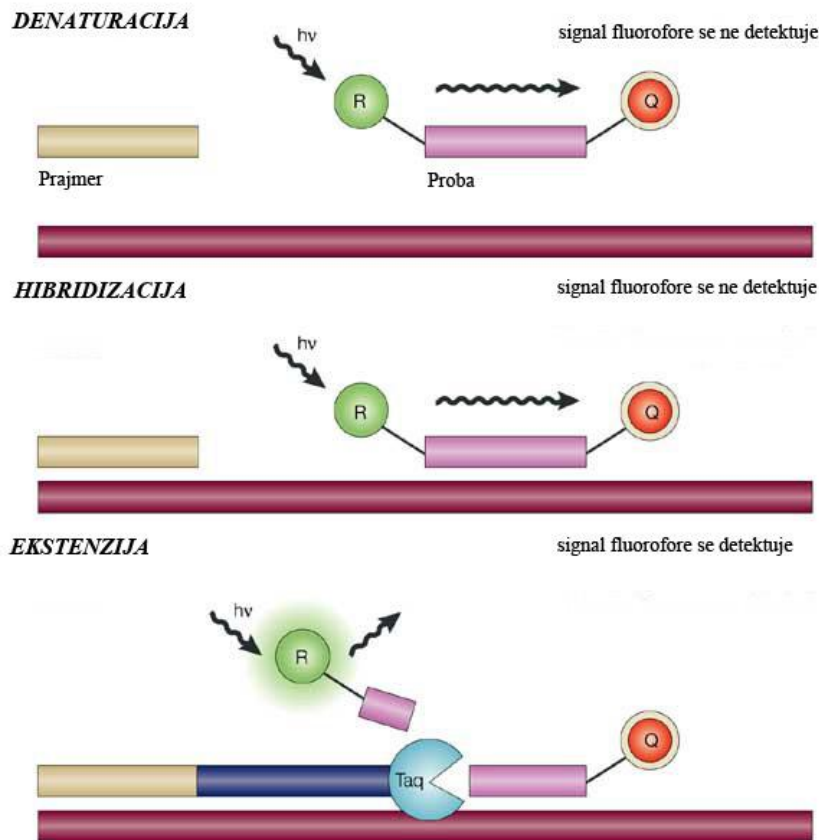
3.4.2.2. Reverzna transkripcija

Prepis RNK u cDNK (reverzna transkripcija) je urađen High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix-om (Applied Biosystems, cat. no.4390778), po originalnom protokolu proizvođača. U 16 μ l razblaženog uzorka u kome se nalazi ukupno 1 μ g RNK dodano je 4 μ l RNA-to-cDNA Master Mix-a i reverzna transkripcija je urađena po sledećoj šemi: 5 min na 25°C / 30 min na 42°C / 5 min na 85°C . Na taj način je za svaki uzorak dobijeno 20 μ l cDNK koncentracije 50 ng/ μ l.

3.4.2.3. TaqMan RT-PCR

Princip metode

RT PCR - lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction) je metoda kojom se u *in vitro* uslovima relativno kratki fragment DNK umnožava u veliki broj identičnih kopija. Reakcija se odvija u više ponovljenih ciklusa, a svaki ciklus se sastoji od tri osnovna koraka: (1) denaturacija dvolančane DNK matrice (na temperaturi od 95°C), (2) hibridizacija DNK matrice sa probom i specifičnim oligonukleotidima koji se nazivaju prajmeri (amplimeri, graničnici) i (3) ekstenzija prajmera, katalizovana Taq DNK polimerazom (slika 5).



Slika 5. Princip RT-PCR metode sa TaqMan probama. Reakcija se odvija u tri koraka: denaturacija, hibridizacija i ekstenzija. Fluorescencija koju emituje fluorofora (R) odvojena od kvenčera (Q) i pobuđena spoljnim izvorom svetlosti ($h\nu$) u svakom PCR ciklusu je proporcionalna količini formiranog produkta ((Koch 2004) modifikovano; dostupno na: http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/fig_tab/nrd1496_F1.html).

U TaqMan - RT PCR kao proba se koristi TaqMan proba, oligonukleotid koji na jednom kraju ima vezanu fluoroforu (reporter, npr. 6-FAM (6-carboxyfluorescein)) koja fluorescira, a na drugom kraju akceptor fluorescencije (kvenčer, npr. TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine)). U intaktnoj probi, zbog blizine reportera i akceptora signal fluorofore se ne detektuje. U toku faze elongacije, zbog 5' egzonukleazne aktivnosti Taq DNK polimeraze dolazi do isecanja proba a time i do odvajanja donora i akceptora fluorescencije, što se detektuje kao povećanje signala (probe korišćene u ovom istraživanju su bile obeležene na 5' kraju FAM-om koji emituje na 518 nm). Povećanje signala u toku PCR reakcije direktno je proporcionalno akumulaciji PCR produkata tj. količini gena čija se ekspresija ispituje ((Livak, Flood i sar. 1995).

Eksperimentalni postupak

Reakciona smeša za PCR pripremana je neposredno pre izvođenja reakcije, prema protokolu preporučenom od strane proizvođača (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). U bunariće ploča za 96 uzoraka (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, The Applied Biosystems) dodavano je po 12.5 µl TaqManGene Expression Master Mixa (Applied Biosystems), 1.25 µl odgovarajućeg eseja (TaqMan Gene Expression Assay -tabela 2), 10 µl uzorka koncentracije 10 ng/µl cDNK i 1.25 µl DPC vode. Finalna zapremina PCR smeše iznosila je 25 µl i sadržala je 100 ng cDNK. Na sve plejtove su, za svaki od ispitivanih gena, nanošene i negativne kotrole (NTC- no template control) koje sadrže sve PCR reagense osim cDNK, a služe kao kontrola eventualne kontaminacije PCR reagenasa i opreme.

Tabela 2. TaqMan eseji korišćeni za određivanje ekspresije gena RT PCR metodom

Gen	ID eseja	Dužina amplikona	Reporterska boja
CuZnSOD	Hs00172187_m1	61	FAM
CAT	Hs00156308_m1	68	FAM
GPX1	Hs02516751_s1	70	FAM
GR	Hs00167317_m1	63	FAM
NRF2	Hs00232352_m1	59	FAM
POLR2A	Hs00172187_m1	61	FAM

Nakon pripreme reakcione smeše ploče su zatvarane specijalnim optičkim filmom (MicroAmp Optical Adhesive Film The Applied Biosystems) i postavljene u aparat za RT PCR (ABI Prisma 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA). Softver aparata je programiran tako da se PCR reakcija odigrava u sledećim koracima: inicijalno zagrevanje smeše na 50 °C u trajanju od 2 min (optimalno za enzimsku aktivnost UDG -Uracil-DNA Glycosylase kojom se sprečava amplifikacija produkata prethodnih PCR reakcija), 95 °C u trajanju od 10 min (neophodno za aktivaciju DNK polimeraze), a zatim je sledilo 40 ciklusa PCR-a. Svaki ciklus je trajao 1 min i 15 sec od kojih je denaturacija na 95 °C trajala 15 sec a hibridizacija/elongacija na 60 °C 1 min. Svi uzorci su rađeni u triplikatu a ispitivani geni normalizovani su na POLR2A kao endogenu kontrolu.

Gen za POLR2 je odabran za endogenu kontrolu na osnovu rezultata validacionog eksperimenta u kome je na probnim uzorcima iz svih pet eksperimentalnih grupa određivana ekspresija gena za POLR2A, HPRT1 i RPLPO. Ova tri gena su odabrana kao potencijalni kandidati za endogenu kontrolu na osnovu pregleda literature (Radonic, Thulke i sar. 2004; de Kok, Roelofs i sar. 2005; McNeill, Miller i sar. 2007), a RT-PCR metodom je pokazano da je POLR2A najpogodniji za normalizaciju uzoraka jer je njegova ekspresija u datim uslovima najstabilnija tj. najmanje varira sa dijagnozom i uslovima eksperimenta. Eksperiment validacije endogene kontrole je pokazao i da su Ct vrednosti za POLR2A u ispitivanim uzorcima bila najpribližnije Ct vrednostima gena čija se ekspresija ispituje, što dodatno doprinosi povećanju osetljivosti RT-PCR metode.

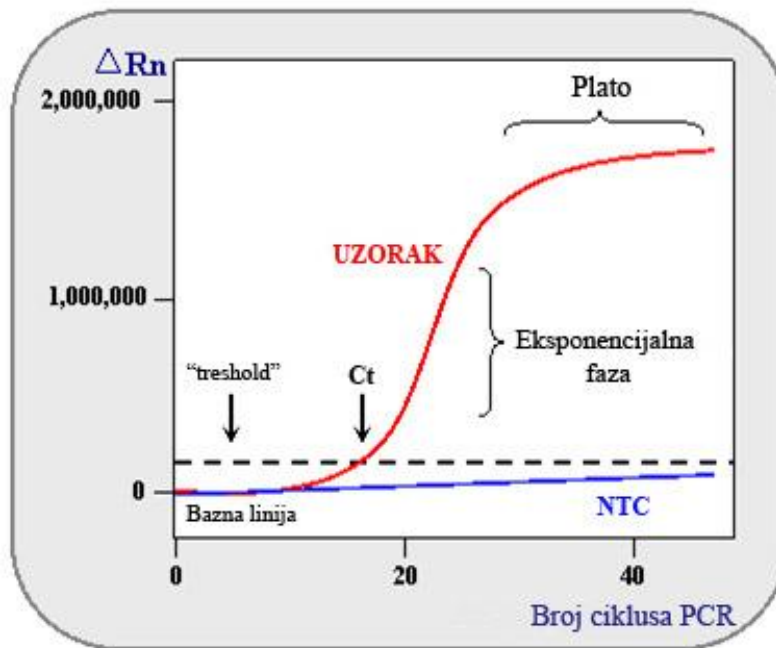
3.4.2.3.1. Kvantifikacija RT-PCR rezultata

Detekcija amplifikacije u RT-PCR metodi se vrši u eksponencijalnoj fazi PCR reakcije (slika 6) u kojoj se amplifikacija odigrava najbrže, a specifičnost i preciznost reakcije su najveće. Mereći promenu intenziteta fluorescentnog signala u toku reakcije, softverski program aparata u svakom uzorku određuje "threshold" i Ct vrednost. Bazna linija (threshold) je nivo fluorescencije na kome reakcija prelazi nivo "šuma", a Ct vrednost (cycle threshold) predstavlja broj ciklusa u kome dati uzorak dostiže baznu liniju i obrnuto je proporcionalna inicijalnoj količini specifičnog templata u uzorku.

Svaka Ct vrednost uzorka za određeni gen (Ct_{GEN}) normalizovana je u odnosu na Ct vrednost endogene kontrole u tom uzorku (Ct_{POLR2A}) i izražena kao ΔCt_{GEN} prema jednačini:

$$\Delta Ct_{GEN} = Ct_{GEN} - Ct_{POLR2A}$$

Za statističku obradu podataka su za svaki uzorak korišćene srednje vrednosti ΔCt_{GEN} triplikata.



Slika 6. Amplifikaciona kriva RT –PCR. Prikazano je povećanje fluorescentnog signala ΔR_n u odnosu na broj ciklusa PCR reakcije. Eksponencijalna faza (najbrža amplifikacija: tokom ove faze u svakom ciklusu količina DNK se duplira). Linarna faza (troše se komponente reakcionog sistema i amplifikacija se usporava, moguća je i degradacija produkata). Plato (nema amplifikacije, degradacija produkata je sve veća).

(modifikovano; dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>)

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

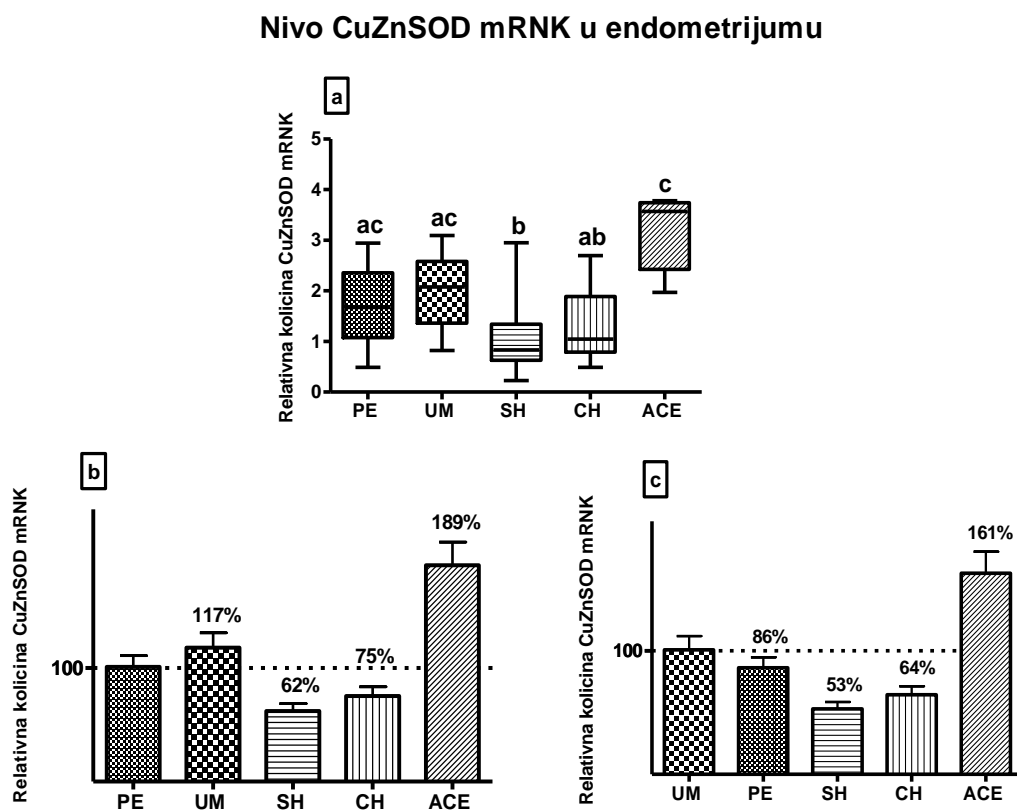
U okviru obrade eksperimentalno dobijenih rezultata primenjeni su sledeći statistički pristupi analize podataka: Kruskal-Wallis metoda, Mann-Whitney test, Spearman-ova korelacija, Dunn test. Statistička značajnost je prihvaćena na nivou $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. NIVO mRNK ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA I Nrf2 U ENDOMETRIJUMU

4.1.1. Nivo CuZnSOD mRNA u endometriju

U endometriju ginekoloških pacijentkinja relativna količina CuZnSOD mRNA značajno varira između ispitivanih grupa ($H=27.19$, $p<0.0001$, Kruskal-Wallis).



Slika 7. Relativna količina CuZnSOD mRNA u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p<0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine CuZnSOD mRNA izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Rezultati prikazani na grafikonima b) i c) slike 7. pokazuju da se količina CuZnSOD mRNK ne razlikuje značajno između pacijentkinja sa polipom i miomom (variraju oko 15%). U odnosu na te dve "kontrolne" grupe, kod pacijentkinja sa hiperplazijama (SH i CH) nivo CuZnSOD mRNK je smanjen 25 - 47%, pri čemu je smanjenje u grupi sa hiperplazijom simpleks statistički značajno (Dunn test, slika 7; grafikon a)). Kod pacijentkinja sa adenokarcinomom nivo CuZnSOD mRNK iznosi 189% odnosno 161% nivoa CuZnSOD mRNKu grupama PE i UM. Prema Dunn testu ovaj porast relativne količine CuZnSOD mRNK je statistički značajan u odnosu na pacijentkinje sa hiperplazijama (SH i CH), ali ne i u odnosu na pacijentkinje sa benignim transformacijama endometrija (PE i UM).

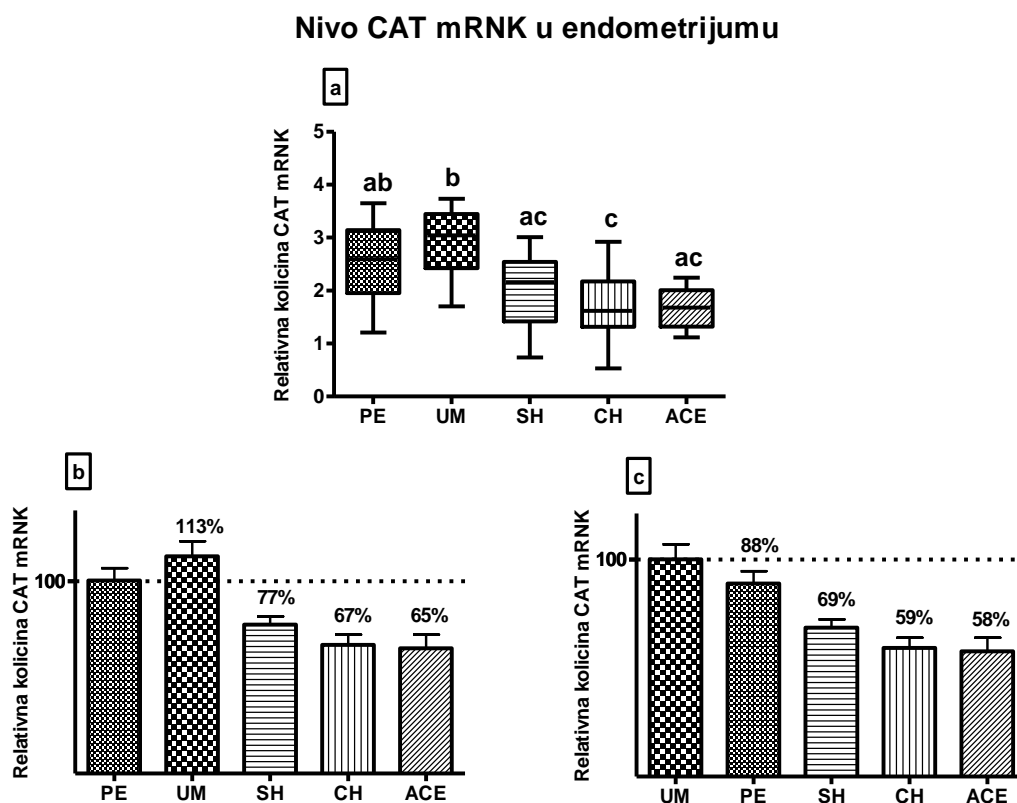
Rezultati Mann-Whitney testa prikazani u tabeli 3. pokazuju da je nivo CuZnSOD mRNK kod pacijentkinja sa hiperplazijom kompleks značajno smanjen u odnosu na pacijentkinje iz grupa PE i UM, kao i da je povećanje CuZnSOD mRNK kod pacijentkinja sa adenokarcinomom statistički značajno u odnosu na pacijentkinje sa benignim transformacijama endometrija (PE i UM).

Tabela 3. Statističke značajnosti razlika relativnih količina CuZnSOD mRNK u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosis (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina CuZnSOD mRNK u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.3408	0.0033 **	<u>0.0428</u> *	<u>0.0065</u> **
UM			0.0006 ***	<u>0.0111</u> *	<u>0.0234</u> *
SH				0.2032	0.0008 ***
CH					0.0013 **

4.1.2. Nivo CAT mRNK u endometriju

Kruskal-Wallis test pokazuje da nivo CAT mRNK u endometriju ispoljava značajne razlike između pet ispitivanih grupa pacijentkinja ($H=25.98$, $p<0.0001$). Na graficima prikazanim na slici 8. može se zapaziti da nivo CAT mRNK kod pacijentkinja sa benignim promenama na uterusu (PE i UM) varira manje od 15%, ali se u odnosu na njih smanjuje u grupama žena sa premalignim (SH i CH) i malignim (ACE) transformacijama, i to u rasponu 23 - 42%. Uočeno smanjenje nivoa CAT mRNK u grupama SH, CH i ACE je statistički značajno u odnosu na UM, ali u odnosu na PE samo pad CH od 41% pokazuje statističku značajnost (Dunn test).



Slika 8. Relativna količina CAT mRNK u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p<0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine CAT mRNK izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Iz podataka prikazanih u tabeli 4. se može videti da je prema rezultatima Mann-Whitney testa nivo CAT mRNK kod pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i adenokarcinomom statistički značajno smanjen u odnosu na pacijentkinje sa polipom, iako ove značajnosti nisu dobijene Dunn testom.

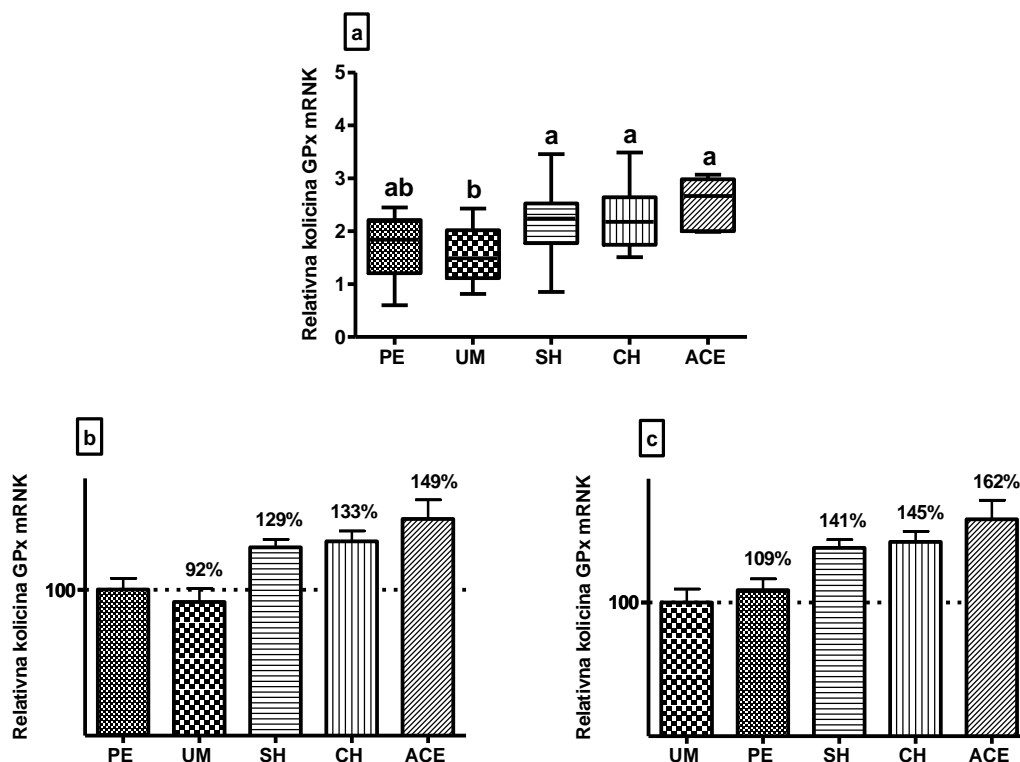
Tabela 4. Statističke značajnosti razlika relativnih količina CAT mRNK u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina CAT mRNK u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.2276	<u>0.0104</u> *	0.0009 ***	<u>0.0101</u> *
UM			0.0010 **	0.0002 ***	0.0052 **
SH				0.0968	0.2528
CH					0.9751

4.1.3. Nivo GPx mRNK u endometriju

Relativna količina GPx mRNK u tkivu endometrija takođe značajno varira u zavisnosti od dijagnoze ispitivanih pacijentkinja ($H=20.19$, $p=0.0005$, Kruskal-Wallis). Na slici 9. se može videti da u odnosu na "kontrolne" grupe (PE i UM) nivo GPx mRNK raste u grupama pacijentkinja sa hiperplazijama (129 - 145%) i adenokarcinomom (oko 155%). Prema prikazanim rezultatima, porast GPx mRNK u grupama SH, CH i ACE je statistički značajan u odnosu na pacijentkinje sa miomom, ali ne i na one sa polipom (Dunn test).

Nivo GPx mRNK u endometriju



Slika 9. Relativna količina GPx mRNK u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine GPx mRNK izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Rezultati Mann-Whitney testa, prikazani u tabeli 5. pokazuju da je u grupama SH, CH i ACE porast GPx mRNK od 129 - 149% statistički značajan u odnosu na grupu pacijentkinja sa polipom.

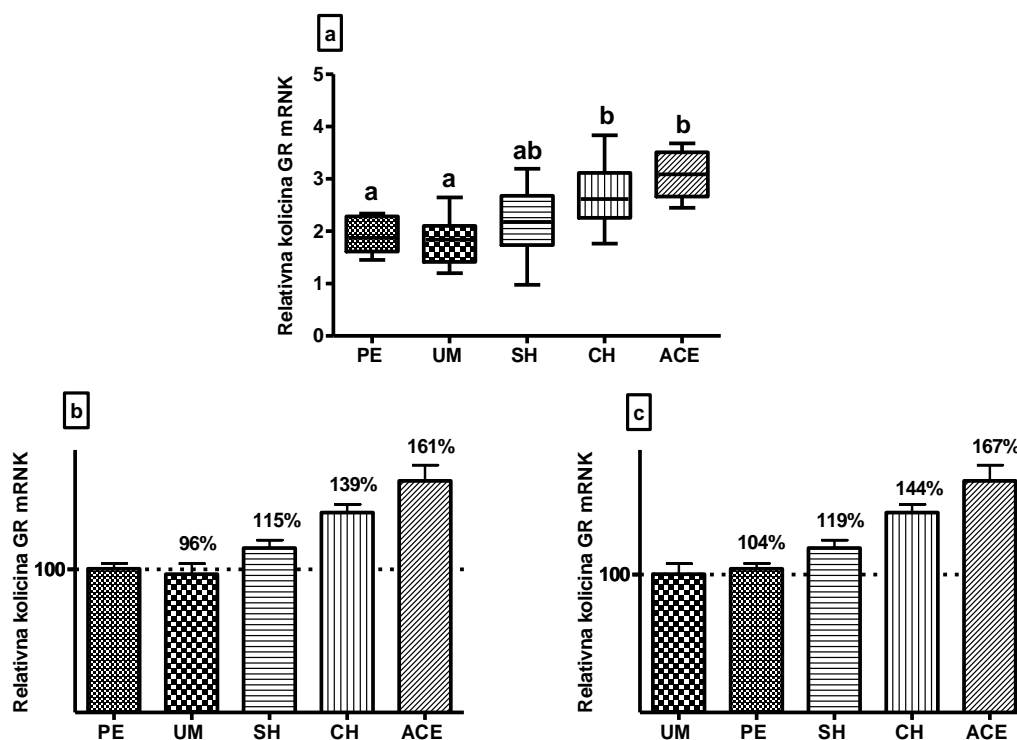
Tabela 5. Statističke značajnosti razlika relativnih količina GPx mRNA u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosis (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina GPx mRNA u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.4588	<u>0.0060</u> **	<u>0.0074</u> **	<u>0.0125</u> *
UM			0.0018 **	0.0037 **	0.0132 *
SH				0.9784	0.1312
CH					0.3654

4.1.4. Nivo GR mRNA u endometriju

U zavisnosti od tipa transformacije endometrija nivo GR mRNA u ovom tkivu značajno varira između grupa pacijentkinja uključenih u ovu studiju (H=28.90, p<0.0001, Kruskal-Wallis). Slično promenama mRNA za GPx, i GR mRNA se ne menja značajno u grupi žena sa polipom i miomom, a raste u grupama sa hiperplazijama (115 - 144%) i adenokarcinomom (oko 160%). Prema Dunn testu (grafikon a) na slici 10) uočeni porast GR mRNA je u odnosu na kontrolne grupe (PE i UM) statistički značajan u grupama pacijentkinja sa hiperplazijom kompleks i adenokarcinomom, dok se nivo GR mRNA kod pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks ne razlikuje značajno ni od jedne od preostalih ispitivanih grupa.

Nivo GR mRNK u endometriju



Slika 10. Relativna količina GR mRNA u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine GR mRNA izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Mann-Whitney analiza, čiji su rezultati prikazani u tabeli 6, je pokazala da je relativna količina GR mRNA u endometriju pacijentkinja iz grupa CH i ACE statistički značajno viša od nivoa ove mRNA kod pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks

Tabela 6. Statističke značajnosti razlika relativnih količina GR mRNK u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

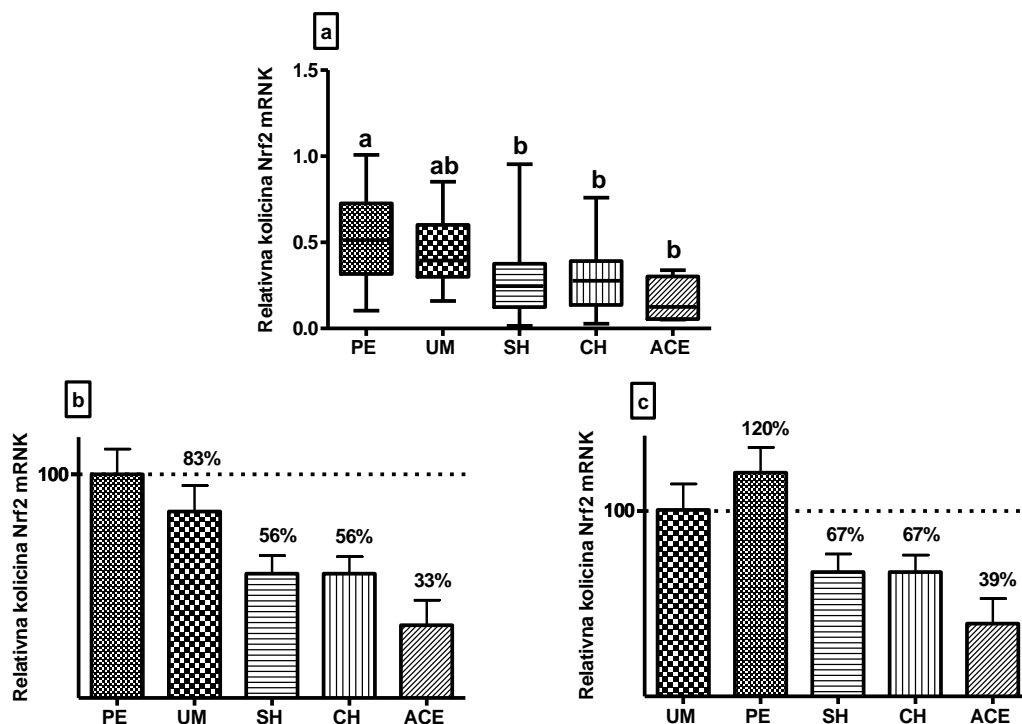
Relativna količina GR mRNK u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.7509	0.0910	p<0.0001 ***	0.0009 ***
UM			0.0855	0.0005 ***	0.0037 **
SH				<u>0.0073</u> **	<u>0.0061</u> **
CH					0.1602

4.1.5. Nivo Nrf2 mRNA u endometriju

Relativna količina Nrf2 mRNA u endometriju značajno varira između ispitivanih grupa pacijentkinja (H=19.17, p=0.0007, Kruskal-Wallis) i generalno pokazuje trend sniženja sa progresijom maligne transformacije tkiva (slika 11. i tabela7). Rezultati Dunn testa (grafikon a) na slici 11) pokazuju da je transkripcija Nrf2 kod pacijentkinja sa polipom i miomom na približno istom nivou (varira oko 20%), ali je u odnosu na njih snižena u grupama SH, CH i ACE (33 - 67%). Uočeno sniženje nivoa Nrf2 mRNA u grupama SH, CH i ACE statistički je značajno samo u odnosu na pacijentkinje sa polipom.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 7. nivo Nrf2 mRNA u endometriju pacijentkinja sa miomom značajno je povećan u odnosu na ispitanice u grupama SH, CH i ACE (Mann-Whitney test).

Nivo Nrf2 mRNK u endometriju



Slika 11. Relativna količina Nrf2 mRNK u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine Nrf2 mRNK izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Podvučene p vrednosti u tabeli 7. ukazuju na razliku u značajnosti između Mann-Whitney i Dunn post hoc testa.

Tabela 7. Statističke značajnosti razlika relativnih količina Nrf2 mRNK u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

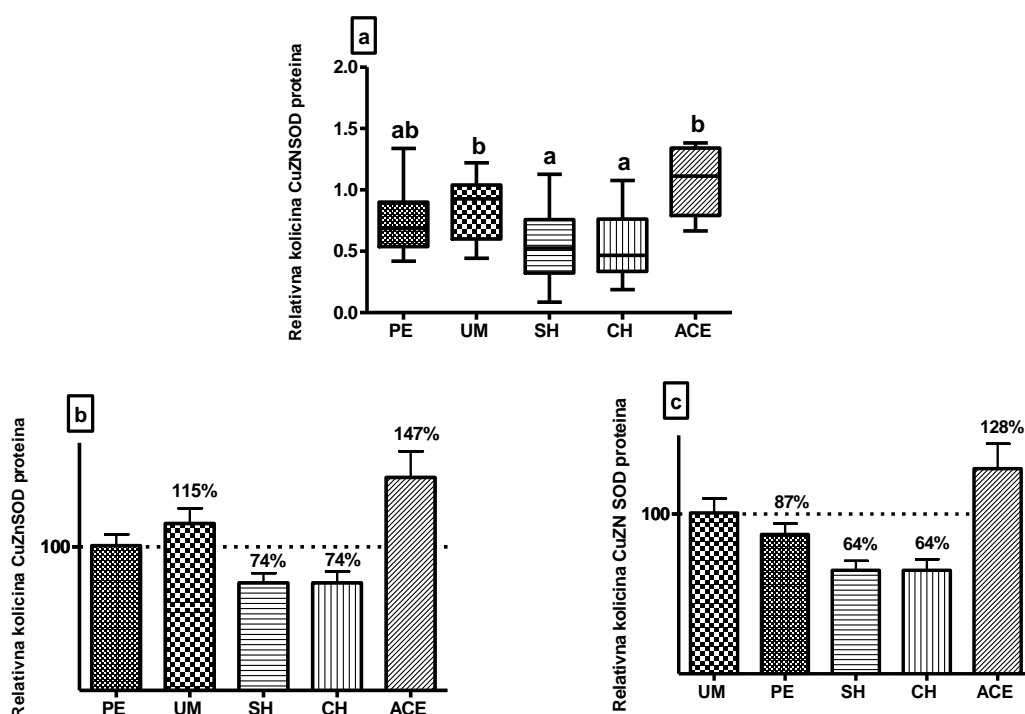
Relativna količina Nrf2 mRNK u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.3855	0.0015 **	0.0024 **	0.0065 **
UM			<u>0.0192</u> *	<u>0.0417</u> *	<u>0.0177</u> *
SH				0.6846	0.2343
CH					0.1602

4.2. NIVO ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA I Nrf2 U ENDOMETRIJUMU

4.2.1. Nivo CuZnSOD u endometriju

Relativna količina CuZnSOD proteina u tkivu endometrija značajno varira u zavisnosti od dijagnoze ispitivanih pacijentkinja ($H=20.14$, $p=0.0005$, Kruskal-Wallis).

Nivo CuZnSOD proteina u endometriju



Slika 12. Relativna količina CuZnSOD proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p<0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine CuZnSOD proteina izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Kao što se može videti na slici 12. nivo CuZnSOD proteina kod pacijentkinja sa polipom i miomom varira manje od 20%, a u odnosu na njih opada na 64 - 74% u grupama ispitanica sa hiperplazijama i raste na 128 - 147% kod žena sa adenokarcinomom (slika 12. grafikoni b i c). Dunn test (slika 12. grafikon a) pokazuje

da je smanjenje nivoa CuZnSOD proteina u grupama SH i CH značajno u odnosu na pacijentkinje u grupi UM i ACE.

Tabela 8. Statističke značajnosti razlika relativnih količina CuZnSOD proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

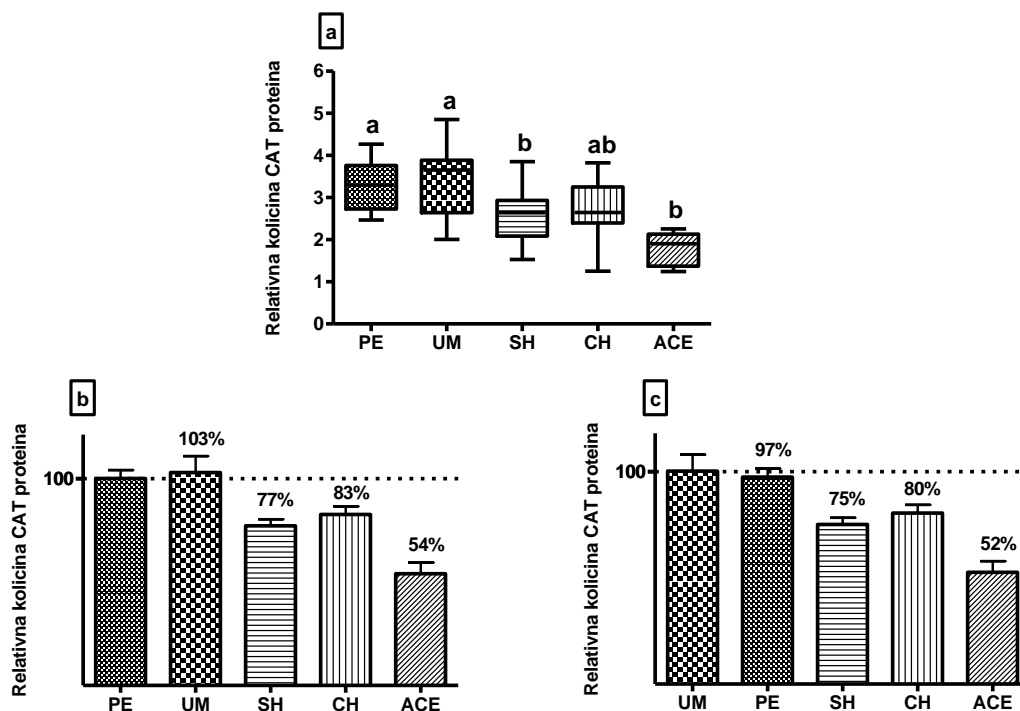
Relativna količina CuZnSOD proteina u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.2444	<u>0.0318</u> *	<u>0.0286</u> *	<u>0.0336</u> *
UM			0.0039 **	0.0047 **	0.1264
SH				0.9784	0.0046 **
CH					0.0055 **

Rezultati Mann-Whitney testa, prikazani u tabeli 8. pokazuju da je količina CuZnSOD proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnostikovanim polipom statistički značajno veća od količine CuZnSOD u grupama SH i CH, a značajno manja od količine zabeležene kod pacijentkinja sa adenokarcinomom.

4.2.2. Nivo CAT u endometriju

U zavisnosti od tipa transformacije endometrija nivo CAT proteina u ovom tkivu značajno varira (H=26.56, p<0.0001, Kruskal-Wallis).

Nivo CAT proteina u endometriju



Slika 13. Relativna količina CAT proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine CAT proteina izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Na grafikonima b) i c) (slika 13) se može videti da nivo CAT proteina između grupa žena sa polipom i miomom varira manje od 5%, a smanjuje se u grupama sa hiperplazijama (75 - 83%) i adenokarcinomom (oko 50%). Prema Dunn testu (grafikon a) na slici 13) u odnosu na kontrolne grupe (PE i UM) uočeno smanjenje nivoa CAT proteina statistički je značajno u grupama SH i ACE.

Mann-Whitney analiza, čiji su rezultati prikazani u tabeli 9. je pokazala da je nivo CAT proteina u grupi pacijentkinja sa hiperplazijom kompleks značajno smanjen u odnosu na pacijentkinje sa polipom i miomom, kao i da je nivo CAT u adenokarcinomu značajno manji od nivoa CAT kod obe vrste hiperplazija.

Tabela 9. Statističke značajnosti razlika relativnih količina CAT proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

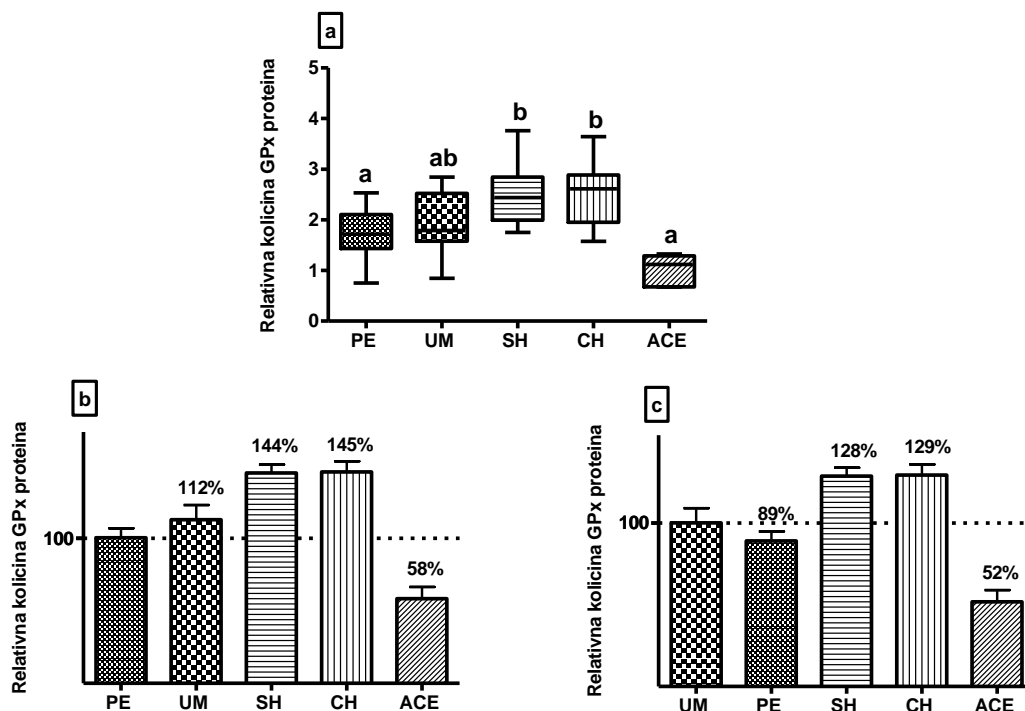
Relativna količina CAT proteina u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.8822	0.0004 ***	<u>0.0049</u> **	0.0009 ***
UM			0.0083 **	<u>0.0383</u> *	0.0027 **
SH				0.2631	<u>0.0135</u> *
CH					<u>0.0037</u> **

4.2.3. Nivo GPx u endometriju

U endometriju ginekoloških pacijentkinja relativna količina GPx proteina značajno varira između ispitivanih grupa ($H=34.05$, $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis). Rezultati prikazani na grafikonima b) i c) slike 14. pokazuju da se količina GPx proteina ne razlikuje značajno između pacijentkinja sa polipom i miomom. U odnosu na te dve "kontrolne" grupe, kod pacijentkinja sa hiperplazijama (SH i CH) nivo GPx proteina raste (128 - 145%), dok u grupi ispitanica sa adenokarcinomom opada (oko 50%). Na grafikonu a) slike 14. se vidi da je povećanje nivoa GPx proteina kod pacijentkinja sa obe vrste hiperplazija statistički značajno u odnosu na grupe PE i ACE.

Rezultati Mann-Whitney testa prikazani u tabeli 10. pokazuju da je nivo GPx proteina u grupi UM statistički značajno smanjen u odnosu na grupe SH i CH, a istovremeno značajno povećan u odnosu na grupu pacijentkinja sa adenokarcinomom. Ova analiza takođe pokazuje da je nivo GPx u grupi ACE značajno smanjen u odnosu na nivo GPx proteina u grupi PE.

Nivo GPx proteina u endometriju



Slika 14. Relativna količina GPx proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kučice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine GPx proteina izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

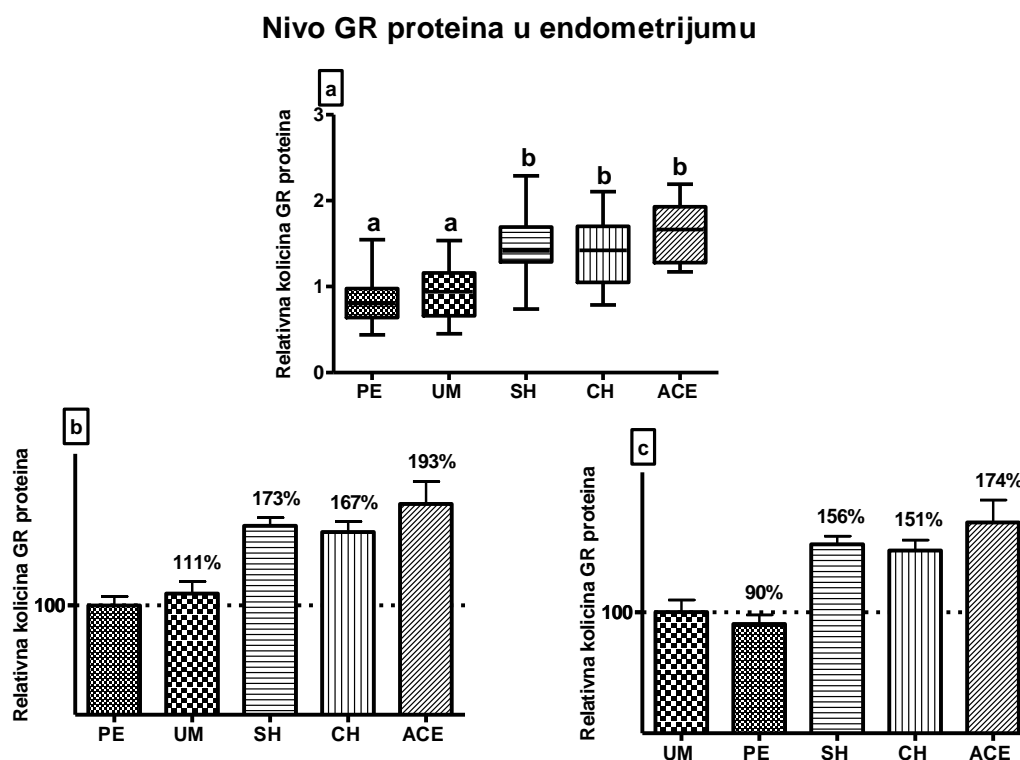
Podvučene p vrednosti u tabeli 10. ukazuju na razliku u značajnosti između Mann-Whitney i Dunn post hoc testa.

Tabela 10. Statističke značajnosti razlika relativnih količina GPx proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina GPx proteina u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.2276	$p < 0.0001$ ***	0.0001 ***	<u>0.0041</u> **
UM			<u>0.0137</u> *	<u>0.0183</u> *	<u>0.0052</u> **
SH				0.7521	0.0004 ***
CH					0.0007 ***

4.2.4. Nivo GR u endometriju

Relativna količina GR proteina u endometriju značajno varira između ispitivanih grupa pacijentkinja ($H=35.30$, $p<0.0001$, Kruskal-Wallis) i menja se sa progresijom maligne transformacije tkiva (slika 15. i tabela 11). Prikazani rezultati pokazuju da je nivo GR proteina kod pacijentkinja sa polipom i miomom na približno istom nivou (varira oko 10%), ali je u odnosu na njih značajno povećan u grupama SH i CH (151 - 173%), kao i u grupi žena sa adenokarcinomom (do 193%). Prema rezultatima Dunn testa (grafikon a) na slici 15) povećanje nivoa GR u grupama SH, CH i ACE statistički je značajno u odnosu na grupe PE i UM, dok između samih grupa sa premalignim (SH i CH) i malignim (ACE) promenama nije detektovana značajna razlika.



Slika 15. Relativna količina GR proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p<0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine GR proteina izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Ovi rezultati saglasni su sa rezultatima Mann-Whitney testa, prikazanim u tabeli 11.

Tabela 11. Statističke značajnosti razlika relativnih količina GR proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Mann-Whitney test).

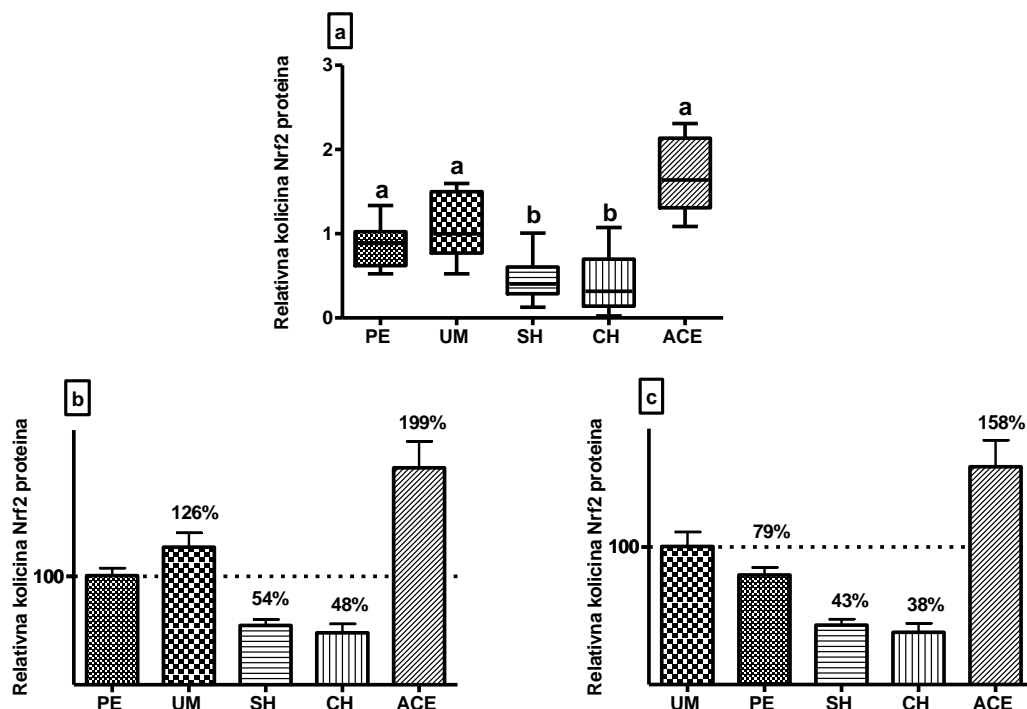
Relativna količina GR proteina u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.3408	p<0.0001 ***	p<0.0001 ***	0.0025 **
UM			0.0002 ***	0.0016 **	0.00719 **
SH				0.8075	0.4379
CH					0.3994

4.2.5. Nivo Nrf2 u endometriju

Kruskal-Wallis test je pokazao da nivo Nrf2 proteina u endometriju pokazuje značajne razlike između pet ispitivanih grupa pacijentkinja (H=42.58, p<0.0001). Na graficima b) i c) prikazanim na slici 16. se može videti da nivo Nrf2 između grupa pacijentkinja sa benignim promenama na uterusu (PE i UM) varira oko 20%. U odnosu na te dve "kontrolne" grupe, relativna količina Nrf2 proteina je smanjena kod žena sa premalignim dijagnozama (38 - 54%), a povećana u grupama sa malignim promenama endometrija (158 - 199%). Prema rezultatima Dunn testa uočeno smanjenje nivoa Nrf2 proteina u grupama SH i CH je statistički značajno u odnosu na UM i PE, a nivo Nrf2 u grupi ACE pokazuje značajno povećanje u odnosu na obe grupe pacijentkinja sa hiperplazijama.

Iz podataka datih u tabeli 12. može se videti da rezultati Mann-Whitney testa pokazuju da je nivo Nrf2 proteina kod pacijentkinja adenokarcinomom statistički značajno povećan u odnosu na "kontrolne" grupe pacijentkinja sa polipom i miomom.

Nivo Nrf2 proteina u endometriju



Slika 16. Relativna količina Nrf2 proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). **Grafikoni b i c** prikazuju procentualne promene relativne količine Nrf2 proteina izražene u odnosu na grupu PE (b) odnosno UM (c), čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Podvučene p vrednosti u tabeli 12. ukazuju na razliku u značajnosti između Mann-Whitney i Dunn post hoc testa.

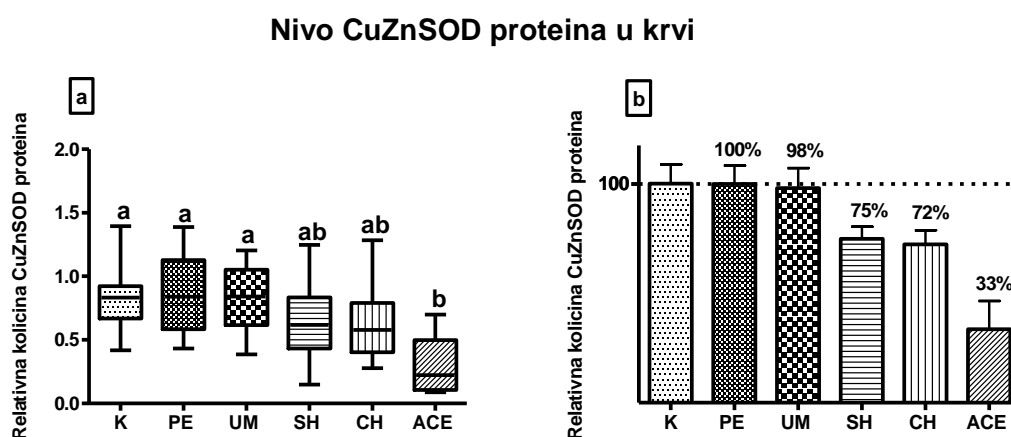
Tabela 12. Statističke značajnosti razlika relativnih količina Nrf2 proteina u endometriju pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina Nrf2 proteina u endometriju	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
PE		0.1441	$p < 0.0001$ ***	0.0003 ***	<u>0.0020</u> **
UM			$p < 0.0001$ ***	0.0002 ***	<u>0.0177</u> *
SH				0.2163	0.0004 ***
CH					0.0007 ***

4.3. NIVO ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA I Nrf2 U KRVI

4.3.1. Nivo CuZnSOD u krvi

U krvi zdravih ispitanica i ginekoloških pacijentkinja relativna količina CuZnSOD proteina značajno varira između ispitivanih grupa ($H=20.78$, $p=0.0009$, Kruskal-Wallis). Rezultati prikazani na slici 17. pokazuju da se količina CuZnSOD proteina u krvi pacijentkinja sa polipom i miomom ne razlikuje značajno od nivoa CuZnSOD u kontrolnoj grupi žena (98 - 100%). U odnosu na grupe K, PE i UM, kod pacijentkinja sa hiperplazijama i adenokarcinomom nivo CuZnSOD proteina opada (33 - 75%), ali je uočeno smanjenje statistički značajno samo u grupi sa adenokarcinomom (Dunn test).



Slika 17. Relativna količina CuZnSOD proteina u krvi kontrolnih osoba (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p<0.05$, Dunn test). Na **grafikonu b** prikazane su relativne količine CuZnSOD proteina izražene u procentima od kontrole, čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

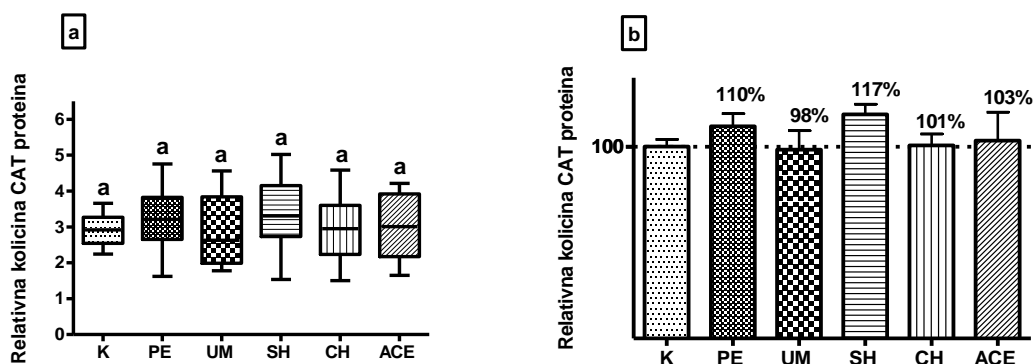
Rezultati Mann-Whitney testa prikazani u tabeli 13. pokazuju da je nivo CuZnSOD proteina kod pacijentkinja sa obe vrste hiperplazija statistički značajno smanjen u odnosu na grupe K, PE i UM, ali istovremeno i značajno povećan u odnosu na nivo CuZnSOD u grupi ACE.

Tabela 13. Statističke značajnosti razlika relativnih količina CuZnSOD proteina u krvi kontrolnih pacijentkinja (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina CuZnSOD proteina u krvi	K (n=15)	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
K		0.9568	0.9805	<u>0.0311</u> *	<u>0.0180</u> *	0.0052 **
PE			0.9157	<u>0.0219</u> *	<u>0.0161</u> *	0.0065 **
UM				<u>0.0409</u> *	<u>0.0320</u> *	0.0098 **
SH					0.5944	<u>0.0104</u> *
CH						<u>0.0192</u> *

4.3.2. Nivo CAT u krvi

Nivo CAT proteina u krvi



Slika 18. Relativna količina CAT proteina u krvi kontrolnih osoba (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtica iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). Na **grafikonu b** prikazane su relativne količine CAT proteina izražene u procentima od kontrole, čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Kruskal-Wallis test pokazuje da nivo CAT proteina u krvi ne varira značajno između grupa pacijentkinja ispitivanih u okviru ove studije ($H=6.40$, $p=0.2694$). Na slici 18. se može videti da je u odnosu na kontrolnu grupu ispitanica nivo CAT proteina relativno nepromenjen kako kod pacijentkinja sa benignim, tako i kod onih sa hiperplastičnim promenama i adenokarcinomom endometrija. Razlike nivoa CAT proteina između ispitivanih grupa ne prelaze 20% i ne pokazuju statističku značajnost ni u Dunn testiranju (slika 18. grafikon a)), ni u Mann-Whitney analizi (tabela 14).

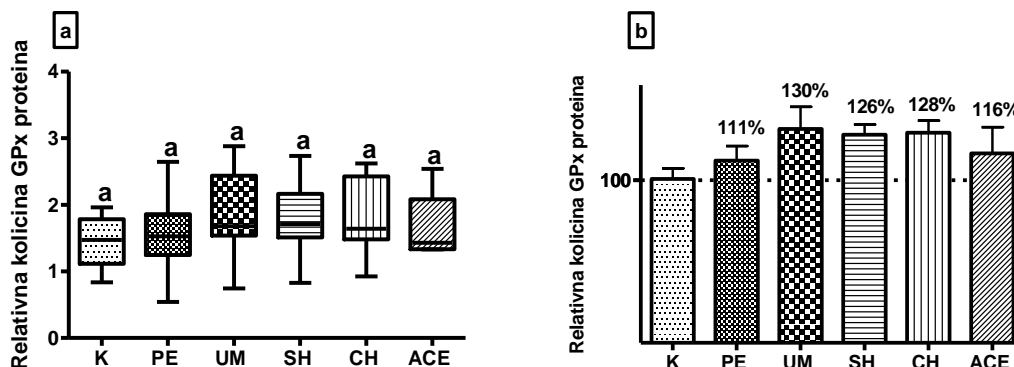
Tabela 14. Statističke značajnosti razlika relativnih količina CAT proteina u krvi kontrolnih pacijentkinja (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosis (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Mann-Whitney test).

Relativna količina CAT proteina u krvi	K (n=15)	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
K		0.2258	0.4792	0.0608	0.8893	0.7934
PE			0.3000	0.4743	0.2952	0.9703
UM				0.0855	0.7051	0.8744
SH					0.07392	0.4642
CH						0.7788

4.3.3. Nivo GPx u krvi

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da relativna količina GPx proteina u krvi ne varira značajno između ispitivanih grupa pacijentkinja ($H=10.25$, $p=0.0684$, Kruskal-Wallis). Slično rezultatima za CAT (slika 18) rezultati sa slike 19. pokazuju da se i nivo GPx proteina u krvi ginekoloških pacijentkinja (grupe PE, UM, SH, CH i ACE) ne menja značajno u odnosu na kontrolnu grupu žena (K). Zabeležene razlike između ispitivanih grupa variraju 10 - 30% (slika 19. grafikon b)) i prema rezultatima Dunn testa (slika 19. grafikon a)) nisu statistički značajne.

Nivo GPx proteina u krvi



Slika 19. Relativna količina GPx proteina u krvi kontrolnih osoba (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kučiće“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). Na **grafikonu b** prikazane su relativne količine GPx proteina izražene u procentima od kontrole, čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

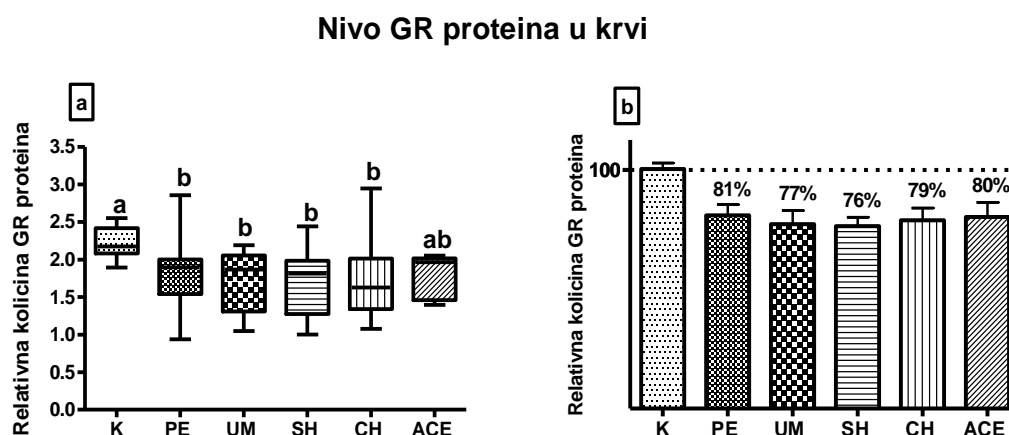
Rezultati Mann-Whitney testa pokazuju značajno povećanje relativne količine GPx proteina u krvi pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks u odnosu na kontrolnu grupu žena (tabela 15).

Tabela 15. Statističke značajnosti razlika relativnih količina GPx proteina u krvi kontrolnih pacijentkinja (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina GPx proteina u krvi	K (n=15)	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
K		0.3954	0.0673	<u>0.0158</u> *	<u>0.0165</u> *	0.6625
PE			0.1328	0.0745	0.1056	0.9110
UM				0.7866	0.7869	0.3166
SH					0.9784	0.2723
CH						0.3025

4.3.4. Nivo GR u krvi

Relativna količina GR proteina u krvi značajno varira u zavisnosti od dijagnoze ispitivanih ginekoloških pacijentkinja ($H=19.83$, $p=0.0013$, Kruskal-Wallis).



Slika 20. Relativna količina GR proteina u krvi kontrolnih osoba (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p<0.05$, Dunn test). Na **grafikonu b** prikazane su relativne količine GR proteina izražene u procentima od kontrole, čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Kao što se može videti na slici 20. nivo GR proteina kod pacijentkinja sa benignim (PE, UM), premaligno (SH, CH) i maligno (ACE) transformisanim endometrijumom opada relativno uniformno (oko 20%) u odnosu na kontrolnu grupu pacijentkinja (K). Prema rezultatima Dunn testa ovo smanjenje je statistički značajno za grupe PE, UM, SH i CH (slika 20. grafikon a)), a Mann-Whitney analiza pokazuje da je i u grupi pacijentkinja sa adenokarcinomom nivo GR proteina u krvi značajno smanjen u odnosu na kontrolu (tabela 16).

Tabela 16. Statističke značajnosti razlika relativnih količina GR proteina u krvi kontrolnih pacijentkinja (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina GR proteina u krvi	K (n=15)	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
K		0.0016 **	0.0068 **	0.0001 ***	0.0008 ***	<u>0.0068</u> **
PE			0.8822	0.5270	0.3918	0.9703
UM				0.8391	0.9139	0.7123
SH					0.7935	0.05521
CH						0.4729

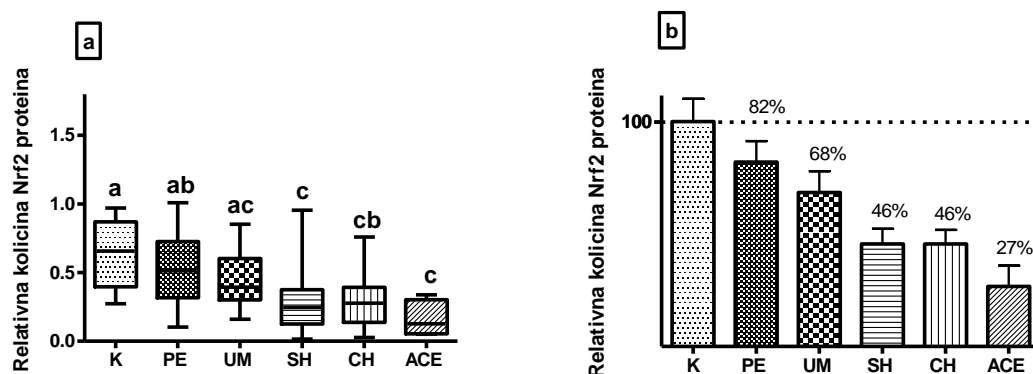
4.3.5. Nivo Nrf2 u krvi

Prema rezultatima Kruskal-Wallis testa nivo Nrf2 proteina u krvi pokazuje značajne razlike između ispitivanih grupa pacijentkinja ($H=32.05$, $p<0.0001$).

Podaci prikazani na slici 21. pokazuju da u odnosu na kontrolnu grupu pacijentkinja (K), u grupama ispitanica sa dijagnozama PE, UM, SH, CH i ACE dolazi do smanjenja relativne količine Nrf2 proteina u krvi, mada je ovo smanjenje statistički značajno samo kod pacijentkinja sa hiperplazijama i adenokarcinomom kod kojih nivo Nrf2 opada za preko 50%. Osim toga, Dunn test pokazuje i da je smanjenje nivoa Nrf2 u grupi ACE statistički značajno u odnosu na grupu pacijentkinja sa polipom.

Iz rezultata Mann-Whitney testa prikazanih u tabeli 17. može se videti da je nivo Nrf2 proteina u krvi pacijentkinja sa miomom statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu, ali značajno povećan u odnosu na vrednosti Nrf2 izmerene u grupama SH, CH i ACE.

Nivo Nrf2 proteina u krvi



Slika 21. Relativna količina Nrf2 proteina u krvi kontrolnih osoba (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE). „Kućice“ na **grafikonu a** obuhvataju 25 - 75% izmerenih vrednosti, linija u kućici označava medijanu, a crtice iznad i ispod kućice najmanju i najveću izmerenu vrednost. Grupe sa različitim slovnim oznakama iznad kućica se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0.05$, Dunn test). Na **grafikonu b** prikazane su relativne količine Nrf2 proteina izražene u procentima od kontrole, čija je vrednost uzeta kao 100%-tna.

Takođe, Mann-Whitney test pokazuje da je relativna količina Nrf2 proteina u krvi pacijentkinja sa hiperplazijom kompleks značajno niža od one zabeležene kod ispitanica sa polipom.

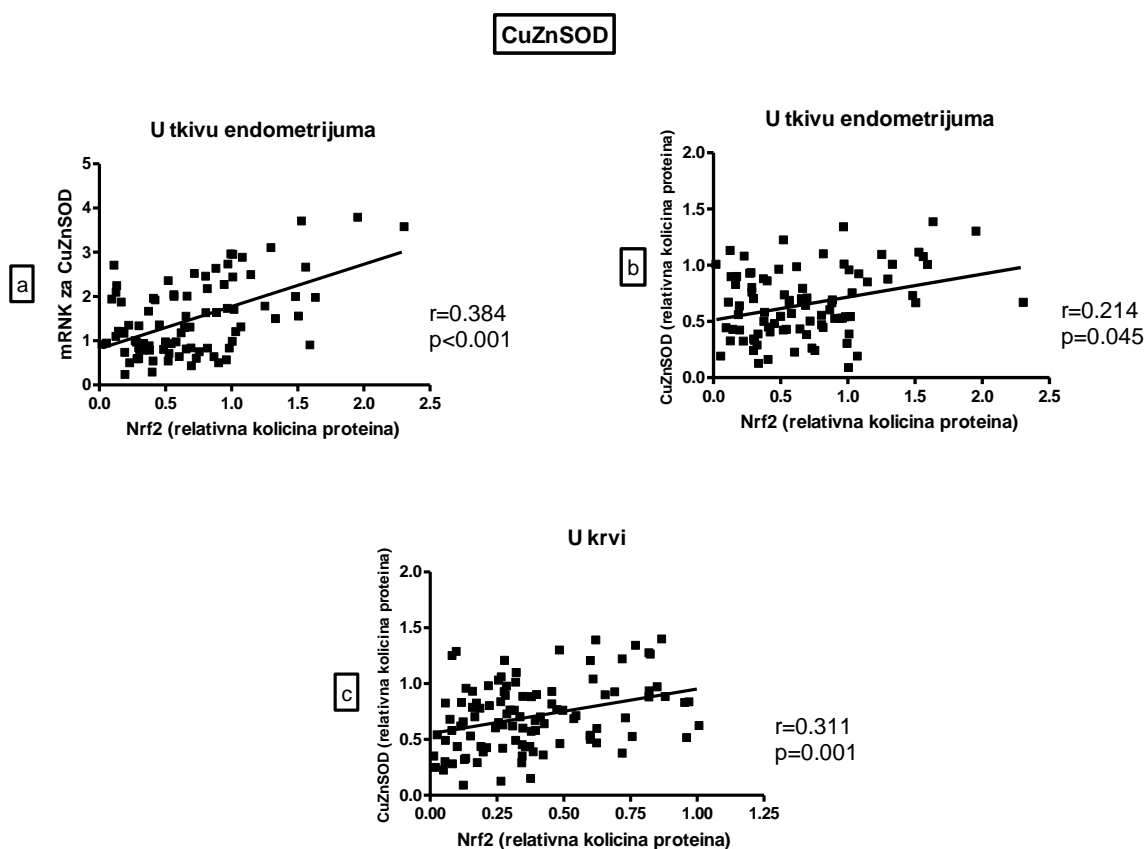
Tabela 17. Statističke značajnosti razlika relativnih količina Nrf2 proteina u krvi kontrolnih pacijentkinja (K) i pacijentkinja sa dijagnozama: polypus endometri (PE), uterus myomatosus (UM), hyperplasia simplex (SH), hyperplasia complex (CH) i adenocarcinoma endometri (ACE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test). Podvučena p-vrednost prema Dunn post hoc testu nije statistički značajna.

Relativna količina Nrf2 proteina u krvi	K (n=15)	PE (n=18)	UM (n=12)	SH (n=31)	CH (n=22)	ACE (n=5)
K		0.1870	<u>0.0429</u> *	$p < 0.0001$ ***	0.0002 ***	0.0022 **
PE			0.3855	0.0015 **	<u>0.0024</u> **	0.0065 **
UM				<u>0.0192</u> *	<u>0.0417</u> *	<u>0.0177</u> *
SH					0.6846	0.2343
CH						0.1602

4.4. KORELACIJA TRANSKRIPCIONOG FAKTORA Nrf2 I AOE

4.4.1. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i CuZnSOD

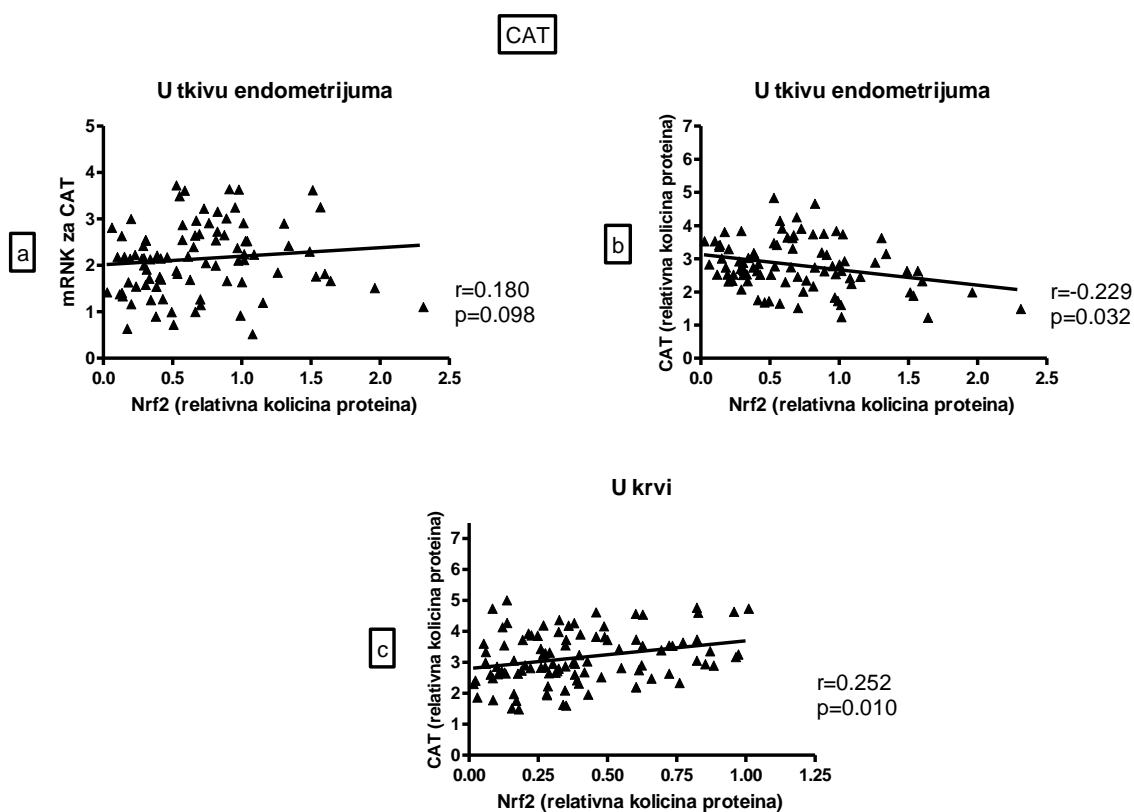
Analiza odnosa (Spearman-ova korelacija) transkripcionog faktora Nrf2 i CuZnSOD prikazana je na slici 22. Rezultati ove analize pokazuju da je u endometijumu pacijentkinja sa patohistološkim promenama uterusa (n=88) nivo Nrf2 proteina pozitivno korelisan sa nivoom CuZnSOD mRNK (grafikon a; $r=0.384$, $p<0.001$), kao i sa nivoom CuZnSOD proteina (grafikon b; $r=0.214$, $p=0.045$). Pozitivna korelacija između nivoa Nrf2 proteina i CuZnSOD proteina zabeležena je i u krvi ispitivanih pacijentkinja (grafikon c; $n=103$; $r=0.311$, $p=0.001$).



Slika 22. Spearmanova korelacija i linearna regresija nivoa Nrf2 proteina i: a) nivoa mRNK za CuZnSOD u tkivu endometrijuma b) nivoa CuZnSOD proteina u tkivu endometrijuma, c) nivoa CuZnSOD proteina u krvi (r –Spearmanov koeficijent; p - p vrednost za Srearmanov keoficijent).

4.4.2. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i CAT

Rezultati Spearman-ove korelacije transkripcionog faktora Nrf2 i katalaze prikazani su na slici 23. Na grafikonima a) i b) ove slike se vidi da u endometriju pacijentkinja sa patohistološkim promenama uterusa (n=88) nivo Nrf2 proteina nije korelisan sa nivoom CAT mRNK ($r=0.180$, $p=0.098$), ali je negativno korelisan sa nivoom CAT proteina ($r=-0.229$, $p=0.032$). U krvi ispitanica obuhvaćenih ovim eksperimentom (n=103) zabeležena je pozitivna korelacija Nrf2 i CAT proteina (grafikon c; $r=0.252$, $p=0.010$).

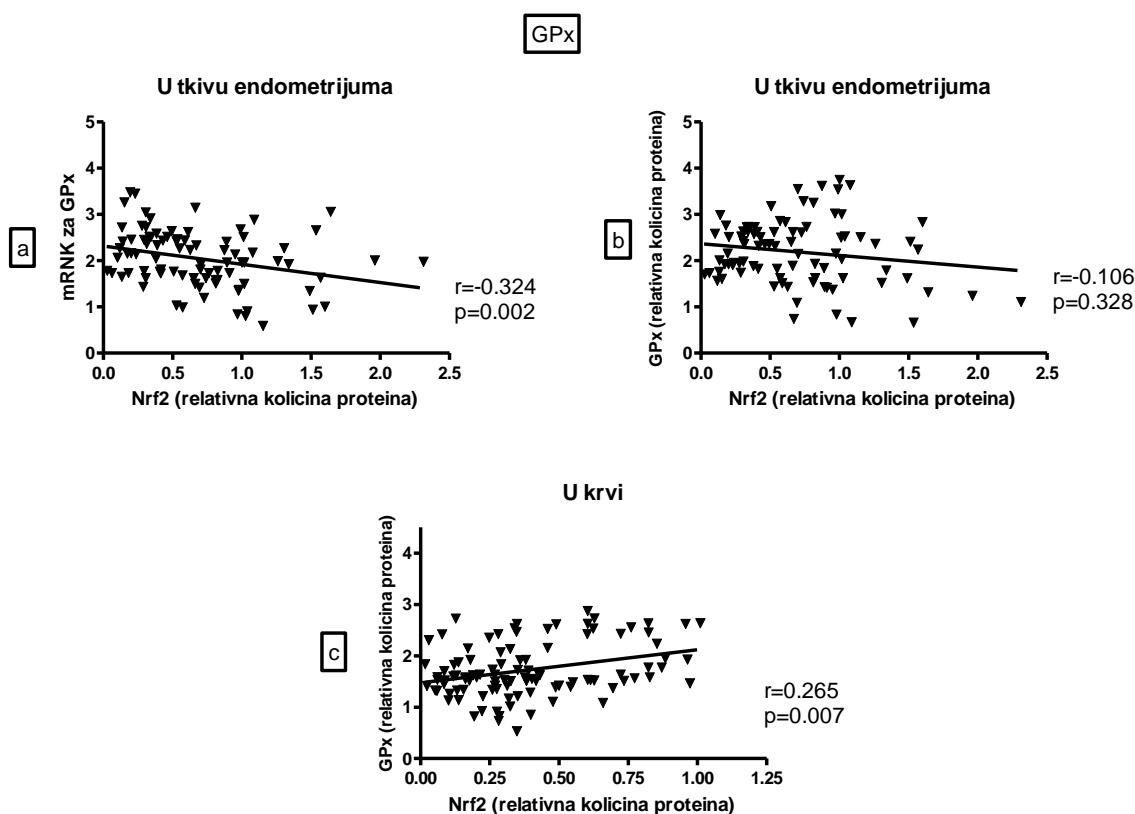


Slika 23. Spearmanova korelacija i linearna regresija nivoa Nrf2 proteina i: a) nivoa mRNK za CAT u tkivu endometrijuma b) nivoa CAT proteina u tkivu endometrijuma i c) nivoa CAT proteina u krvi (r – Spearmanov koeficijent; p – vrednost za Spearmanov koeficijent).

4.4.3. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i GPx

Parametri korelisanosti (Spearman-ova korelacija) relativne količine Nrf2 proteina sa promenama nivoa GPx proteina u endometriju pacijentkinja sa različitim formama transformisanog uterusa (n=88) prikazani su na grafikonima a) i b) na slici 24. Prikazani parametri pokazuju da je Nrf2 u tkivu endometrija negativno korelisan sa nivoom GPx mRNK ($r=-0.324$, $p=0.002$), a nije statistički značajno korelisan sa nivoom GPx proteina ($r=-0.106$, $p=0.328$).

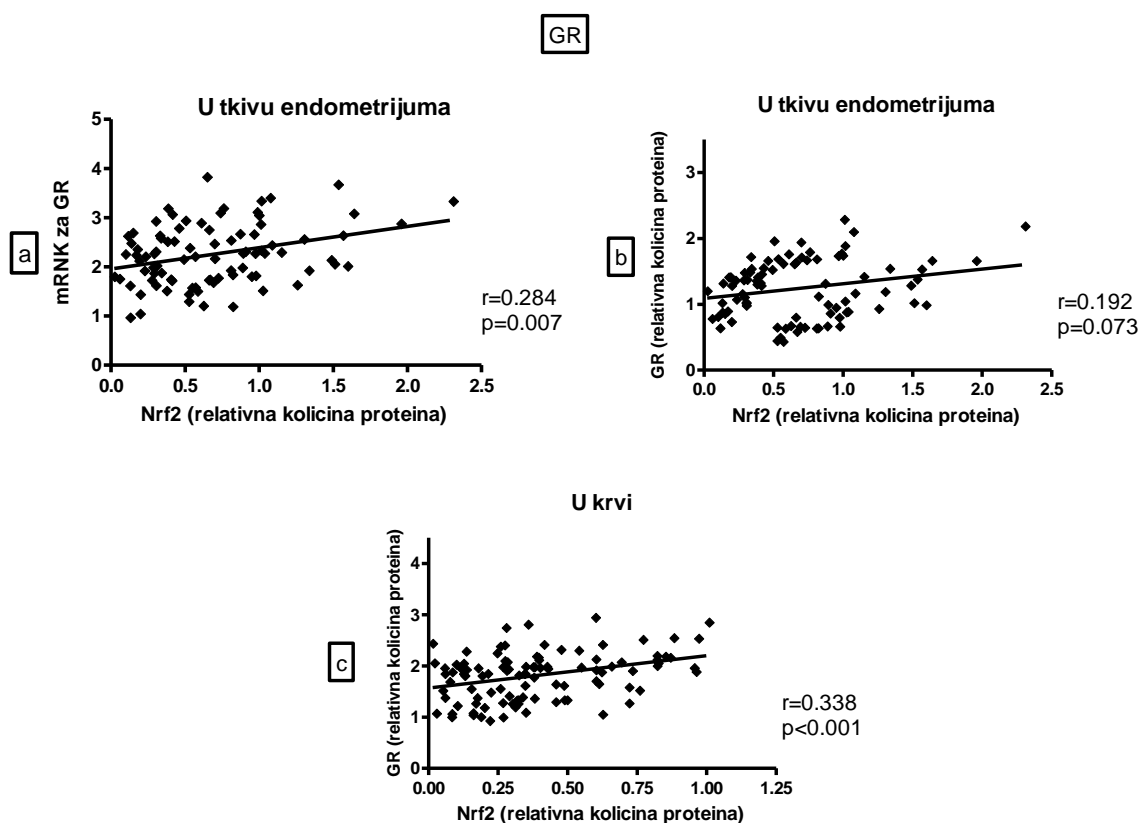
Za razliku od endometrija, u krvi ispitivanih pacijentkinja (n=103) je zabeležena pozitivna korelacija Nrf2 i nivoa GPx proteina (grafikon c; $r=0.265$, $p=0.007$).



Slika 24. Spearmanova korelacija i linearna regresija nivoa Nrf2 proteina i: a) nivoa mRNK za GPx u tkivu endometrija b) nivoa GPx proteina u tkivu endometrija i c) nivoa GPx proteina u krvi (r – Spearmanov koeficijent; p – p vrednost za Spearmanov koeficijent).

4.4.4. Korelacija transkripcionog faktora Nrf2 i GR

Analiza korelacije transkripcionog faktora Nrf2 i glutation reduktaze prikazana je na slici 25. Rezultati ove analize pokazuju da je u endometijumu ispitivanih ginekoloških pacijentkinja (n=88) nivo Nrf2 proteina značajno pozitivno korelisan sa nivoom GR mRNK (grafikon a; $r=0.284$, $p=0.007$), a da pozitivna korelacija između nivoa Nrf2 i GR proteina (grafikon b) nije statistički značajna ($r=0.192$, $p=0.073$). Na grafikonu c) se vidi da je značajna pozitivna korelacija između Nrf2 i GR proteina zabeležena i u krvi ispitivanih pacijentkinja (n=103; $r=0.338$, $p<0.001$).



Slika 25. Spearmanova korelacija i linearna regresija nivoa Nrf2 proteina i: a) nivoa mRNK za GR u tkivu endometrijuma b) nivoa GR proteina u tkivu endometrijuma i c) nivoa GR proteina u krvi (r – Spearmanov koeficijent; p – p vrednost za Spearmanov koeficijent).

5. DISKUSIJA

Razvoj kancera je višestepeni proces u toku koga kumulativno dolazi do niza promena u ćelijskoj strukturi i funkciji. Iako su mnogi od procesa povezanih sa kancerogeneom (replikacija, angiogeneza, apoptoza, metastaza itd.) pojedinačno intenzivno izučavani, molekularni mehanizmi koji ih povezuju i koji leže u osnovi kompleksne biologije humanih kancera još uvek su nedovoljno poznati. Savremena istraživanja su pokazala da su ROS i AOE koji učestvuju u regulaciji nivoa ROS-a molekuli sa važnom ulogom u inicijaciji, promociji i progresiji kancera. Poznato je da antioksidativni status ćelije utiče na mnoge genetske i epigenetske promene koje nastaju u toku kancerogeneze. Kako su epigenetske promene (promene u ekspresiji gena bez izmene u DNK sekvenci, npr. DNK metilacija i modifikacija histona) potencijalno reverzibilne (Ballestar i Esteller 2005), smatra se da bolje razumevanje ovih procesa može omogućiti otkrivanje i intervenciju u ranim fazama kancerogeneze i time doprineti boljoj prognozi ove bolesti.

ROS i AOE mogu na više nivoa i kroz različite mehanizme uticati na nastanak i razvoj kancera, što je detaljnije obrađeno u uvodnim poglavljima ove doktorske disertacije. Sa druge strane, ROS i AOE imaju značajnu ulogu u ženskim reproduktivnim organima u kojima je održavanje redoks homeostaze važno za očuvanje fizioloških funkcija u reprodukciji, kao i u stanjima kao što su neplodnost, endometriozna, komplikacije u trudnoći, embriopatije itd. Kako je fina regulacija redoks ravnoteže neophodna i za hormonsku signalizaciju, ovulaciju, formiranje žutog tela, luteolizu i mnoge druge fiziološke procese kojima se ostvaruje reproduktivna funkcija ženskih polnih organa, očigledna je potreba da se pažljivije sagledaju i detaljnije prouče mehanizmi nastanka i posledice promena u redoks homeostazi, kao i da se uočene promene korelišu sa nastankom i razvojem oboljenja reproduktivnih organa. Prema Agarwalu (Agarwal, Gupta i sar. 2005) ROS u ženskom reproduktivnom traktu predstavljaju „mač sa dve oštrice“. Oni su važni signalni molekuli u mnogim fiziološkim mehanizmima, ali imaju i značajnu ulogu u patološkim procesima u ovom osetljivom tkivu. Kako se balans ROS održava obezbeđivanjem adekvatne količine i aktivnosti antioksidanata, pojedinačni nivoi AOE kao i totalni antioksidativni kapacitet

predstavljaju važne parametre u proceni oksidativnog stresa i njegovoj ulozi u nastanku i razvoju bolesti reproduktivnih organa.

U dostupnoj literaturi je malo podataka o vezi između antioksidativnog statusa i pojedinih faza kancerogeneze, a kada je reč o endometrijumu takvih podataka gotovo da nema. Zato je, osim direktnog praćenja ekspresije AOE u krvi i tkivu pacijentkinja sa različitim fazama transformacije endometrijalnog tkiva, cilj ove doktorske disertacije i ispitivanje značaja transkripcionog faktora Nrf2 u regulaciji ekspresije AOE, kao i bolje razumevanje potencijalnog značaja uočenih promena za sam proces kancerogeneze.

Iako zbog svoje veze sa antioksidativnim, detoksifikacionim i kancerogenim mehanizmima Nrf2 u poslednjoj deceniji zaokuplja sve veću pažnju naučne javnosti, u dosadašnjoj literaturi nisu objavljeni klinički podaci o ekspresiji ovog transkripcionog faktora kod pacijentkinja sa adenokarcinomom endometrijuma i njegovim premalignim transformacijama. Slično istraživanje je, međutim, obavljeno na pacijentkinjama sa seroznim karcinomom, znatno ređim oblikom kancera endometrijuma koga karakterišu veća agresivnost i dosta lošija prognoza. Rezultati histohemijske analize u tom istraživanju su pokazala izrazito visoku i difuznu citoplazmatsku ekspresiju Nrf2 molekula, kako u ćelijama seroznog kancera, tako i u njegovim ranim i pre-kanceroznim formama (Chen, Yi i sar. 2011). Autori te studije smatraju da Nrf2 može biti koristan dijagnostički marker u proceni tipa endometrijalnog kancera i njegovih prekursorских lezija, kao i da promene u ekspresiji Nrf2 predstavljaju jedan od ranih molekulskih događaja u neoplastičnoj transformaciji seroznog karcinoma. Prema ovim autorima, povećana ekspresija Nrf2 je, zbog poznatog uticaja na povećanje hemorezistencije, bar delimično odgovorna za biološku agresivnost i nepovoljan klinički ishod ovog tipa kancera. Rezultati Chena i saradnika pružaju i potencijalne mogućnosti za nove terapijske intervencije kojima bi se mogla smanjiti hemorezistencija ćelija kancera. Ove intervencije podrazumevale bi aplikaciju Nrf2 inhibitora ili primenu neke druge strategije kojom bi se moglo postići smanjenje ekspresije tog transkripcionog faktora i time uticati na brojne „nizvodne“ ćelijske parametre koje on reguliše.

Kako se zna da su mehanizmi nastanka, razvoja, kao i prognoze adenokarcinoma (karcinom endometrijuma tipa I) i seroznog karcinoma (karcinom endometrijuma tipa II) značajno različiti, ne čudi ni različitost "obrazaca" promena nivoa Nrf2 u ova dva tipa maligno transformisanog endometrijuma. Naime, rezultati ove doktorske

disertacije ne pokazuju da se nivo Nrf2 molekula u endometriju menja sinhronizovano i kooordinisano sa povećanjem stepena maligniteta ovog tkiva. Prema već utvrđenoj tipizaciji po kojoj polipe i miome smatramo benignim, a hiperplaziju simpleks i kompleks premalignim transformacijama u stepenovanom razvoju adenokarcinoma, primetno je da se nivo Nrf2 proteina u endometriju menja u zavisnosti od faze njegove transformacije. Ako nivo Nrf2 u grupama pacijenata sa dijagnostikovanim *polypus endometrii* i *uterus myomatosus* smatramo kontrolnim vrednostima, na slici 16. možemo uočiti da ekspresija ovog transkripcionog faktora značajno opada u grupama sa premalignim dijagnozama (*hyperplasia simplex* i *hyperplasia complex*), a raste u već transformisanom tkivu adenokarcinoma (*adenocarcinoma endometrii*).

Zapažene razlike u nivoima ekspresije Nrf2 molekula u različitim tipovima transformisanog endometrija imaju svoj biološki smisao u različitim ulogama koje ovaj transkripcioni faktor ispoljava u različitim patofiziološkim stanjima ćelije. Poznato je da je osnovna fiziološka uloga Nrf2 da u prooksidativnim uslovima aktivira protektivne mehanizme i indukuje aktivaciju AO sistema kako bi sprečio oštećenje ćelije (Niture, Kaspar i sar. 2010; Zhang, Pi i sar. 2010). Aktivacija Nrf2 predstavlja mehanizam zaštite u mnogim hroničnim bolestima uključujući kardiovaskularne bolesti, upalu pluća, dijabetične neuropatije i nefropatije (Li, Ichikawa i sar. 2009; de Haan 2011; Negi, Kumar i sar. 2011; Reddy, Potteti i sar. 2011). Kod kancera, međutim, Nrf2 ima dvostruku ulogu. Osim dobro poznate protektivne funkcije, novija istraživanja su otkrila i "tamnu stranu" Nrf2 molekula (Lau, Villeneuve i sar. 2008; Wang, Sun i sar. 2008). Identifikovane su brojne mutacije i promene nivoa ekspresije Nrf2 u mnogim kancerima (Padmanabhan, Tong i sar. 2006; Nioi i Nguyen 2007; Kim, Oh i sar. 2010) uključujući i endometrijalni (Jiang, Chen i sar. 2010). Na humanim kancerima je pokazano da geni koji povećavaju ekspresiju Nrf2 mogu pojačati Nrf2-zavisni mehanizam zaštite, intenzivirajući na taj način rast ćelija kancera i obezbeđujući im hemorezistenciju na veliki broj hemoterapijskih lekova (Cho, Manandhar i sar. 2008; Wang, Sun i sar. 2008). Grubo posmatrano, ova dva naizgled oprečna efekta Nrf2 se zasnivaju na istom principu koji bi se ukratko mogao opisati kao "povećavanje otpornosti" ćelije. Suštinska razlika je zapravo uslovljena vrstom ćelije kojoj Nrf2 "povećava otpornost". Tako, ako je povećana ekspresija Nrf2 uočena kod zdravih ćelija

govorimo o "antikancerogenom" efektu Nrf2 (povećana je otpornost ćelije na nastanak premalignih i malignih lezija). Ako pak govorimo o povećanju ekspresije Nrf2 u ćelijama kancera, efekat je povećanje hemorezistencije (povećanje otpornosti ćelije na hemoterapeutik).

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da bi smanjeni nivo transkripcionog faktora Nrf2, uočen u ovom istraživanju u endometrijumu pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks, mogao biti uzrok smanjenog kapaciteta detoksifikacije i antioksidativne zaštite ovih ćelija. Takva prooksidativna sredina svakako pogoduje nastanku strukturnih i funkcionalnih oštećenja ćelije, a time i formiranju početnih, premalignih transformacija endometrijuma. Sličan rezultat i njegovo tumačenje mogu se naći u radu Frohlicha 2008 (Frohlich, McCabe i sar. 2008), koji je na ćelijskoj liniji kancera prostate pokazao da redukcija ili eliminacija ekspresije Nrf2 dovode do smanjenja ekspresije antioksidativnih enzima, pa tako i do povećanja unutarćelijske koncentracije ROS-a. To ima za posledicu oksidativno oštećenje različitih struktura u ćeliji, pa i DNK, čime se indukuje stvaranje mutagenih lezija koje, locirane na određenom mestu u genomu, mogu rezultovati inicijacijom i promocijom kancera (Kwak, Wakabayashi i sar. 2004).

Smanjenje detoksifikacije i antioksidativne zaštite nisu, međutim, jedini mehanizmi kojima smanjeni nivo Nrf2 može indukovati kancerogenezu. Zbog antiinflamatornog svojstva Nrf2, smanjenje nivoa ovog transkripcionog faktora može dovesti do hroničnih inflamatornih procesa i patoloških promena u ćeliji (Hu, Saw i sar. 2010). Novija istraživanja pokazuju da u nekim tipovima kancera inflamatorni uslovi predhode malignim promenama, dok u nekim drugim tipovima onkogene promene indukuju inflamatornu mikrosredinu koja promovise razvoj tumora (Mantovani, Allavena i sar. 2008). Mada veza između kancera i inflamatornih procesa nije potpuno razjašnjena na molekulskom nivou, zna se da, bez obzira na poreklo, "tinjajuće" upale doprinose nastanku tumora. Inflamacija pomaže širenju i opstanku malignih ćelija, promovise angiogenezu i metastazu, podriiva adaptivne imune procese i menja odgovor ćelije na hormone i hemoterapijske agense.

O kakvom god da se mahnizmu (ili mehanizmima) radi, uloga smanjenja nivoa transkripcionog faktora Nrf2 u promociji kancerogeneze je nedvosmisleno pokazana na mnogim tipovima kancera. Osburn (Osburn, Karim i sar. 2007) i Khor (Khor, Huang i

sar. 2006; Khor, Huang i sar. 2008) su ispitivali efekat Nrf2 genotipa na podložnost miševa hemijskoj indukciji kolorektalnog kancera. Ovi autori su pokazali da Nrf2-/- miševi imaju veću incidencu tumora i zaključili da se aktivnošću Nrf2 postiže značajno smanjenje koncentracije ROS-a kao potencijalnih mutagena, te da je Nrf2 efektan modifikator inflamacijom izazvane kolorektalne kancerogeneze. Slično kolorektalnom kanceru, veza između smanjenog nivoa Nrf2 i kancerogeneze pokazana je i kod kancera pluća (Aoki, Sato i sar. 2001), jetre (Umemura, Kuroiwa i sar. 2006), kože (Xu, Huang i sar. 2006), mokraćne bešike i neoplazije želuca (Ramos-Gomez, Kwak i sar. 2001). Na osnovu svega iznetog može se zaključiti da smanjenje nivoa Nrf2 u endometriju, detektovano u ovom istraživanju kod pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i kompleks, može bar delimično biti odgovorno za smanjenje protektivnih kapaciteta ćelije, što svakako pogoduje malignoj transformaciji odnosno razvoju adenokarcinoma.

Što se tiče već diferenciranog adenokarcinoma endometrija, nivo transkripcionog faktora Nrf2 je u tom tkivu značajno povećan ne samo u odnosu na grupe sa premalignim hiperplastičnim transformacijama (SH i CH), nego i u poređenju sa kontrolnim grupama pacijentkinja sa polipom i miomom (PE i UM) (tabela 12). Ovakav rezultat je u skladu sa brojnim literaturnim podacima koji pokazuju da je povećanje nivoa Nrf2 detektovano u mnogim vrstama uznapredovalih kancera (Singh, Boldin-Adamsky i sar. 2008; Arlt, Bauer i sar. 2009; Hong, Kang i sar. 2010). Iako postoje i kanceri kod kojih nije zabeleženo povećanje ekspresije Nrf2, kao što je to slučaj sa kancerom prostate (Frohlich, McCabe i sar. 2008), promena regulacije ekspresije ovog transkripcionog faktora smatra se jednim od ključnih događaja u kancerogenezi. Fiziološki posmatrano, razvoj i opstanak tumora zahteva sticanje novih osobina njegovih ćelija. Te osobine uključuju sposobnost autonomnog rasta, izbegavanje apoptoze, smanjenu osetljivost na signale za zaustavljanje rasta, sticanje invazivnih sposobnosti, neograničenu mogućnost replikacije i obezbeđivanje dovoljnog dotoka krvi (Hanahan i Weinberg 2000). Tokom promocije tumora dolazi do pojačane aktivnosti mitohondrija i proizvodnje ATP-a, procesa koji su neophodni za rast i deobu ćelija. Time se, međutim, povećava produkcija ROS-a koja, ako nije praćena povećanom produkcijom antioksidanata, može dovesti do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i apoptoze. Zato ne čudi podatak da Nrf2, koji aktivira antioksidativni odgovor ćelije ima izraziti antiapoptotski efekat. Osim toga, ovaj transkripcioni faktor reguliše i

ekspresiju nekoliko faktora rasta, kao i receptora faktora rasta (Cho, Reddy i sar. 2005; Reddy, Kleeberger i sar. 2007), tako da njegova aktivacija može stimulisati proliferaciju određenih tipova ćelija. Ovakva hipoteza podržana je eksperimentalnim podacima koji pokazuju da je normalna progresija ćelijskog ciklusa narušena u *Nrf2*^{-/-} epitelijalnim ćelijama miša (Reddy, Kleeberger i sar. 2008), kao i zapažanjem da Nrf2-deficitne (knockdown) plućne ćelije A549 imaju značajno smanjenu ćelijsku proliferaciju i izražen poremećaj rasta (Singh, Boldin-Adamsky i sar. 2008).

Povećana ekspresija Nrf2 blokira proapoptičke signale ne samo neutrališući ROS, nego i inhibirajući dejstvo p53 proteina (You, Nam i sar. 2011). Inhibicijom p53 proteina Nrf2 onemogućava kontrolu ćelijskog ciklusa koja bi u slučaju oštećenja ćelije rezultovala njenom reparacijom, ili indukcijom apoptoze. Blokirajući ove funkcije p53 proteina, svako povećanje ekspresije Nrf2 obezbeđuje ćelijama kancera dodatni potencijal za povećanje agresivnosti u rastu i razvoju. Povezanost ekspresije Nrf2 sa agresivnošću i hemorezistencijom kancera već je zabeležena na tkivu seroznog karcinoma endometrijuma (Jiang, Chen i sar. 2010). Rezultati ovih histohemijskih ispitivanja su pokazali da je ekspresija Nrf2 u agresivnijem, seroznom karcinomu izraženija od ekspresije ovog transkripcionog faktora kod hiperplazije i adenokarcinoma endometrijuma. Osim toga, ovi autori su pokazali da SPEC-2 ćelijska linija, dobijena iz ćelija seroznog karcinoma, ima veću ekspresiju Nrf2 i rezistentnija je na toksične efekte cisplatine i paclitaxel-a od Ishikawa ćelijske linije, koja je dobijena iz ćelija adenokarcinoma. Takođe, inhibicija ekspresije Nrf2 značajno smanjuje hemorezistenciju SPEC-2, a ima ograničen efekat na osetljivost Ishikawa ćelija, što ukazuje na značajnu ulogu koju Nrf2 ima u fenomenima agresivnosti i rezistencije kancera.

Iz svega navedenog se može zaključiti da porast nivoa Nrf2 proteina u adenokarcinomu predstavlja tipičnu sliku maligno transformisanog tkiva u kome povećanje ekspresije transkripcionog faktora Nrf2 dovodi do niza promena koje značajno menjaju ćelijsku signalizaciju i time indukuju, ili bar doprinose promenama u rastu, proliferaciji i agresivnosti ćelija kancera.

Osim nivoa Nrf2 proteina, u eksperimentima obuhvaćenim ovom doktorskom disertacijom određivane su i promene količine mRNK ovog transkripcionog faktora u endometrijalnom tkivu pacijentkinja svih pet ispitivanih grupa. Rezultati PCR analize su

pokazali da je u odnosu na benigno transformisano tkivo (polipi i miomi), nivo Nrf2 mRNA u premalignim (hiperplazije) i malignim (adenokarcinom) transformacijama endometrijuma značajno snižen (slika 11; tabela 7). Mehanizam regulacije transkripcije Nrf2 je još uvek nedovoljno razjašnjen. Takođe je teško u potpunosti sagledati njegov fiziološki efekat, budući da je poznato da se glavna regulacija ekspresije Nrf2 odvija na posttranslacionom nivou. Ipak, postojanje transkripcione regulacije Nrf2 je već pokazano na nekim tipovima ćelija. Na mišjim hepatoma ćelijama na primer, AHR (aryl hydrocarbon receptor - takođe transkripcioni faktor uključen u procese detoksifikacije) se vezuje za XRE (xenobiotic response element) u promotoru Nrf2 gena i time direktno utiče na njegovu transkripciju. Rezultati ovih istraživanja pozicioniraju Nrf2 nizvodno od AHR-XRE "dogadjaja" u ćelijskoj signalizaciji, što je važan podatak, budući da se direktnom regulacijom Nrf2 od strane AHR postiže koordinisana aktivacija detoksifikacionih enzima koje ova dva transkripciona faktora kontrolišu (Miao, Hu i sar. 2005). Poređenje DNK sekvenci promotora Nrf2 kod miša, pacova i čoveka je pokazalo da uprkos niskom stepenu homologije ovih regiona kod glodara i čoveka, sva tri promotora sadrže konzervirane višestruke kopije XRE sekvenci, što ukazuje na značaj koji XRE ima u regulaciji genske ekspresije Nrf2. U keratinocitima murine Kwak-a i saradnici su pokazali da Nrf2 može i sam da reguliše sopstvenu ekspresiju vezujući se u svom promotoru za elemente slične ARE (Kwak, Itoh i sar. 2002). Najnovija istraživanja pokazuju da i neki onkogeni (K-Ras^{G12D}, B-Raf^{V619E} i Myc^{ERT2}) mogu uticati na transkripciju Nrf2 molekula (DeNicola, Karreth i sar. 2011). Takođe, Yu i saradnici su na TRAMP (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate) modelu pokazali da DNK hipermetilacija i deacetilacija histona dovode do "utišavanja" Nrf2 gena (Yu, Khor i sar. 2010).

Na osnovu dostupnih podataka o mogućim mehanizmima regulacije transkripcije može se pretpostaviti da je smanjena transkripcija Nrf2 gena, detektovana u ovom istraživanju u svim ispitivanim grupama premaligno i maligno transformisanog endometrijuma najverovatnije posledica hipermetilacije, jer je iz literature već poznata veza između oksidativnog stresa i hipermetilacije gena čije promene u transkripciji mogu indukovati kancerogenezu (Franco, Schoneveld i sar. 2008). Potvrda ovih pretpostavki svakako zahteva dalja i opsežnija ispitivanja koja bi doprinela boljem

razumevanju složenih mehanizama regulacije transkripcije Nrf2 molekula, a nisu mogla biti obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom.

Ono što u dosada prikazanim rezultatima ove doktorske disertacije svakako treba komentarisati jesu odnosi između promena nivoa mRNK i nivoa Nrf2 proteina u ispitivanim tipovima transformisanog endometrijuma. Nivoi Nrf2 mRNK (slika 11; tabela 7) i Nrf2 proteina (slika 16; tabela 12) među samim "kontrolnim" grupama ne pokazuju značajne razlike, ali njihova vrednost značajno i sinhronizovano opada u obe premaligno transformisane grupe endometrijuma. Na osnovu toga se može zaključiti da je ekspresija Nrf2 u benignim i premaligim stanjima regulisana, ili makar usaglašena se nivoom transkripcije njegovog gena, odnosno da u ove četiri ispitivane grupe promene količine Nrf2 proteina prate trend promena u količini njegove mRNK. Kod adenokarcinoma endometrijuma, međutim, dolazi do očigledne disproporcije u promeni ova dva parametra. U odnosu na kontrolne grupe, količina Nrf2 mRNK u ovom tkivu opada, ali se istovremeno uočava značajan porast nivoa Nrf2 proteina. Takav odnos ukazuje na činjenicu da količina Nrf2 proteina u tkivu adenokarcinoma nije direktno regulisana transkripcijom njegovog gena, već nekim drugim posttranskripcionim događajem. Iz literature je poznato nekoliko mehanizama kojima bi se mogao objasniti porast nivoa Nrf2 proteina nezavisno od količine njegove mRNK. Prvi mehanizam se zasniva na mutacijama Nrf2 ili Keap1 molekula, koje su identifikovane u mnogim tipovima kancera (Nioi i Nguyen 2007; Ohta, Iijima i sar. 2008; Shibata, Kokubu i sar. 2008; Kim, Oh i sar. 2010). Drugi mogući uzrok konstitutivne stabilizacije Nrf2 molekula je akumulacija proteina koji ometaju Keap1 – Nrf2 interakcije, npr. p62 i p21 (Chen, Sun i sar. 2009; Lau, Wang i sar. 2010), a treći smanjena ekspresija Keap1 uzrokovana metilacijom promotora Keap1 gena (Wang, An i sar. 2008). Svaki od ovih mehanizama dovodi do smetnji u pravilnom vezivanju Keap1 za Nrf2, čime se sprečava ubikitinizacija i proteozomalna razgradnja Nrf2 molekula, kojima se u normalnoj ćeliji ovaj transkripcioni faktor održava na fiziološkom nivou. Inhibicijom proteozomalne razgradnje Nrf2 svakako je moguće postići povećanje nivoa ovog proteina nezavisno od količine njegove mRNK, čime bi se mogli objasniti naizgled nelogični rezultati ekspresije Nrf2 u adenokarcinomu endometrijuma.

Što se tiče količine Nrf2 proteina u cirkulaciji ispitivanih pacijentkinja, zapaženo je generalno smanjenje nivoa ovog transkripcionog faktora u grupama žena sa benigno,

premaligno i maligno transformisanim endometrijumom u odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja (slika 21; tabela 17). Kada se ovi rezultati nivoa Nrf2 proteina u cirkulaciji uporede istim rezultatima dobijenim u tkivu endometrijuma (slika 16; tabela 12) može se primetiti da, u odnosu na grupe žena sa polipom i miomom, kod pacijentkinja sa premaligim transformacijama dolazi do sniženja nivoa Nrf2 proteina kako u cirkulaciji, tako i u endometrijalnom tkivu. Kod pacijentkinja sa već diferenciranim adenokarcinomom, međutim, u cirkulaciji je takođe zabeleženo smanjenje količine Nrf2 proteina, dok u tkivu endometrijuma dolazi do značajnog porasta nivoa ovog transkripcionog faktora. Ove razlike u tendenciji promena nivoa Nrf2 u krvi i tkivu tokom razvoja adenokarcinoma mogu se objasniti fiziološkim promenama koje se dešavaju tokom kancerogeneze. Već je ranije objašnjeno da povećanje ekspresije Nrf2 favorizuje opstanak i razvoj malignog tkiva jer povećava njegovu otpornost, invazivnost i rezistenciju. Na nivou organizma, međutim, maligne transformacije predstavljaju dugotrajan antioksidativni stres. On dovodi do iscrpljivanja AO kapaciteta organizma što se u cirkulaciji može detektovati kao značajan pad ukupnog antioksidativnog statusa (Manju, Kalaivani Sailaja i sar. 2002; Kasapovic, Pejic i sar. 2008), pa i nivoa Nrf2 proteina, kao njegovog najznačajnijeg transkripcionog regulatora.

Aktivnost i fiziološki značaj superoksid dismutaza u ćelijama kancera predmet su intenzivnih istraživanja u poslednjih nekoliko decenija. Većina tih studija bazirana je na detekciji razlika u ekspresiji i aktivnosti SOD između malignih i normalnih ćelija. Rezultati istraživanja pokazuju da se promene enzimske aktivnosti ovog enzima javljaju kako u tkivu tako i u serumu pacijenata sa različitim tipovima kancera (Nakada, Koike i sar. 1987; Iwase, Nagasaka i sar. 1993; Sasano, Mizorogi i sar. 1999). Međutim, dobijeni podaci su kontraverzni i međusobno većinom neuporedivi jer vrednosti značajno variraju u zavisnosti od vrste organizma, tkiva i eksperimentalnih uslova. Pokazano je npr. da u tkivu tumora SOD aktivnost opada kod kancera debelog creva (Öztürk, Karaayvaz i sar. 1997; Van Driel, Lyon i sar. 1997), bubrega (Durak, Bedük i sar. 1997), grlića materice (Ahmed, Fayed i sar. 1999) i hepatocelularnog karcinoma (Liaw, Lee i sar. 1997). Nasuprot tome, aktivnost ovog enzima raste u ćelijama karcinoma jednjaka, želuca i debelog creva (Izutani, Asano i sar. 1998; Janssen, Bosman i sar. 1998). Nepostojanje jedinstvenog trenda u objavljenim rezultatima moglo bi biti posledica tkivnih specifičnosti, ili veze koja postoji između nivoa SOD i

kliničko-patoloških nalaza određenog tipa karcinoma (Janssen, Bosman i sar. 1998; Kurokawa, Sakimoto i sar. 1998). Kada je reč o vezi SOD i kancera treba istaći da je dosada najviše ispitivana, pa i najbolje objašnjena, veza između malignih tumora i MnSOD. U literaturi se mogu naći brojni podaci koji ukazuju na to da veliki broj malignih tumora ima povišen nivo MnSOD u odnosu na nemaligne progenitorske ćelije, kao i da je takav enzimski status značajno korelisan sa lošom prognozom toka bolesti. Opisani nalazi dokumentovani su kod tumora bubrega (Yang, Oberley i sar. 1987), kancera dojke (Bianchi, Bianchi i sar. 1992), raka grlića materice (Nakano, Oka i sar. 1996), tumora centralnog nervnog sistema (Cobbs, Levi i sar. 1996) i nekih tumora tiroidne žlezde (Nishida, Akai i sar. 1993). U odnosu na MnSOD, podaci o promenama nivoa CuZnSOD u različitim tipovima kancera su malobrojniji i neusklađeni. Bianchi i saradnici (Bianchi, Bianchi i sar. 1992) su pokazali da SOD aktivnost u tkivu kancera dojke pokazuje individualne varijacije, ali da generalno ovaj tip malignih ćelija ispoljava veću aktivnost CuZnSOD u odnosu na nemaligno tkivo (Bianchi, Bianchi i sar. 1992). Histochemijsko ispitivanje CuZnSOD u ćelijama kancera prostate je pokazalo da ove ćelije imaju niži nivo CuZnSOD u odnosu na nemaligne ćelije (Baker, Oberley i sar. 1997; Bostwick, Alexander i sar. 2000), a nivoi CuZnSOD mRNA i imunoreaktivnih CuZnSOD proteina u plućima ne pokazuju značajne razlike u uzorcima malignog i nemalignog tkiva (Ho, Zheng i sar. 2001).

Osim toga što su podaci o nivou CuZnSOD u malignom tkivu malobrojni, još su malobrojniji rezultati koji prate promene nivoa SOD u različitim stupnjevima kancerogeneze. Jedno od retkih je istraživanje Hubackova i saradnika (Hubackova, Vaclavikova i sar. 2012) koji su pokazali da ekspresija EcSOD kod pacijentkinja sa karcinomom dojke opada sa progresijom tumora. Suprotnu zavisnost su detektovali Satomi i saradnici (Satomi, Murakami i sar. 1995) koji su uočili da kod kolorektalnog kancera SOD aktivnost raste sa fazom progresije i menja se sa dubinom invazije.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da se nivo CuZnSOD menja u zavisnosti od stepena transformacije endometrijuma i to kako u cirkulaciji, tako i u samom endometrijalnom tkivu. Promene nivoa CuZnSOD proteina u cirkulaciji pokazuju da za razliku od grupa sa polipom i miomom koje se ne razlikuju značajno u odnosu na kontrolu, kod pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks, hiperplazijom kompleks i adenokarcinomom endometrijuma dolazi do sniženja ekspresije CuZnSOD

(slika 17; tabela 13). Smanjenje nivoa CuZnSOD proteina sa progresijom maligne transformacije moglo bi biti posledica smanjenja ekspresije ovog enzima ili rezultat povećanog oksidativnog oštećenja i proteozomalne razgradnje CuZnSOD molekula u stanju hroničnog oksidativnog stresa u kome se organizam nalazi tokom kancerogeneze. Osim toga, pokazano je da ćelije tumora imaju sposobnost da iz cirkulacije preuzmaju molekule kao što je GSH kako bi zadovoljile povećane potrebe za antioksidantima (Buzby, Mullen i sar. 1980). Smanjenje količine GSH u cirkulaciji može biti uzrok pada nivoa drugih komponenti AOS koje se ubrzano “troše” kako bi kompenzovale gubitak GSH, što bi takođe moglo doprineti sniženju nivoa AOE, pa i SOD, u cirkulaciji u toku kancerogeneze.

Što se tiče rezultata drugih autora, podaci o aktivnosti SOD u serumu pacijenata sa dijagnostikovanim tumorima su veoma kontraverzni. Pokazano je da je nivo serumske SOD povišen kod hoćkinovog limfoma (Abdel-Aziz i El-Naggar 1997), ovarijalnog kancera (Ishikawa, Yaginuma i sar. 1990) i malignog melanoma (Schadendorf, Zuberbier i sar. 1995), ali snižen kod pacijenata sa leukemijom (Schadendorf, Zuberbier i sar. 1995). Uočene razlike u promenama nivoa SOD u serumu pacijenata sa različitim tipovima malignih bolesti verovatno su posledica različitih mehanizama kancerogeneze u ovim tkivima, kao i različitih mehanizama AO zaštite kojima organizam reaguje na te promene. Takođe, kako su rezultati naših ranijih ispitivanja pokazali da i aktivnost CuZnSOD značajno opada u cirkulaciji žena sa premalignim i malignim transformacijama endometrijuma (Pejic, Kasapovic i sar. 2006), može se zaključiti da je smanjenje aktivnosti CuZnSOD u krvi ovih pacijentkinja makar delom regulisano na nivou ekspresije. Osim toga, značajna pozitivna korelacija Nrf2 i CuZnSOD proteina (slika 22; grafikon c) ukazuje da je ekspresija ove SOD izoforme regulisana nivoom transkripcionog faktora Nrf2, čime se dobija kompletniji uvid u promene i regulaciju promena nivoa krvne CuZnSOD u toku transformacije endometrijuma.

Na fiziološki značaj SOD i Nrf2, kao i na značaj povezanosti ova dva molekula ukazuje i višedecenijsko ispitivanje potencijalnih terapeutika kojima bi se moglo postići poboljšanje antioksidativnih kapaciteta organizma i tako uticati na nastanak i razvoj mnogih humanih oboljenja uključujući i kancer. Osim što su kliničke studije pokazale da primena vitamina kao što su C, E i β -karoten ne smanjuju incidencu kancera kod

ljudi (Lin, Cook i sar. 2009), pokazano je i da je teško napraviti preparat na bazi SOD. Poput ostalih proteina i enzima, SOD su generalno loš "materijal" iz razloga kao što su: moguća imunogenost, visoka cena proizvodnje, problemi sa prečišćavanjem i stabilnošću, slaba apsorpcija pri oralnoj administraciji i loše farmakokinetičke osobine (Skrzycki i Czczot 2007). Sa druge strane, uporedo sa lošim rezultatima u primeni antioksidanata, novija otkrića u oblasti biologije ćelijskog antioksidativnog sistema su dovela do razvoja koncepta "indirektnih antioksidanata". Indirektni antioksidanti su mali molekuli koji sami nemaju antioksidativna svojstva, ali su sposobni da preko transkripcionog faktora Nrf2 regulišu ekspresiju velikog broja citoprotektivnih proteina koji učestvuju u sintezi i regeneraciji direktnih antioksidanata. Smatra se da ovi Nrf2 aktivatori mogu imati značajnu ulogu u prevenciji i tretmanu širokog spektra humanih oboljenja, jer za razliku od direktnih antioksidanata koji imaju kratak poluživot, moraju se unositi često u relativno visokim dozama i mogu imati prooksidativni efekat, indirektni antioksidanti imaju dugačak poluživot, istovremeno transkripciono aktiviraju veliki broj citoprotektivnih proteina i ne pokazuju prooksidativni efekat (Dinkova-Kostova i Talalay 2008). Sve više podataka ukazuje da aktivatori Nrf2 mogu učestvovati u prevenciji kancera, reparaciji nakon inflamatornih povreda, zaštiti od toksičnosti proteina i održavanju balansiranog lipidnog metabolizma (Jung i Kwak 2010). Zbog toga je ideja kliničke primene Nrf2 molekula postala veoma atraktivna alternativa korišćenju direktnih antioksidanata kao što su vitamini i AOE, a upotreba nekoliko ispitivanih Nrf2 aktivatora je sa eksperimenata na životinjama napredovala do humanih kliničkih testova. Za sada najznačajniji su Bardoksolon metil (Bardoxolone Methyl, Reata Pharmaceuticals), trenutno u drugoj od ukupno tri faze kliničkih ispitivanja (Pergola, Raskin i sar. 2011) i Protandim (LifeVantage Corp.) koji preko multiplih kinaznih puteva aktivira Nrf2 i značajno povećava nivoe CuZnSOD i CAT, a snižava markere lipidne peroksidacije u krvi (Nelson, Bose i sar. 2006). Analizirajući rezultate ovog autora, kao i ispitivanja Mc Ilwain-a i saradnika (McIlwain, Silverfield i sar. 1989), Hybertson i saradnici (Hybertson, Gao i sar. 2011) su zaključili da Protandimom indukovana aktivacija Nrf2, osim što indukuje transkripciju nekoliko stotina citoprotektivnih proteina, povećava nivo SOD 100 puta više nego intra-artikularno ubrizgavanje 15 mg prečišćenog SOD molekula, što ukazuje na

značajan klinički potencijal ovog preparata u borbi protiv bolesti izazvanih oksidativnim stresom.

U samom tkivu endometrijuma ekspresija CuZnSOD takođe pokazuje značajne razlike u zavisnosti od grupe ispitivanih pacijentkinja. Nivo mRNK kod pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks opada u odnosu na pacijentkinje sa polipom i miomom, dok je u tkivu adenokarcinoma količina mRNK povećana u odnosu na obe benigne i obe premaligne transformacije (slika 7; tabela 3). Sličan trend zabeležen je i kod promena nivoa CuZnSOD proteina (slika 12; tabela 8).

Što se tiče usklađenosti promena Nrf2 sa ekspresijom CuZnSOD, zapaža se da je sniženje relativne količine Nrf2 proteina kod hiperplazija (slika 16) u saglasnosti sa padom nivoa CuZnSOD mRNA (slika 7) i CuZnSOD proteina (slika 12) u ovim premalignim tkivima. U samom tkivu adenokarcinoma aktivacija Nrf2 verovatno predstavlja ključni događaj u indukciji ekspresije CuZnSOD, jer povećanje nivoa Nrf2 u ovom maligno transformisanom tkivu (slika 16) očigledno indukuje kako transkripciju (slika 7), tako i translaciju (slika 12) CuZnSOD.

Osim navedene sličnosti u trendu promena između grupa pacijentkinja sa različitim stepenom transformacije endometrijuma i rezultati Spearman-ove korelacije pokazuju da je količina Nrf2 proteina statistički značajno pozitivno korelisana sa količinom mRNK za CuZnSOD (slika 22; grafikon a), kao i sa količinom CuZnSOD proteina (slika 22; grafikon b).

Na osnovu svega iznetog može se zaključiti da se ekspresija CuZnSOD značajno menja u toku kancerogeneze endometrijuma, kao i da promene nivoa Nrf2 u različitim fazama transformacije ovog tkiva značajno određuju stepen promena ekspresije CuZnSOD kako na nivou transkripcije, tako i na nivou translacije.

Rezultati ove doktorske disertacije takođe daju značajan doprinos boljem razumevanju naših ranijih istraživanja koja su pokazala da promene aktivnosti CuZnSOD odstupaju od zajedničkog trenda opisanog kod ekspresije CuZnSOD i ekspresije transkripcionog faktora Nrf2. Naime, pokazano je da aktivnost CuZnSOD u tkivu endometrijuma, u odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom, opada kako kod pacijentkinja sa obe vrste hiperplazija, tako i u grupi žena sa adenokarcinomom (Pejic, Todorovic i sar. 2009). Snižena aktivnost CuZnSOD enzima u tkivu adenokarcinoma endometrijuma uprkos povećanoj količini proteina izmerenoj u

ovom tkivu najverovatnije je posledica posttranslacione modifikacije koja ne inicira proteolizu CuZnSOD, ali značajno snižava njegovu enzimsku aktivnost. U literaturi postoje brojni podaci koji opisuju postojanje i posledice posttranslacionih modifikacija SOD. Clerch i saradnici, na primer, smatraju da se smanjena aktivnost MnSOD uprkos istovremenom povećanju MnSOD mRNA u plućima pacova izloženih kiseoniku bar delimično može objasniti oksidativnim oštećenjem MnSOD molekula (Clerch, Massaro i sar. 1998). Međutim, moderne tehnike istraživanja su pokazale da posttranslacione modifikacije SOD pored odavno poznate glikacije i oksidativne modifikacije (Hodgson i Fridovich 1975; Arai, Maguchi i sar. 1987) obuhvataju i mnoge druge reakcije kojima se može promeniti aktivnost ovog enzima. Najbolje proučena je reakcija nitracije - reakcija sa reaktivnim vrstama azota kao što su peroksinitrit i azot dioksid, pri kojoj nastaje 6-nitrotriptofan. Pokazano je da tako modifikovana SOD gubi do 30% svoje aktivnosti (Yamakura, Matsumoto i sar. 2001; Yamakura, Matsumoto i sar. 2005). Alvarez i saradnici su zabeležili da CuZnSOD nakon tretmana peroksinitritom može izgubiti čak 90% aktivnosti (Alvarez, Demicheli i sar. 2004). Osim nitracije, CuZnSOD može biti modifikovana i fosforilacijom (Csar, Wilson i sar. 2001), S-glutationilacijom (Wilcox, Zhou i sar. 2009), glikacijom (Ookawara, Kawamura i sar. 1992) i usled nedostatka bakra (Harris 1992). Kakav god da je mehanizam nastanka uočenih promena, njihove posledice u kancerogenezi su još uvek nedovoljno poznate. Ono što svakako treba naglasiti je da promene nivoa CuZnSOD zabeležene u ovom istraživanju, osim direktnog antioksidativnog efekta svoj uticaj mogu ispoljiti i modulacijom brojnih signalnih puteva koji su razmatrani u uvodnim poglavljima ove doktorske disertacije.

Promene aktivnosti katalaze u kancerogenezi, mehanizam tih promena i njihov značaj za dijagnozu i tok bolesti su uprkos velikom broju istraživanja još uvek nedovoljno razjašnjeni. Rezultati nekih istraživanja pokazuju da su u normalnim ćelijama ROS prisutne u niskim koncentracijama i potiču od NADPH oksidaze, a da je nivo H_2O_2 regulisan glutationskim sistemom. Nasuprot normalnim, u tumorskim ćelijama visok nivo ROS je blizu granice citotoksičnosti i produkovan je aktivnošću mitohondrijskog respiratornog lanca, a koncentracija H_2O_2 je kontrolisana aktivnošću katalaze (Nicco, Laurent i sar. 2005). Ekspresija i aktivnost CAT su u velikom broju tumora značajno snižene u odnosu na normalne ćelije (Cobanoglu, Demir i sar. 2010) (Sato, Ito i sar. 1992; Min, Lim i sar. 2010). Poreklo ove deficijencije još uvek je

nedovoljno razjašnjeno, mada postoje pretpostavke da bi ona mogla biti posledica hipermetilacije promotora u genu za CAT, ili aktivnosti nekih transkripcionih faktora (Kwei, Finch i sar. 2004; Min, Lim i sar. 2010). Interesantno je i da je nivo CAT promenjen (povećan ili smanjen) u ćelijama kancera rezistentnim na neke hemoterapijske agense ili vodonik peroksid (Yamada, Hashinaka i sar. 1991; Kim, Lee i sar. 2001; Glorieux, Dejeans i sar. 2011).

Smanjena ekspresija CAT zabeležena je i u rezultatima ovog istraživanja. U odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom, nivo ovog enzima opada u tkivu pacijentkinja sa premalignim (hiperplazija simpleks i hiperplazija kompleks) i malignim (adenokarcinom) transformacijama endometrijuma i to kako na nivou mRNK (slika 8; tabela 4) tako i na nivou CAT proteina (slika 13; tabela 9). S obzirom da ćelije tumora proizvode povećane količine vodonik peroksida (Burdon 1995; Lim, Sun i sar. 2005) smanjeni nivo CAT u maligno transformisanom tkivu endometrijuma svakako ima za posledicu povećanje koncentracije H_2O_2 koji može indukovati invaziju i metastazu kancera (Nishikawa, Tamada i sar. 2004; Polytarchou, Hatziapostolou i sar. 2005). Povećanje H_2O_2 zbog snižene aktivnosti CAT kod premalignih promena na endometrijumu verovatno doprinosi i samom procesu maligne transformacije ovog tkiva. Pokazano je da je porast nivoa H_2O_2 povezan sa oštećenjem DNK i genetskom nestabilnošću (Benhusein, Mutch i sar. 2010; Gopalakrishnan, Low i sar. 2010), ćelijskom proliferacijom (Li, Zhao i sar. 2009) i regulacijom apoptoze (Del Bello, Paolicchi i sar. 1999), tako da značajno sniženje nivoa CAT u hiperplazijama endometrijuma može biti jedan od uzroka prelaska ćelija iz premaligne u malignu formu. Da H_2O_2 može izazvati promociju neoplastične transformacije pokazano je na nekoliko dvostepenih sistema transformacije, uključujući pacovske ćelije urotelijuma (Okamoto, Kawai i sar. 1996) i fibroblaste mišjeg embriona (Zimmerman i Cerutti 1984).

Naši ranije objavljeni rezultati pokazuju da je i aktivnost CAT snižena u endometrijumu pacijentkinja sa dijagnostikovanim hiperplazijama i adenokarcinomom (Pejic, Todorovic i sar. 2009), na osnovu čega se može zaključiti da u toku razvoja adenokarcinoma endometrijuma dolazi do sniženja ekspresije i aktivnosti CAT, kao i da su ove promene regulisane na nivou transkripcije gena koji kodira ovaj enzim.

Za razliku od samog tkiva, u cirkulaciji pacijentkinja sa različitim tipom transformacije endometrijuma zabeležen je relativno ujednačen nivo CAT proteina. Na slici 18. se može videti da se u odnosu na kontrolnu grupu pacijentkinja, količina CAT proteina u cirkulaciji ne menja značajno kod žena sa benignim i premaligim transformacijama, ali ni kod onih sa dijagnostikovanim adenokarcinomom. Ovi rezultati se razlikuju od rezultata drugih istraživanja kod kojih je snižen nivo CAT u krvi zabeležen kod pacijentkinja sa kancerom dojke (Kasapović, Pejić i sar. 2008), jajnika (Senthil, Aranganathan i sar. 2004) i grlića materice (Kolanjiappan, Manoharan i sar. 2002), što još jednom potvrđuje nepostojanje jedinstvenog mehanizma AO promena u kancerogenezi. Takođe, naši ranije objavljeni rezultati su pokazali da je aktivnost CAT povećana u cirkulaciji žena sa hiperplazijom kompleks u odnosu na kontrolnu grupu i pacijentkinje sa polipom (Pejic, Kasapovic i sar. 2006). Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da su te promene aktivnosti svakako posledica posttranslacione aktivacije CAT.

Kada govorimo o aktivnosti i ekspresiji CAT i ostalih AOE u normalnom i transformisanom tkivu, detektovane promene svakako ne treba posmatrati izolovano, jer se jedino sagledavanjem šire slike AO statusa ćelije mogu shvatiti smisao i značaj zabeleženih promena. Na primer, nekoliko istraživanja je pokazalo da povećana ekspresija SOD u ćelijama tumora može smanjiti rast tumorskih ćelija, metastaze i druge maligne osobine ćelija kancera (Yoshizaki, Mogi i sar. 1994; Kim, Rodriguez i sar. 2001; Chuang, Liu i sar. 2007). Kako SOD katalizuju konverziju O_2 u H_2O_2 , antikancerogeni efekat povećane ekspresije SOD može biti posledica smanjenog nivoa ćelijskog O_2 , ili posledica povećanja koncentracije H_2O_2 . Eksperimentalni podaci su pokazali da antikancerogeni efekat SOD može biti neutralisan povećanom ekspresijom CAT i GPx (Li, Yan i sar. 2000; Nelson, Ranganathan i sar. 2003), enzima koji razlažu H_2O_2 . Na osnovu toga se može zaključiti da je antikancerogeni efekat indukovani povećanjem ekspresije SOD zapravo posredovan porastom koncentracije H_2O_2 .

Promene ekspresije CAT i SOD prikazane u rezultatima ove doktorske disertacije takođe ukazuju na postojanje disbalansa u produkciji i neutralizaciji slobodnih radikala kod pacijentkinja sa adenokarcinomom endometrijuma. Povećana ekspresija SOD, praćena značajnim sniženjem CAT i GPx1 u malignim ćelijama endometrijuma ima za posledicu povećanje koncentracije ćelijskog H_2O_2 . Kao što je već

rečeno, povećanje H_2O_2 intenzivira oksidativni stres i može predisponirati ćeliju za dalja oštećena DNK, proliferaciju i metastaze. Sa druge strane, zbog povećane koncentracije H_2O_2 , ovaj tip kancera može biti dobar kandidat za terapijske strategije koje se zasnivaju na vodonik peroksidom indukovanoj apoptozi, a na tom mehanizmu se zasniva delovanje brojnih hemoterapijskih agenasa koji se trenutno koriste u kliničkoj praksi. Paclitaxel, Cisplatina, Arsenik trioksid i Doxorubicin su samo neki od hemoterapeutika čija je efikasnost makar delom zasnovana na povećanju ćelijske koncentracije H_2O_2 (Oral, George i sar. 1996; Simizu, Takada i sar. 1998; Han i Park 1999) i činjenici da su u odnosu na normalne, ćelije kancera podložnije ćelijskoj smrti indukovanoj H_2O_2 (Chen, McMillan-Ward i sar. 2007; Chen, Espey i sar. 2008).

Što se tiče uticaja Nrf2 na ekspresiju CAT, Spearmanova korelacija pokazuje da je u krvi nivo ovog transkripcionog faktora statistički značajno pozitivno korelisan sa nivoom katalaze (slika 23; grafikon c). U literaturi nema dostupnih podataka o uticaju Nrf2 na ekspresiju CAT u krvi ginekoloških pacijentkinja, mada je pokazano da oralno aplicirani aktivatori Nrf2 dovode do povećanja aktivnosti CAT i SOD u eritrocitima zdravih osoba (Nelson, Bose i sar. 2006). Molekulski mehanizam kojim Nrf2 utiče na povećanje nivoa CAT i SOD u cirkulaciji verovatno se zasniva na relativno dobro proučenom opštem mehanizmu delovanja ovog transkripcionog faktora, prema kome u stanjima oksidativnog stresa pod uticajem promena na Keap1 molekulu dolazi do povećanja stabilizacije i smanjenja ubikitinizacije Nrf2 molekula. Tako „aktiviran“ Nrf2 odlazi u nukleus gde formira heterodimer sa malim Maf proteinom i vezuje se za ARE elemente u promotoru mnogih citoprotektivnih gena indukujući njihovu transkripciju (Copple 2012).

Za razliku od krvi, u tkivu endometrijuma nivo transkripcionog faktora Nrf2 nije korelisan sa mRNK za CAT (slika 23; grafikon a), a negativno je korelisan sa nivoom CAT proteina (slika 23; grafikon b). Ovakvi rezultati bi mogli biti posledica molekularskih događaja u kojima Nrf2 ne utiče na transkripciju gena za CAT, ali delujući na druge mehanizme uključene u translacione i posttranslacione procese u ekspresiji CAT značajno negativno reguliše nivo ovog enzima. Jedan od posttranslacionih procesa za koji je već pokazano da može da utiče na stabilnost i smanjenje poluživota katalaze u uslovima dugotrajnog oksidacionog stresa je fosforilacijom indukovana ubikitinizacija i proteozomalna degradacija katalaze (Cao, Leng i sar. 2003). Osim toga, smanjeni nivo

CAT proteina u stanjima povećane ekspresije transkripcionog faktora Nrf2 može biti posledica proteolize indukovane aktivacijom UPP puta (ubiquitin–proteasome pathway). Pokazano je da ovaj put ima ključnu ulogu u očuvanju ćelijske homeostaze, regulaciji velikog broja signalnih puteva u ćeliji (Lecker, Goldberg i sar. 2006) kao i u procesu kancerogeneze (Frezza, Schmitt i sar. 2011). Prema rezultatima Adamsa, ćelije tumora su naročito osetljive na inhibitore proteozoma (Adams 2004) što je verovatno posledica potrebe tumorskih ćelija da eliminišu izmenjene proteine koji mogu oštetiti ćeliju i čija bi akumulacija indukovala promene u ćelijskom ciklusu i apoptozu (Tu, Chen i sar. 2012). Mehanizam koji dovodi do povećanja proteozomalne aktivnosti u tumorima još uvek nije potpuno poznat, mada je više autora pokazalo da geni koji kodiraju proteozomalne subjedinice u svom promotoru poseduju ARE elemente koji su pod kontrolom transkripcionog faktora Nrf2 (Kwak i Kensler 2006; Pickering, Linder i sar. 2012). Arlt i saradnici su npr. na kanceru debelog creva prvi pokazali postojanje veze između aktivacije Nrf2, indukcije ekspresije proteozomalnih subjedinica i povećane proteozomalne aktivnosti (Arlt, Bauer i sar. 2009). U saglasnosti sa ovim su i rezultati Chena i saradnika koji su pokazali da inhibicija proteozoma ili "gašenje" ekspresije pojedinih proteozomalnih subjedinica sprečavaju rast i preživljavanje ćelija kolorektalnog kancera (Chen, Hu i sar. 2009). Zbog svog značaja u regulaciji važnih ćejjskih procesa inhibicija proteozoma je postala i važno terapijsko sredstvo u borbi protiv nekih tipova kancera (Motegi, Murakawa i sar. 2009).

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da bi, utičući na aktivnost proteozoma, povećan nivo Nrf2 molekula detektovan u adenokarcinomu endometrija mogao, osim već pomenutog uticaja na transkripciju AOE, indukovati i povećanu proteozomalnu razgradnju oksidovanih, fosforilovanih i na drugi način modifikovanih CAT proteina i tako predstavljati jedan od uzroka negativne korelisanosti ova dva molekula važna za očuvanje ćelijske redoks homeostaze.

Razumevanje uloge glutation peroksidaza u kancerogenezi poslednjih decenija je raslo uporedo sa porastom znanja o ulozi hidroperoksida u različitim fiziološkim i patološkim procesima u ćeliji. Danas se hidroperoksidi ne smatraju toksičnim jedinjenjima, već molekulima koji imaju važnu ulogu u procesima ćelijske signalizacije. Hidroperoksidi mogu uticati na aktivnost transkripcionih faktora poput NFκB, AP-1, Nrf2 i HIF1 (Trachootham, Lu i sar. 2008) i menjati nivo ćelijske fosforilacije

kontrolisane aktivnošću protein tirozinskih fosfataza (PTP) (Mueller, Klomann i sar. 2008) podložnih inhibiciji vodonik peroksidom. Hidroperoksidi su takođe povezani sa starenjem eritrocita (Miyazawa, Suzuki i sar. 1996), aktiviraju programiranu ćelijsku smrt (Wang, Gotoh i sar. 2000) i imaju značajnu ulogu u proliferaciji (Polytarchou, Hatziapostolou i sar. 2005) i diferencijaciji ćelija (Szymczyk, Kerr i sar. 2006). Na osnovu broja i značaja procesa u kojima učestvuju hidroperoksidi, poslednjih godina je postalo jasno da održanje ćelijske homeostaze ne favorizuje apsolutno uklanjanje ovih molekula, već održavanje njihove količine na optimalnom nivou. Tako delikatna funkcija verovatno predstavlja i objašnjenje potrebe za postojanjem različitih izoformi GPx koje svojom različitom distribucijom i supstratnom specifičnošću mogu da zadovolje širok spektar fizioloških potreba ćelija u ljudskom organizmu. Zbog razlika u uticajima koje pojedinačne izoforme GPx ispoljavaju na različite procese u ćeliji, nije moguće definisati opšti efekat ove grupe enzima na kancerogenezu i rast tumora. Smatra se da sve izoforme GPx teže da inhibiraju inicijaciju i metastazu kancera, ali se njihov uticaj na rast tumora razlikuje. Tako npr. GPx4 ispoljava inhibirajući, a GPx2 stimilirajući uticaj na ćelijsku proliferaciju, što ukazuje na to da je uticaj različitih izoformi glutation peroksidaza na kancerogenezu najverovatnije specifičan u odnosu na enzimsku izoformu, vrstu kancera i stepen kancerogeneze.

Na potencijalni značaj GPx u razvoju kancera ukazao je rad Moscowa i saradnika (Moscow, Schmidt i sar. 1994) koji su koristeći mikrosatelitske markere uočili gubitak heterozigotnosti (LOH - loss of heterozygosity) GPx1 u ćelijama kancera pluća. Slični rezultati kasnije su objavljeni i za druge tumore, npr. kancer debelog creva (Hu, Benya i sar. 2005), vrata i glave (Hu, Dolan i sar. 2004), što je ukazalo na značajnu ulogu GPx1 u razvoju ovih vrsta kancera. Do danas je na različitim eksperimentalnim model-sistemima pokazano da je GPx1 uključen kako u prokancerogene, tako i u antikancerogene mehanizme. Smatra se da smanjenje nivoa ovog enzima može uticati na osetljivost i razvoj kancera. Iako ekspresija GPx1 nije suprimirana u svim tipovima malignih transformacija, u većini kancera je detektovana redukcija njegove ekspresije (Gladyshev, Factor i sar. 1998; Cullen, Mitros i sar. 2003).

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da se u odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja (polip i miom), ekspresija GPx1 značajno menja u grupama sa premalignim (hiperplazija simpleks i hiperplazija kompleks) i malignim

(adenokarcinom) dijagnozama i to kako u tkivu tako i u krvi ispitivanih pacijentkinja. Promene na nivou transkripcije GPx1 prikazane su na slici 9. i u tabeli 5. Rezultati ovog dela eksperimenta pokazuju da u odnosu na pacijentkinje sa polipom i miomom, nivo GPx mRNA raste u endometriju pacijentkinja sa obe vrste hiperplazija, kao i u grupi pacijentkinja sa dijagnostikovanim adenokarcinomom. Na nivou translacije, međutim, relativna količina GPx proteina u tkivu pokazuje nešto drugačiji obrazac promena (slika 14; tabela 10). Dok je u grupama sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks nivo GPx proteina povećan u odnosu na kontrolne grupe (i time prati promene u mRNA za ovaj enzim), kod pacijentkinja sa adenokarcinomom zabeleženo je sniženje relativne količine GPx1 proteina. Uočeno smanjenje nivoa ovog molekula kod pacijentkinja sa adenokarcinomom očigledno ne prati povećanje količine mRNA u istoj grupi uzoraka (slika 9). Moguće je da u maligno transformisanim ćelijama endometrija dolazi do smanjenja efikasnosti translacije ovog enzima, ili do povećanja njegove razgradnje, čime bi se mogao objasniti pad nivoa GPx1 proteina u uslovima povećanja količine njegove mRNA. Korelisanost oksidativnih procesa i unutarćelijske proteolize je pokazana u radovima mnogih autora. Poznato je da su proteozomi odgovorni za uklanjanje oksidativno oštećenih proteina u citosolu i nukleusu (Voss i Grune 2007). Prema Breusingu i saradnicima (Breusing i Grune 2008) blagi oksidativni stres povećava proteozomalnu degradaciju, dok jaki oksidativni stres može da dovede do njenog smanjenja. Eksperimentalno je pokazano i da se nakon izlaganja oksidantima povećava osetljivost proteinskih molekula na dejstvo proteaza (Grune, Reinheckel i sar. 1997), kao i da indukcija Nrf2 molekula može značajno uticati na aktivnost proteozoma, o čemu je već bilo reči u diskusiji ove disertacije. Sve ovo bi, s obzirom na narušenu redoks homeostazu u tkivu kancera i pomeranje redoks ravnoteže ka oksidacionoj sredini, moglo objasniti zabeleženo smanjenje nivoa GPx proteina u maligno transformisanom tkivu endometrija. Kako su produkcija i uklanjanje slobodnih radikala dinamični i kompleksni procesi kojima se obezbeđuje održanje veoma niske koncentracije ovih reaktivnih molekula, svako smanjenje nivoa i aktivnosti GPx dovodi do promena u nivou hidroperoksida i organskih peroksida i time destabiliše redoks ravnotežu u ćeliji (Toussaint, Houbion i sar. 1993). Radovi mnogih autora pokazuju da promena nivoa GPx1 može narušiti balans između produkcije ROS-a i antioksidativne

odbrane i time uticati na razvoj kancera (Skrzydłewska, Sulkowski i sar. 2005; Beevi, Rasheed i sar. 2007)

Što se rezultata drugih autora tiče, Falck i saradnici su detektovali sniženu ekspresiju GPx u adenokarcinomu endometrijuma u odnosu na nemaligno i premaligno transformisano tkivo (Falck, Karlsson i sar. 2010). Oni su ispitivali nivo GPx3 mRNA u 30 humanih adenokarcinoma endometrijuma I, II i III stepena i 20 benignih endometrijalnih tkiva. Rezultati njihovih ispitivanja su pokazali da je mRNA za GPx3 uniformno snižena u tkivu pacijentkinja sa adenokarcinomom, bez obzira na stadijum kancera i njegovu histopatološku tipizaciju. Na osnovu toga, autori su zaključili da je snižena ekspresija GPx3 jedan od ranih događaja u kancerogenezi endometrijuma. Takođe, ovi autori su pokazali i da metilacija promotora GPx3 gena u tkivu adenokarcinoma dostiže 91%, čime se može objasniti značajno sniženje mRNA za GPx3 kod ovih pacijenata. Za razliku od zapažanja navedenih autora, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je nivo GPx1 mRNA u adenokarcinomu povećan u odnosu na grupe sa benignim i premaligim promenama (slika 9; tabela 5), što je još jedan pokazatelj da se kancerogeneza ova dva tipa kancera odvija različitim mehanizmima.

Slično našim rezultatima, smanjena ekspresija Gpx u maligno transformisanim ćelijama detektovana je i u kolorektalnom kanceru (Murawaki, Tsuchiya i sar. 2008), kanceru prostate (Rebsch, Penna i sar. 2006), bubrega (Durak, Bedük i sar. 1997), tireoidne zlezde (Hasegawa, Takano i sar. 2002) i estrogen-negativnim ćelijskim linijama kancera dojke (Esworthy, Baker i sar. 1995). Fiziološka posledica sniženja ekspresije GPx1 u maligno transformisanom tkivu svakako je smanjeni ćelularni kapacitet za uklanjanje H_2O_2 , čija je produkcija već povećana u ćelijama kancera (Szatrowski i Nathan 1991). Štetni efekti povećane koncentracije H_2O_2 i drugih hidroperoksida mogu biti naročito izraženi u uslovima istovremenog sniženja nivoa CAT i GPx, kao što je to slučaj kod pacijentkinja sa endometrijalnim kancerom prikazanim u rezultatima ove doktorske disertacije. Kao prekursori hidroksil radikala, vodonik peroksid i drugi hidroperoksidi mogu reagovati sa guaninom na C8 poziciji i formirati 8-OH-dG. Ovaj derivat guanina dalje dovodi do G-T transverzije i mutageneze koja je detektovana u velikom broju mutiranih onkogenih i tumor supresor gena. Takođe, produkti lipidne peroksidacije, kao što je 4-hidroksi nonenal, mogu formirati

DNK-adukte za koje je pokazano da imaju ključnu ulogu u kancerogenezi (Sasaki 2006; Valko, Rhodes i sar. 2006).

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da povećana produkcija i smanjena eliminacija peroksida u tkivu adenokarcinoma endometrija mogu značajno narušiti redoks ravnotežu i, utičući na signalne puteve i mutagenozu, doprineti promociji kancera. Sniženje ekspresije GPx1 je posebno važno ako se ima u vidu da nedostatak GPx1 u uslovima blagog oksidativnog stresa može biti kompenzovan aktivnošću katalaze ili peroksiredoksina, ali da u uslovima jakog oksidativnog stresa nedostatak GPx1 ne može biti nadoknađen aktivnošću drugih selenoproteina (Flohé 1987; Cheng, Ho i sar. 1998).

Što se tiče premalignih transformacija, ekspresija GPx1 u tkivu endometrija je i u hiperplaziji simpleks i u hiperplaziji kompleks povećana u odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom. Osim toga, uočeno povećanje ekspresije je statistički značajno i na nivou mRNK (slika 9; tabela 5) i na nivou GPx1 proteina (slika 14; tabela 10), na osnovu čega se može zaključiti da je ekspresija ovog enzima u premaligim transformacijama endometrija regulisana na nivou njegove transkripcije. Do sada poznati načini povećanja transkripcije GPx1 uključuju indukciju OREBP-om (Oxygen Responsive Element Binding Protein) (Merante, Altamentova i sar. 2002), estrogenima (Viña, Borrás i sar. 2005) i p53 proteinom (Hussain, Amstad i sar. 2004). Kako je razvoj adenokarcinoma endometrija povezan sa visokim nivoom estrogena (Audet-Walsh, Lépine i sar. 2011) može se pretpostaviti da su ovi hormoni bar delimično odgovorni za povećanu ekspresiju GPx1 u premaligno transformisanim ćelijama, iako način na koji estrogeni regulišu ekspresiju GPx1 nije u potpunosti razjašnjen. Kako do sada nije potvrđeno postojanje konkretnog estrogen-vezujućeg elementa u promotoru gena za GPx1, smatra se da ovi hormoni deluju aktivacijom NFκB koji zatim povećava ekspresiju GPx1, iako to nije direktno eksperimentalno potvrđeno (Borrás, Gambini i sar. 2005). Kojim god mehanizmom da je indukovano, uočeno povećanje nivoa GPx1 u premaligno transformisanom tkivu endometrija može imati važnu ulogu za dalju sudbinu ćelije. Pokazano je, naime, da GPx1 može inhibirati apoptozu samim uklanjanjem hidroperoksida, ili sprečavanjem hidroperoksida da povećaju stabilizaciju p53 proteina. Osim toga, pokazano je da GPx1 može ispoljiti antiapoptički efekat i promenom odnosa Bax : Bcl-2 (Faucher, Rabinovitch-Chable i

sar. 2005). U svakom od ovih scenarija povećanje GPx1 favorizuje ćelijsku proliferaciju. Uticaj GPx1 na proliferaciju je potvrđen i na modelu kancerogeneze kože, u kome miševi sa povećanom ekspresijom GPx1 pokazuju ubrzani razvoj lezija, razvijaju veći broj tumora po jedinki, a i same tumore karakteriše ubrzan rast (Lu, Lou i sar. 1997).

Kako brojne studije potvrđuju antiinflamatornu, antiapoptotsku i pro-proliferativnu funkciju GPx1, može se zaključiti da izmenjena ekspresija ovog enzima kod pacijentkinja sa obe vrste hiperplazija može uticati ne samo na stepen transformacije endometrijuma u datom stadijumu bolesti, već i na dalju sudbinu transformisane ćelije.

Važno je naglasiti da su promene tkivne ekspresije GPx1 prikazane u rezultatima ove doktorske disertacije u saglasnosti sa promenama aktivnosti ovog enzima, ranije izmerenih u našoj laboratoriji. Ovi raniji rezultati pokazuju da je, u odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa miomom i polipom, aktivnost GPx1 povećana u endometrijumu pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks, ali ne i kod žena sa razvijenim adenokarcinomom (Pejic, Todorovic i sar. 2009). Snižena ekspresija GPx1 u tkivu adenokarcinoma endometrijuma ukazuju na to da ovaj enzim može biti potencijalni dijagnostički marker, ali i ciljani molekul u terapiji ovog oboljenja. Naime, nizak nivo GPx1 bi mogao biti važna indikacija za terapiju adenokarcinoma endometrijuma hemoagensima koji deluju na principu povećanja koncentracije H₂O₂. Efikasnost ovih agenasa bi trebala biti dodatno potencirana istovremenim sniženjem nivoa CAT, takođe detektovanim u rezultatima ovog istraživanja. Potvrde ovih pretpostavki zahtevaju dodatna ispitivanja kojima bi značaj GPx u ovom tipu kancera bio potvrđen u kliničkoj praksi.

Što se tiče promena ekspresije GPx u krvi pacijentkinja sa dijagnostikovanim kancerom, dostupni podaci su malobrojni i međusobno veoma različiti. Gonzales i saradnici su pokazali da su u krvnim ćelijama pacijenata sa različitim vrstama leukemija, Hočkinovom bolešću, limfosarkomom i različitim visceralnim kancerima aktivnosti CAT i GPx u opsegu kontrolnih vrednosti (Gonzales, Auclair i sar. 1984). Prema rezultatima Erdema i saradnika aktivnost GPx u eritrocitima pacijenata sa kancerom prostate je značajno snižena u odnosu na zdrave kontrole (Erdem, Eken i sar. 2012), a studija Agnaniya i saradnika na seroznom ovarijalnom kanceru je pokazala da

je nivo GPx3 proteina u serumu pacijentkinja sa ovom bolešću značajno snižen i to proporcionalno stadijumu kancerogeneze (Agnani, Camacho-Vanegas i sar. 2011). Osim toga, potrebno je istaći postojanje značajnih individualnih razlika u aktivnosti GPx1 u humanoj krvi. Ove razlike su veće od razlika izmerenih kod drugih antioksidativnih enzima. Andersen i saradnici su npr. ispitujući biološku varijabilnost AOE kod 220 osoba zapazili da je individualni koeficijent varijabilnosti za aktivnost GPx 16.6%, 11.1% za CuZn-SOD, 12.3% za GR i 9.4% za CAT (Andersen, Nielsen i sar. 1997). U rezultatima Bolzana i saradnika (Bolzán, Bianchi i sar. 1997) koeficijent varijabilnosti za GPx u krvi iznosi čak 36.2%.

U okviru rezultata ove doktorske disertacije pokazano je da je nivo GPx1 proteina u krvi u odnosu na zdrave, kontrolne ispitanice (grupa K) povećan u svim grupama pacijentkinja sa transformisanim endometrijumom (grupe PE,UM, SH, CH, ACE) (slika 19; tabela 15). Ipak, povećanje zabeleženo u odnosu na kontrolu je statistički značajno samo u grupama žena sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks (tabela 15), što ukazuje na to da se ekspresija GPx u krvi menja u toku transformacije endometrijuma. Takođe, naša ranija ispitivanja su pokazala da je u odnosu na zdrave ispitanice, enzimaska aktivnost GPx1 nepromenjena u krvi pacijentkinja sa polipom i miomom, ali statistički značajno snižena u grupama sa premalignom i malignom transformacijom endometrijuma (Pejic, Kasapovic i sar. 2006). Na osnovu rezultata oba ispitivanja može se zaključiti da je pad aktivnosti GPx1 u krvi pacijentkinja sa obe vrste hiperplazija i adenokarcinomom posledica nekog posttranslacionog događaja. S obzirom da procese premaligne i maligne transformacije karakteriše pomeranje redoks ravnoteže ka oksidacionoj sredini, oksidativna inaktivacija i povećana proteozomalna razgradnja oksidacijom oštećenih proteina (već opisane na primeru smanjenja nivoa GPx proteina u tkivu endometrijuma) predstavljaju najverovatnije uzroke uočenih promena. Novija istraživanja su pokazala da GPx1 može biti oksidativno inaktivisan milimolarnim koncentracijama vodonik peroksida (Cho, Lee i sar. 2010), kao i azot oksidom (Asahi, Fujii i sar. 1995), pa se može pretpostaviti da bi i povećanje koncentracije ovih molekula uzrokovano njihovom povećanom produkcijom ili smanjenim uklanjanjem moglo biti bar delimično odgovorno za uočeni posttranslacioni pad aktivnosti GPx u krvi pacijentkinja sa transformisanim endometrijumom.

Što se tiče uticaja Nrf2 na ekspresiju GPx1 kod pacijentkinja sa različitim formama transformacije endometrijuma, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je u krvi nivo Nrf2 pozitivno korelisan sa količinom GPx1 enzima (slika 24; grafikon c). Kako je pozitivna korelacija sa Nrf2 zabeležena i kod CAT proteina (slika 23; grafikon c), očigledan je fiziološki značaj očuvanja mehanizama regulacije ekspresije enzima koji regulišu količinu peroksida u krvi u patološkim stanjima praćenim produženim oksidativnim stresom.

Sa druge strane, u tkivu endometrijuma, nivo Nrf2 pokazuje negativnu korelaciju sa količinom mRNA za GPx (slika 24; grafikon a), a između nivoa Nrf2 i GPx proteina nije detektovana statistički značajna korelacija (slika 24; grafikon b). Na prvi pogled izgleda nelogično podatak da Nrf2 može biti negativno korelisan sa mRNA za GPx1, s obzirom da bi ovaj transkripcioni faktor trebalo da vezivanjem za ARE promotore indukuje transkripciju GPx1 mRNA. Moguće je da je, npr. sprečavanjem translokacije Nrf2 iz citoplazme u nukleus, sprečena aktivacija transkripcije Nrf2 inducibilnih gena, iako je količina ovog transkripcionog faktora u citoplazmi povećana. Takođe, moguće je da, čak i u slučajevima povećane količine Nrf2 u nukleusu, neki drugi molekul kompetira vezivanju za ARE element u promotoru gena i time suprimira Nrf2 zavisnu indukciju AOE. Ova supresija kompeticijom eksperimentalno je pokazana na ćelijskoj liniji mišjeg hepatokarcinoma u kojima se p53 vezuje za promotore koje sadrže ARE elemente i time direktno blokira vezivanje Nrf2 i indukciju transkripcije nekoliko gena za AOE (Faraonio, Vergara i sar. 2006).

Kada je reč o značaju transkripcionog faktora Nrf2 za ekspresiju CAT i GPX, treba istaći da ova veza pokazuje značajan uticaj i u suprotnom smeru. Jain i Jaiswal (Jain i Jaiswal 2006) su na kulturi ćelija humanog hepatoma (HepG2) pokazali da H₂O₂, čiji je nivo regulisan aktivnošću ova dva enzima, inicijalno dovodi do nuklearne akumulacije Nrf2 molekula i time do aktivacije citoprotektivnih gena. Sa druge strane, u slučajevima produžene aktivacije, H₂O₂ indukuje fosforilaciju tirozina 568 na Nrf2 molekulu i time intenzivira njegov transport van nukleusa a zatim i njegovu degradaciju. Ovi rezultati još jednom ukazuju na to da je veza između ROS, AOE i transkripcionog faktora Nrf2 povratna, osetljiva i da uključuje više faktora koji utiču na produkciju slobodnih radikala i regulaciju redoks ravnoteže u ćeliji.

Kako je enzimski funkcija glutacione reduktaze održavanje i obnavljanje redukovane forme glutationa, značaj ovog enzima se zasniva na ulozi koju GSH ima u mnogim fiziološkim i patološkim procesima u organizmu. Glutacion je bitna komponenta u procesima detoksifikacije različitih elektrofilnih jedinjenja i peroksida koje katalizuju glutacion-S-transferaza i glutacion peroksidaza. Osim detoksifikacije, GSH ima značajnu ulogu i u ćelijskim procesima katalize, metabolizma i transporta fiziološki važnih supstanci (Hammond, Lee i sar. 2001). On učestvuje u redukciji ribonukleotida do dezoksiribonukleotida, regulaciji aktivnosti proteina i genske ekspresije, a ima i ulogu kofaktora u nekim enzimskim sistemima (Meister 1988). Aktivnost GR obezbeđuje cikliranje glutaciona između oksidovane i redukovane forme i time omogućava uklanjanje slobodnih radikala produkovanih u toku metabolizma toksičnih supstanci i štiti ćeliju od oksidativnih oštećenja (Bellomo, Mirabelli i sar. 1987; Sies 1999). Nivo GSH je važan i za očuvanje normalne funkcije ćelije i sprečavanje njene maligne transformacije. Pokazano je da GSH može da inaktivira neke kancerogene (Monks, Anders i sar. 1990), spreči oksidativno oštećenje DNK (Gokce, Ozsarlak-Sozer i sar. 2009) i smanji lipidnu peroksidaciju (Maddaiah 1990). Zato ne čudi podatak da osim što štiti normalnu ćeliju od transformacije, GSH ima značajnu ulogu i u rezistenciji već transformisanih, malignih ćelija. Visok nivo GSH zabeležen je u tumorima koji ispoljavaju radio- ili hemo-rezistenciju, kao što su: tumor dojke (Perry, Mazetta i sar. 1993), melanom (Carretero, Obrador i sar. 1999) i karcinom pluća (Honda, Coppola i sar. 2004). Ispitivanja promene nivoa GR u različitim tipovima kancera su pokazala da ne postoji jednoznačna promena u ekspresiji i aktivnosti ovog enzima sa razvojem i progresijom ćelijskog maligniteta. Skrzydlewska i saradnici su pokazali da je aktivnost glutacione reduktaze značajno povećana u tkivu kolorektalnog kancera (Skrzydłewska, Stankiewicz i sar. 2001), dok je prema rezultatima Moghadasiana aktivnost ovog enzima snižena u neoplastičnim ćelijama tkiva kolona kod pacova (Moghadasian, Freeman i sar. 1996). Povećan nivo GR izmeren je i u 38 uzoraka tumora pluća u odnosu na 17 uzoraka normalnog plućnog tkiva (Saydam, Kirb i sar. 1997), kao i u metastatskoj ćelijskoj liniji melanoma u odnosu na nemetastatske ćelije melanoma murine (Chakraborty, Ueda i sar. 1993).

Rezultati ove doktorske disertacije takođe pokazuju da je u odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom, nivo GR povišen kod žena sa obe vrste

hiperplazija i adenokarcinomom endometrija. Ovo povećanje zapaženo je kako na nivou GR mRNA, tako i na nivou relativne količine GR proteina, iako postoji izvesna razlika u intenzitetu promena ova dva parametra sa progresijom maligne transformacije. Nivo mRNA za GR postepeno raste tokom kancerogeneze ćelija endometrija i dostiže statistički značajno povećanje vrednosti u grupama pacijentkinja sa hiperplazijom kompleksa i adenokarcinomom (slika 10; tabela 6). Relativna količina GR proteina, međutim, značajno je povećana već u grupi pacijentkinja sa hiperplazijom simpleksa, a sličan stepen povećanja u odnosu na kontrolne grupe zadržava se i kod pacijentkinja sa hiperplazijom kompleksa i adenokarcinomom (slika 15; tabela 11). Ovakva razlika u dinamici promena ukazuje na mogućnost da je u toku kancerogeneze postepeno povećanje transkripcije gena za GR praćeno nekim mehanizmom koji dodatno doprinosi povećanju translacije mRNA, ili stabilizaciji proteinskog produkta. Na taj način bi se mogao objasniti nagli porast nivoa proteina u fazi hiperplastičnih promena u odnosu na postepeno povećanje mRNA u toku čitave maligne transformacije endometrija. Pokazano je da je glutation reduktaza rezistentnija na oksidativni stres od npr. GPx (Spooren i Evelo 1998), što može biti jedan od uzroka stabilizacije i povećanja nivoa GR proteina u uslovima oksidativnog stresa u toku kancerogeneze. Nivo GR u reproduktivnim organima može biti značajno regulisan i dejstvom estrogena, kao što su na uterusu pacova pokazali Diaz-Flores i saradnici (Díaz-Flores, Baiza-Gutman i sar. 1999). Prema ovim autorima polni hormoni stimulišu aktivnost GR u uterusu, a to može imati važnu ulogu u fiziologiji ovog organa. Naime, GR osim što regeneriše redukovanu formu glutationa može imati i značajnu ulogu u regulaciji nivoa NADPH, što je veoma važno za organe sa visokom produkcijom ovog metabolita, npr. uterus pod dejstvom estrogena (Donohue Jr i Barker 1983; Swanson i Barker 1983). Prema ovom modelu, estrogenima stimulisan porast aktivnosti GR dovodi do povećanja oksidacije njegovog koenzima NADPH u NADP, što indukuje porast aktivnosti G6PDH i stimuliše pentozni fosfatni ciklus. Ovaj ciklus predstavlja glavni metabolički put za produkciju NADPH, a obezbeđuje i sintezu pentoznih neophodnih za izgradnju nukleinskih kiselina u toku rasta uterusa.

Na važnu ulogu GR u reproduktivnim organima su ukazali i Kaneko i saradnici (Kaneko, Iuchi i sar. 2001) koji su koristeći specifična antitela za rekombinantnu GR najjaču imunoreaktivnost zabeležili u jajnim ćelijama, zatim u granuloznim ćelijama,

žutom telu i intestinalnim ćelijama ženki pacova. Jaka pozitivna reakcija uočena je i u epitelu jajovoda i materice, kao i u žlezdanom endometriju. U ovim tkivima GSH ima višestruku funkciju jer održava potenciju oocita, učestvuje u formiranju muških pronukleusa i zaštiti embriona od oksidativnog stresa.

Povećanje ekspresije GR uočeno u ovom istraživanju u toku maligne transformacije endometrija verovatno je adaptivni odgovor koji obezbeđuje povećanje nivoa GSH u ovom intenzivno metabolišućem tkivu. Pokazano je da se povećana potreba za esencijalnim antioksidantima kao što je GSH u ćelijama kancera, osim regulacijom enzima koji učestvuju u njegovom metabolizmu, može zadovoljiti i sekvestracijom (Buzby, Mullen i sar. 1980). U svakom slučaju, povećanje nivoa GSH može značajno i na mnogo načina uticati na malignu transformaciju ćelije i tkiva. Pokazano je da je povećanje količine ovog molekula povezano sa mitogenom stimulacijom (Aidoo, Lyn-Cook i sar. 1991), sintezom DNK (Suthanthiran, Anderson i sar. 1990) i regulacijom ćelijskog ciklusa (Diaz Vivancos, Wolff i sar. 2010). Noviji rezultati ukazuju i na to da je glutation ključni regulator epigenetskih procesa kritičnih za regulaciju ćelijske proliferacije (Pallardó, Markovic i sar. 2009). Kroz proces glutationilacije, u toku kojeg tiol grupa proteina reverzibilno vezuje GSH, nivo glutationa može direktno uticati na stabilnost i enzimsku aktivnost proteina (Cotgreave i Gerdes 1998; Mieyal i Chock 2012), kao i na aktivnost proteozoma i "turnover" ćelijskih proteina (Demasi i Davies 2003). Ashtiani i saradnici su merenjem GSH/GSSG odnosa u toku proliferacije mezenhimalnih "stem" ćelija pokazali da je prolazak ćelije kroz proliferaciju, kontaktnu inhibiciju, diferencijaciju i, konačno, apoptozu praćen promenom sredine iz više redukovano u više oksidovano stanje (Ahmadi-Ashtiani, Allameh i sar. 2012). Porast ekspresije GR u premaligno i maligno transformisanom endometriju, uočen u ovom istraživanju, svakako suprimira porast oksidacionog stanja sredine i time doprinosi proliferaciji ćelija. Nastanak premalignih lezija i progresija tkiva u maligni fenotip pod uticajem povećane ekspresije GR mogle bi biti posledica i direktne korelacije nivoa GSH sa ćelijskim rastom i metastatskom aktivnošću koja je već zabeležena na nekim tipovima ćelija (Carretero, Obrador i sar. 1999). Takođe, pokazano je da su brojni transkripcioni faktori, uključujući NRF2, NF- κ B, AP-1 i p53, veoma osetljivi na redoks promene (Primiano, Sutter i sar. 1997; Kim, Kundu i sar. 2011), što ukazuje na to da GSH može imati ulogu transkripcionog

regulatora mnogih važnih procesa uključujući proliferaciju, apoptozu i malignu transformaciju ćelije. Ovako široki spektar uticaja GSH na fiziološke i patološke procese u ćeliji omogućen je i svojstvom ovog molekula da lako difunduje između različitih ćelijskih struktura, pa promena njegovog nivoa u npr. citosolu može uticati na procese u ostalim delovima ćelije, kao što su mitohondrije i nukleus.

Iz svega navedenog se može zaključiti da porast ekspresije GR i posledično povećanje nivoa GSH u premaligno i maligno transformisanom endometriju mogu imati značajnu ulogu u kancerogenezi uterusa. Osim što su u saglasnosti sa brojnim podacima koji ukazuju na povećanje ekspresije enzima koji učestvuju u metabolizmu GSH u mnogim tipovima malignih tumora (Saydam, Kirb i sar. 1997; Skrzydlewska, Stankiewicz i sar. 2001), promene ekspresije GR uočene u ovom istraživanju su u saglasnosti i sa našim ranije objavljenim podacima koji su pokazali da i aktivnost GR raste u toku premalignih i malignih procesa u humanom endometriju (Pejic, Todorovic i sar. 2009). Trend uočenih promena u obe grupe rezultata ukazuje da su promene aktivnosti ovog enzima regulisane na nivou ekspresije, što može biti značajan podatak za terapijske pristupe koji se zasnivaju na regulaciji nivoa GSH u ćelijama kancera (Zhao, Seefeldt i sar. 2009; Ortega, Mena i sar. 2011).

Za razliku od samog tkiva, nivo ekspresije GR u krvi pacijentkinja sa transformisanim endometrijom je dosta niži od kontrolnih vrednosti, ali ne varira značajno u zavisnosti od dijagnoze (slika 20; tabela 16). Prema našim ranije objavljenim rezultatima i aktivnost GR u krvi je u odnosu na kontrolu (K) značajno snižena u grupama PE, UM, SH, CH i ACE, a Dunn test je pokazao da ne postoji značajna razlika u GR aktivnosti između ovih grupa pacijentkinja (Pejic, Kasapovic i sar. 2006). Na osnovu ove dve grupe rezultata može se zaključiti da su promene aktivnosti GR u krvi pacijentkinja sa transformisanim endometrijom regulisane promenama u ekspresiji ovog enzima, kao i da uočene promene nastaju rano u procesu transformacije endometrija i nisu korelisane sa njenom progresijom.

Rezultati drugih autora pokazuju da se aktivnost GR ne menja značajno u eritrocitima pacijenata sa kancerom mokraćne bešike (Dawra, Sharma i sar. 1989) i u serumu pacijenata sa kancerom želuca i debelog creva (Ścibior, Skrzycki i sar. 2008). Međutim, u literaturi postoje i podaci o povećanju aktivnosti glutation reduktaze u krvi pacijentkinja sa karcinomom dojke (Abou Ghalia i Fouad 2000; Yeh, Hou i sar. 2005) i

jetre (Ścibior, Skrzycki i sar. 2008), kao i podaci o smanjenju aktivnosti ovog enzima kod pacijenata sa oralnim kancerom (Fiaschi, Cozzolino i sar. 2005).

Moguće je da promene nivoa GR u krvi zavise od tipa kancera i stadijuma kancerogeneze. Osim toga, zna se da u toku oksidacionog stresa u tkivima dolazi do porasta oksidacije GSH i oslobađanja GSSG iz ćelije (Sies i Akerboom 1984; Nur, Verwijs i sar. 2011). Kao posledica toga, smatra se da GSH/GSSG odnos u krvi može odražavati promene u statusu glutaciona u drugim, teže dostupnim tkivima (Navarro, Obrador i sar. 1997; Navarro, Obrador i sar. 1999) i biti mera oksidativnog stresa u organizmu. Relativno uniformno smanjenje ekspresije i aktivnosti GR u krvi pacijentkinja sa različitim formama transformisanog endometrijuma svakako ide u prilog više puta iznetoj tezi o pomeranju redoks revnoteže u toku kancerogeneze ka oksidovanoj sredini i ukazuje da nivo ovog enzima može biti potencijalno značajan parametar oksidativnog stresa u toku kancerogeneze uterusa, na šta je već ukazano i kod nekih drugih tipova kancera (Kasapovic, Pejic i sar. 2008; Maffei, Angeloni i sar. 2011)

Rezultati Spearmanove analize pokazuju da je ekspresija glutation reduktaze pozitivno korelisana sa nivoom transkripcionog faktora Nrf2 i u krvi i u tkivu pacijentkinja sa različitim formama transformisanog endometrijuma. Uočen je pozitivan uticaj Nrf2 na nivo mRNK za GR (slika 25; grafikon a), kao i pozitivan uticaj Nrf2 na nivo GR proteina (slika 25; grafikon b) u endometrijumu, mada ova druga korelacija nije statistički značajna. Nivo Nrf2 pozitivno je korelisan i sa nivoom GR proteina u krvi (slika 25; grafikon c), što ukazuje na važnost efikasne indukcije ovog enzima u stanju oksidativnog stresa koji karakteriše proces maligne transformacije tkiva. Pokazano je da osim ekspresije GR, Nrf2 reguliše još neke nezavisne mehanizme koji utiču na ćelijski nivo GSH. Ovi mehanizmi obuhvataju regulaciju enzima koji učestvuju u biosintezi GSH (Erickson, Nevarea i sar. 2002) i kontrolu cistein/glutamat transportera koji utiče na influks cisteina u ćeliju, pa time i održanje intracelularnog nivoa GSH (Shih, Erb i sar. 2006). Ipak, Harvey i saradnici su na ćelijama mišjih fibroblasta pokazali da je regulacija GSH redoks statusa Nrf2-zavisnom aktivacijom glutation reduktaze kritična za preživljavanje ćelije u stanjima oksidativnog stresa (Harvey, Thimmulappa i sar. 2009). Isti autori su otkrili i postojanje tri ARE elementa u promotoru gena za GR. Ovakva struktura promotorske sekvence verovatno obezbeđuje neometanu indukciju GR transkripcionim faktorom Nrf2, čak i u uslovima u kojima bi

neki drugi molekuli mogli kompetirati vezivanju za ARE sekvence, kao što je već pomenuto na primeru mogućeg uticaja p53 na korelaciju Nrf2 i GPx1.

Rezultati prikazani i diskutovani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da su promene nivoa AO enzima, kao i regulacija njihove ekspresije transkripcionim faktorom Nrf2, značajne za nastanak i progresiju benignih, premalignih i malignih promena na uterusu. Osim toga, ovi rezultati ukazuju na neophodnost daljih istraživanja koja bi unapredila dosadašnja znanja iz ove oblasti i omogućila njihovu primenu u kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji možemo doneti sledeće zaključke:

1. Promene nivoa transkripcionog faktora Nrf2 u endometriju u toku njegove maligne transformacije doprinose nastanku prekancerogenih promena, a zatim i razvoju adenokarcinoma.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) U endometriju pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks zabeleženo je sniženje nivoa Nrf2 što umanjuje kapacitet ćelijske detoksifikacije i antioksidativne zaštite i pogoduje nastanku oštećenja ćelije a time i formiranju početnih, premalignih lezija.

b) U tkivu adenokarcinoma uočen je povećan nivo Nrf2 proteina. Ovakve promene u maligno transformisanim ćelijama mogu povećati njen citoprotektivni kapacitet, uticati na ćelijsku signalizaciju, sprečiti apoptozu i time doprineti promenama u rastu, proliferaciji i agresivnosti kancera.

2. U benignim i premalnim promenama uterusa nivo Nrf2 proteina je dominantno regulisan na nivou transkripcije, dok je porast nivoa Nrf2 u tkivu adenokarcinoma regulisan nekim posttranskripcionim mehanizmom.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) Kod pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex* i *hyperplasia complex* pad nivoa Nrf2 proteina prati trend smanjenja količine njegove mRNK.

b) U odnosu na kontrolne grupe (*polypus endometrii* i *uterus myomatosus*), u adenokarcinomu endometrija količina Nrf2 mRNK opada, ali je u istoj grupi pacijentkinja zabeležen značajan porast nivoa Nrf2 proteina.

3. U odnosu na kontrolnu grupu, u krvi pacijentkinja sa benigno, premalno i maligno transformisanim endometrijom detektovano sniženje nivoa Nrf2

verovatno je posledica iscrpljivanja AO kapaciteta organizma usled dugotrajnog oksidativnog stresa koji prati kancerogenezu.

4. Ekspresija CuZnSOD u endometrijumu se značajno menja u toku kancerogeneze ovog tkiva, a stepen zabeleženih promena u različitim fazama transformacije je na nivou transkripcije, kao i na nivou translacije određen promenama nivoa transkripcionog faktora Nrf2.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) Nivo CuZnSOD mRNK kod pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks i hiperplazijom kompleks značajno opada u odnosu na pacijentkinje sa polipom i miomom, dok je u tkivu adenokarcinoma količina mRNK značajno povećana u odnosu na obe benigne i obe premaligne transformacije. Sličan trend uočava se i kod promena nivoa CuZnSOD proteina, kao i promena nivoa transkripcionog faktora Nrf2.

b) Spearman-ova korelacija pokazuje da je količina Nrf2 proteina u endometrijumu ispitivanih pacijentkinja statistički značajno pozitivno korelisana sa količinom mRNK za CuZnSOD, kao i sa količinom CuZnSOD proteina.

5. Proces kancerogeneze endometrijuma karakteriše kotinuirani pad nivoa CuZnSOD u krvi pacijentkinja, a zabeležene promene su regulisane promenama nivoa transkripcionog faktora Nrf2.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) Za razliku od grupa sa polipom i miomom koje se ne razlikuju značajno u odnosu na kontrolne vrednosti, u krvi pacijentkinja sa hiperplazijom simpleks, hiperplazijom kompleks i adenokarcinomom endometrijuma dolazi do značajnog sniženja nivoa CuZnSOD proteina.

b) Spearman-ova analiza pokazuje da u krvi ispitivanih pacijentkinja postoji statistički značajna pozitivna korelisanost između nivoa CuZnSOD proteina i transkripcionog faktora Nrf2.

6. Smanjena ekspresija CAT u endometrijumu pacijentkinja sa različitim tipovima promena na uterusu može značajno odrediti "sudbinu" transformisanog tkiva, ali i uticati na izbor terapije ovih ginekoloških oboljenja.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) U odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom, nivo CAT mRNK i CAT proteina je značajno snižen u tkivu pacijentkinja sa premalignim (hiperplazija simpleks i hiperplazija kompleks) i malignim (adenokarcinom) lezijama.

b) Porast intracelularnog H_2O_2 , nastalog usled povećanja ekspresije CuZnSOD i smanjenja nivoa CAT i GPx, kod premalignih formi može doprineti procesu maligne transformacije, a u već transformisanim ćelijama kancera može povećati invazivnost i metastazu kancera.

c) Zbog povećane ekspresije CuZnSOD i smanjenog nivoa CAT i GPx, pacijentkinje sa adenokarcinomom endometrija predstavljaju dobre kandidate za terapijske strategije koje se zasnivaju na vodonik peroksidom indukovanoj apoptozi.

7. Nrf2 ne utiče direktno na transkripciju gena za CAT, ali delujući na druge mehanizme uključene u translacione i posttranslacione procese u ekspresiji CAT verovatno može uticati na nivo ovog enzima u endometriju.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) Nivo transkripcionog faktora Nrf2 u endometriju ispitivanih pacijentkinja nije korelisan sa mRNK za CAT

b) Nivo Nrf2 proteina je negativno je korelisan sa nivoom CAT proteina.

8. U cirkulaciji ispitivanih ginekoloških pacijentkinja ekspresija CAT je regulisana nivoom transkripcionog faktora Nrf2 i ne menja se značajno sa progresijom transformacije endometrijalnog tkiva.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) Spearmanova korelacija pokazuje da je u krvi ispitanica obuhvaćenih ovim istraživanjem nivo Nrf2 proteina statistički značajno pozitivno korelisan sa nivoom katalaze.

b) U odnosu na kontrolnu grupu uzoraka, u krvi nijedne od ispitivanih grupa pacijentkinja sa benignim (PE, UM), premalignim (SH, CH) i malignim (ACE) transformacijama endometrija nije uočena statistički značajna promena nivoa CAT proteina.

9. U toku kancerogeneze u endometriju dolazi do značajnih promena ekspresije GPx, a u zavisnosti od stepena transformacije tkiva menja se i mehanizam kojim je količina ovog enzima regulisana.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) Nivo GPx1 proteina u tkivu endometrija je u hiperplaziji simpleks i u hiperplaziji kompleks povećan u odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom. U istim grupama pacijentkinja je zabeležen i statistički značajan porast GPx mRNK, na osnovu čega se može zaključiti da je ekspresija ovog enzima u premalignim transformacijama endometrija regulisana na nivou njegove transkripcije.

b) U odnosu na kontrolne grupe ispitanica, kod pacijentkinja sa adenokarcinomom je zabeleženo sniženje relativne količine GPx1 proteina uz istovremeno povećanje količine mRNK za ovaj enzim. Ovakvi rezultati pokazuju da je nivo GPx u tkivu adenokarcinoma dominantno regulisan nekim posttranskripcionim mehanizmom.

10. Nivo GPx1 proteina u krvi je u odnosu na zdrave ispitanice povećan u svim grupama pacijentkinja sa transformisanim endometrijom. Zabeležene promene nivoa GPx1 su pozitivno korelisane sa nivoom transkripcionog faktora Nrf2.

11. Porast ekspresije GR u toku maligne transformacije endometrija obezbeđuje povećane potrebe za GSH u ovom intenzivno metabolišućem tkivu, a kontrolisan je nivoom transkripcionog faktora Nrf2. Uočeno povećanje količine GR rezultat je ne samo intenzivirane transkripcije gena za ovaj AO enzim, nego i postojanja mehanizma koji dodatno posttranskripciono doprinosi povećanju nivoa GR proteina.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) U odnosu na kontrolne grupe pacijentkinja sa polipom i miomom, nivo GR je povišen kod žena sa obe vrste hiperplazija i adenokarcinomom endometrija. Povećanje je zabeleženo kako na nivou GR mRNK, tako i na nivou relativne količine GR proteina.

b) Rezultati Spearmanove analize pokazuju da je u tkivu ispitivanih pacijentkinja ekspresija glutation reduktaze pozitivno korelisana sa nivoom transkripcionog faktora Nrf2.

c) Nivo mRNK za GR se postepeno povećava tokom progresije maligne transformacije endometrijuma, dok u odnosu na grupe sa benignim lezijama količina GR proteina naglo raste kod pacijentkinja sa hiperplazijama, a zadržava se na sličnom, povećanom nivou u grupi ispitanica sa adenokarcinomom.

12. Promene nivoa GR u krvi ispitivanih ginekoloških pacijentkinja su regulisane ekspresijom transkripcionog faktora Nrf2, nastaju rano u procesu transformacije endometrijuma i nisu korelisane sa progresijom malignih karakteristika ovog tkiva.

Ovaj zaključak proizilazi iz sledećeg:

a) Nivo Nrf2 proteina pozitivno je korelisan sa relativnom količinom GR u krvi ispitivanih pacijentkinja.

b) Nivo GR u krvi pacijentkinja sa dijagnozama PE, UM, SH, CH i ACE je niži od kontrolnih vrednosti (K), ali ne varira značajno između samih grupa.

OPŠTI ZAKLJUČAK

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na specifičnosti ekspresije antioksidativnih enzima i transkripcionog faktora Nrf2 kod ginekoloških pacijentkinja sa dijagnozama: *polypus endometrii*, *uterus myomatosus*, *hyperplasia simplex endometrii*, *hyperplasia complex endometrii* i *adenocarcinoma endometrii*. Prikazani podaci govore u prilog značajne uloge bakar-cink superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze, glutation reduktaze i Nrf2 u kompleksnim molekulskim interakcijama koje se nalaze u osnovi transformacije ćelija endometrijuma. Očigledno je da ispitivani AO enzimi ne samo da utiču na nastanak lezija u tkivu uterusa, nego predstavljaju i važan faktor za progresiju benignih promena u premaligni i maligni fenotip.

Rezultati ove doktorske disertacije značajno doprinose boljem razumevanju molekulskih osnova kancerogeneze endometrijuma. Njihova primena u kliničkoj praksi mogla bi doprineti prevenciji, dijagnostici i terapiji ginekoloških oboljenja, čime bi se poboljšali tok i prognoza bolesti i povećala stopa preživljavanja ovih pacijentkinja.

7. LITERATURA

- Abdel-Aziz, A. F. and M. M. El-Naggar (1997). "Superoxide dismutase activities in serum and white blood cells of patients with some malignancies." *Cancer Letters* **113**(1-2): 61-64.
- Abou Ghalia, A. H. and I. M. Fouad (2000). "Glutathione and Its Metabolizing Enzymes in Patients with Different Benign and Malignant Diseases." *Clinical Biochemistry* **33**(8): 657-662.
- Adachi, T., H. Ohta, et al. (1991). "Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase." *Biochemical Journal* **279**(1): 263-267.
- Adachi, T., H. Yamada, et al. (1999). "Increase of urinary extracellular-superoxide dismutase level correlated with cyclic adenosine monophosphate." *FEBS Letters* **458**(3): 370-374.
- Adams, J. (2004). "The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs." *Cancer Cell* **5**(5): 417-421.
- Agarwal, A., S. Gupta, et al. (2005). "Role of oxidative stress in female reproduction." *Reprod Biol Endocrinol* **3**: 28.
- Agnani, D., O. Camacho-Vanegas, et al. (2011). "Decreased levels of serum glutathione peroxidase 3 are associated with papillary serous ovarian cancer and disease progression." *J Ovarian Res* **4**: 18.
- Ahmad, K. A., K. B. Iskandar, et al. (2004). "Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of bax during drug-induced apoptosis of tumor cells." *Cancer Research* **64**(21): 7867-7878.
- Ahmadi-Ashtiani, H., A. Allameh, et al. (2012). "Inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by silymarin in proliferating mesenchymal stem cells: comparison with glutathione modifiers." *J Nat Med* **66**(1): 85-94.
- Ahmed, M. I., S. T. Fayed, et al. (1999). "Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma." *Dis Markers* **15**(4): 283-291.
- Aidoo, A., L. E. Lyn-Cook, et al. (1991). "Comparative study of intracellular glutathione content in rat lymphocyte cultures treated with 2-mercaptoethanol and interleukin-2." *Cell Biology and Toxicology* **7**(3): 215-227.
- Akerboom, T. P. M. and H. Sies (1989). "Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane." *Methods in Enzymology* **173**: 523-534.
- Aleksunes, L. M. and J. E. Manautou (2007). "Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease." *Toxicologic Pathology* **35**(4): 459-473.
- Allen, N. E., K. K. Tsilidis, et al. (2010). "Menopausal hormone therapy and risk of endometrial carcinoma among postmenopausal women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition." *Am J Epidemiol* **172**(12): 1394-1403.
- Alvarez, B., V. Demicheli, et al. (2004). "Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical." *Free Radical Biology and Medicine* **37**(6): 813-822.
- Ames, B. N. and L. S. Gold (1992). "Animal cancer tests and cancer prevention." *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*(12): 125-132.

- Andersen, H. R., J. B. Nielsen, et al. (1997). "Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes." *Clin Chem* **43**(4): 562-568.
- Anderson, G. L., H. L. Judd, et al. (2003). "Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial." *JAMA* **290**(13): 1739-1748.
- Antunes, F., D. Han, et al. (2002). "Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in *in vivo* conditions." *Free Radical Biology and Medicine* **33**(9): 1260-1267.
- Aoki, Y., H. Sato, et al. (2001). "Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust." *Toxicology and Applied Pharmacology* **173**(3): 154-160.
- Arai, K., S. Iizuka, et al. (1987). "Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **924**(2): 292-296.
- Arai, K., S. Maguchi, et al. (1987). "Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the *in vitro* glycated sites." *J Biol Chem* **262**(35): 16969-16972.
- Arbiser, J. L., J. Petros, et al. (2002). "Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(2): 715-720.
- Arisawa, T., T. Tahara, et al. (2007). "The relationship between *Helicobacter pylori* infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis." *Int J Mol Med* **19**(1): 143-148.
- Arisawa, T., T. Tahara, et al. (2008). "Nrf2 gene promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in a Japanese population." *Hepato-Gastroenterology* **55**(82-83): 394-397.
- Arlt, A., I. Bauer, et al. (2009). "Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)." *Oncogene* **28**(45): 3983-3996.
- Arnold, R. S., J. Shi, et al. (2001). "Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(10): 5550-5555.
- Arthur, J. R. (2000). "The glutathione peroxidases." *Cell Mol Life Sci* **57**(13-14): 1825-1835.
- Asahi, M., J. Fujii, et al. (1995). "Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity." *J Biol Chem* **270**(36): 21035-21039.
- Asayama, K. and I. M. Burr (1985). "Rat superoxide dismutases. Purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration." *Journal of Biological Chemistry* **260**(4): 2212-2217.
- Asmus, K.-D. and M. Bonifacic (2000). *Free radical chemistry. Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. K. S. Chandan, Ph.D, Facsmet al. Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 3-54.
- Assfalg, M., L. Banci, et al. (2003). "Superoxide dismutase folding/unfolding pathway: Role of the metal ions in modulating structural and dynamical features." *Journal of Molecular Biology* **330**(1): 145-158.

- Audet-Walsh, É., J. Lépine, et al. (2011). "Profiling of endogenous estrogens, their precursors, and metabolites in endometrial cancer patients: Association with risk and relationship to clinical characteristics." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96**(2): E330-E339.
- Azad, N., Y. Rojanasakul, et al. (2008). "Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **11**(1): 1-15.
- Baak, J. P., E. C. Wisse-Brekelmans, et al. (1992). "Assessment of the risk on endometrial cancer in hyperplasia, by means of morphological and morphometrical features." *Pathol Res Pract* **188**(1448376): 856-859.
- Babior, B. M., J. D. Lambeth, et al. (2002). "The neutrophil NADPH oxidase." *Arch Biochem Biophys* **397**(2): 342-344.
- Bae, Soo H., Su H. Sung, et al. (2013). "Sestrins Activate Nrf2 by Promoting p62-Dependent Autophagic Degradation of Keap1 and Prevent Oxidative Liver Damage." *Cell Metabolism* **17**(1): 73-84.
- Baird, L. and A. T. Dinkova-Kostova (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway." *Archives of Toxicology* **85**(4): 241-272.
- Baker, A. M., L. W. Oberley, et al. (1997). "Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma." *Prostate* **32**(4): 229-233.
- Ballestar, E. and M. Esteller (2005). *The Role of Epigenetic Alterations in Cancer*. The Cancer Handbook, John Wiley & Sons, Ltd.
- Bao, Y., P. Jemth, et al. (1997). "Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases." *FEBS Letters* **410**(2-3): 210-212.
- Barajas, B., N. Che, et al. (2011). "NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**(1): 58-66.
- Barbaro, G., G. Di Lorenzo, et al. (1996). "Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: Quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease." *American Journal of Gastroenterology* **91**(12): 2569-2573.
- Barra, D., M. E. Schinina, et al. (1984). "The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase." *Journal of Biological Chemistry* **259**(20): 12595-12601.
- Barth, G. (1984). "H. Kindl and P. B. Lazarow (Editors), Peroxisomes and Glyoxysomes (Annals of the New York Academy of Sciences, Volume 386). 550 S., 292 Abb., 64 Tab. New York 1982. The New York Academy of Sciences. ISBN 0-89766-162-1." *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* **24**(4): 268-268.
- Bauer, H., K. Fritz-Wolf, et al. (2006). "A fluoro analogue of the menadione derivative 6-[2'-(3'-methyl)-1',4'-naphthoquinolyl]hexanoic acid is a suicide substrate of glutathione reductase. Crystal structure of the alkylated human enzyme." *Journal of the American Chemical Society* **128**(33): 10784-10794.
- Bechtel, W. and G. Bauer (2009). "Catalase protects tumor cells from apoptosis induction by intercellular ROS signaling." *Anticancer Res* **29**(11): 4541-4557.

- Beck, M. A., R. S. Esworthy, et al. (1998). "Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis." *FASEB Journal* **12**(12): 1143-1149.
- Beckman, J. S. (1994). "Peroxynitrite versus hydroxyl radical: The role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury." *Annals of the New York Academy of Sciences* **738**: 69-75.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." *Physiological Reviews* **78**(2): 547-581.
- Beevi, S. S., M. H. Rasheed, et al. (2007). "Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma." *Clin Chim Acta* **375**(1-2): 119-123.
- Behrman, H. R. and S. L. Preston (1989). "Luteolytic actions of peroxide in rat ovarian cells." *Endocrinology* **124**(6): 2895-2900.
- Bellezza, I., A. L. Mierla, et al. (2010). "Nrf2 and NF- κ B and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression." *Cancers* **2**(2): 483-497.
- Bellomo, G., F. Mirabelli, et al. (1987). "Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress: A study with isolated hepatocytes and menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone)." *Biochemical Pharmacology* **36**(8): 1313-1320.
- Ben-Arie, A., C. Goldchmit, et al. (2004). "The malignant potential of endometrial polyps." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **115**(2): 206-210.
- Benhusein, G. M., E. Mutch, et al. (2010). "Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay." *Libyan Journal of Medicine* **5**(1): 1-6.
- Benzie, I. F. F. (2000). "Evolution of antioxidant defence mechanisms." *European Journal of Nutrition* **39**(2): 53-61.
- Berchuck, A. and J. Boyd (1995). "Molecular basis of endometrial cancer." *Cancer* **76**(10 Suppl): 2034-2040.
- Bertini, I., S. Manganl, et al. (1998). Structure and Properties of Copper-Zinc Superoxide Dismutases. **45**: 127-250.
- Beyer, W., J. Imlay, et al. (1991). Superoxide Dismutases. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. E. C. Waldo and M. Kivie, Academic Press. Volume **40**: 221-253.
- Bianchi, M. S., N. O. Bianchi, et al. (1992). "Superoxide dismutase activity and superoxide dismutase-1 gene methylation in normal and tumoral human breast tissues." *Cancer Genetics and Cytogenetics* **59**(1): 26-29.
- Björnstedt, M., J. Xue, et al. (1994). "The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase." *Journal of Biological Chemistry* **269**(47): 29382-29384.
- Blum, J. and I. Fridovich (1985). "Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **240**(2): 500-508.
- Bokhman, J. V. (1983). "Two pathogenetic types of endometrial carcinoma." *Gynecol Oncol* **15**(1): 10-17.
- Bolzán, A. D., M. S. Bianchi, et al. (1997). "Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Human Blood: Influence of Sex, Age and Cigarette Smoking." *Clinical Biochemistry* **30**(6): 449-454.
- Bordo, D., K. Djinović, et al. (1994). "Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family." *Journal of Molecular Biology* **238**(3): 366-386.

- Borgstahl, G. E. O., H. E. Parge, et al. (1992). "The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles." *Cell* **71**(1): 107-118.
- Borrás, C., J. Gambini, et al. (2005). "17 β -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NF κ B cascade." *Aging Cell* **4**(3): 113-118.
- Bostwick, D. G., E. E. Alexander, et al. (2000). "Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer." *Cancer* **89**(1): 123-134.
- Breusing, N. and T. Grune (2008). "Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging." *Biological Chemistry* **389**(3): 203-209.
- Brigelius-Flohé, R. (2006). "Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors." *Biological Chemistry* **387**(10-11): 1329-1335.
- Brigelius-Flohe, R., K. D. Aumann, et al. (1994). "Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence." *Journal of Biological Chemistry* **269**(10): 7342-7348.
- Brigelius-Flohé, R. and A. Kipp (2009). "Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1790**(11): 1555-1568.
- Brinton, L. A., M. L. Berman, et al. (1992). "Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study." *Am J Obstet Gynecol* **167**(5): 1317-1325.
- Brown, M. R., F. J. Miller Jr, et al. (1999). "Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells." *Circulation Research* **85**(6): 524-533.
- Brown, N. S. and R. Bicknell (2001). "Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer." *Breast Cancer Res* **3**(5): 323-327.
- Bull, C., E. C. Niederhoffer, et al. (1991). "Kinetic Studies of Superoxide Dismutases: Properties of the Manganese-Containing Protein from *Thermus thermophilus*." *Journal of the American Chemical Society* **113**(11): 4069-4076.
- Burdon, R. H. (1995). "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation." *Free Radical Biology and Medicine* **18**(4): 775-794.
- Burton, J. L. and M. Wells (1998). "Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium." *Histopathology* **33**(4): 297-303.
- Buzby, G. P., J. L. Mullen, et al. (1980). "Host-tumor interaction and nutrient supply." *Cancer* **45**(12): 2940-2948.
- Cadenas, E. (1997). "Basic mechanisms of antioxidant activity." *Biofactors* **6**(4): 391-397.
- Calvisi, D. F., S. Ladu, et al. (2004). "Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF- α transgenic mouse model of liver cancer." *Journal of Hepatology* **41**(5): 815-822.
- Cannio, R., G. Fiorentino, et al. (2000). "Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra- and extracellular oxidative stress." *Front Biosci* **5**: D768-779.

- Cao, C., Y. Leng, et al. (2003). "Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases." *Biochemistry* **42**(35): 10348-10353.
- Carlioz, A. and D. Touati (1986). "Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?" *The EMBO journal* **5**(3): 623-630.
- Carretero, J., E. Obrador, et al. (1999). "Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells." *Clinical and Experimental Metastasis* **17**(7): 567-574.
- Chakraborty, A. K., M. Ueda, et al. (1993). "Intracellular glutathione and its metabolizing enzyme activities in a metastatic variant melanoma cell line." *Melanoma Research* **2**(5-6): 315-319.
- Chambers, I., J. Frampton, et al. (1986). "The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA." *The EMBO journal* **5**(6): 1221-1227.
- Chan, D. W., V. W. S. Liu, et al. (2008). "Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells." *Carcinogenesis* **29**(9): 1742-1750.
- Chang, K. L., G. S. Crabtree, et al. (1990). "Primary uterine endometrial stromal neoplasms. A clinicopathologic study of 117 cases." *Am J Surg Pathol* **14**(5): 415-438.
- Chang, L. Y., J. W. Slot, et al. (1988). "Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes." *Journal of Cell Biology* **107**(6 I): 2169-2179.
- Chen, N., X. Yi, et al. (2011). "Nrf2 expression in endometrial serous carcinomas and its precancers." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **4**(1): 85-96.
- Chen, Q., M. G. Espey, et al. (2008). "Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(32): 11105-11109.
- Chen, W., X. T. Hu, et al. (2009). "Knockdown of the novel proteasome subunit Adrm1 located on the 20q13 amplicon inhibits colorectal cancer cell migration, survival and tumorigenicity." *Oncol Rep* **21**(2): 531-537.
- Chen, W., Z. Sun, et al. (2009). "Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response." *Mol Cell* **34**(6): 663-673.
- Chen, X., H. Liang, et al. (2004). "Catalase transgenic mice: Characterization and sensitivity to oxidative stress." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **422**(2): 197-210.
- Chen, Y., E. McMillan-Ward, et al. (2007). "Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells." *Cell Death Differ* **15**(1): 171-182.
- Cheng, W. H., Y. S. Ho, et al. (1998). "Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice." *Journal of Nutrition* **128**(7): 1070-1076.
- Cho, C. S., S. Lee, et al. (2010). "Irreversible inactivation of glutathione peroxidase 1 and reversible inactivation of peroxiredoxin II by H₂O₂ in red blood cells." *Antioxid Redox Signal* **12**(11): 1235-1246.

- Cho, H.-Y., S. P. Reddy, et al. (2005). "Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury." *Free Radical Biology and Medicine* **38**(3): 325-343.
- Cho, J. M., S. Manandhar, et al. (2008). "Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance." *Cancer Letters* **260**(1-2): 96-108.
- Chu, F. F., J. H. Doroshow, et al. (1993). "Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI." *Journal of Biological Chemistry* **268**(4): 2571-2576.
- Chu, F. F. and R. S. Esworthy (1995). "The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **323**(2): 288-294.
- Chuang, T. C., J. Y. Liu, et al. (2007). "Human manganese superoxide dismutase suppresses HER2/neu-mediated breast cancer malignancy." *FEBS Lett* **581**(23): 4443-4449.
- Ciriolo, M. R., A. Battistoni, et al. (2001). "Role of the electrostatic loop of Cu,Zn superoxide dismutase in the copper uptake process." *European Journal of Biochemistry* **268**(3): 737-742.
- Clancy, D. and J. Birdsall (2013). "Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing." *Ageing Research Reviews* **12**(1): 404-412.
- Clerch, L. B., D. Massaro, et al. (1998). "Molecular mechanisms of antioxidant enzyme expression in lung during exposure to and recovery from hyperoxia." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **274**(3 18-3): L313-L319.
- Cobanoglu, U., H. Demir, et al. (2010). "Erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in lung cancer." *Asian Pac J Cancer Prev* **11**(5): 1377-1382.
- Cobbs, C. S., D. S. Levi, et al. (1996). "Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors." *Cancer Research* **56**(14): 3192-3195.
- Cohen, G. and P. Hochstein (1963). "Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes." *Biochemistry* **2**(6): 1420-1428.
- Cohen, I., P. Boya, et al. (2004). "Anti-apoptotic activity of the glutathione peroxidase homologue encoded by HIV-1." *Apoptosis* **9**(2): 181-192.
- Copenhaver, E. H. (1959). "Atypical endometrial hyperplasia." *Obstet Gynecol* **13**(3): 264-268.
- Copple, I. M. (2012). "The Keap1-Nrf2 cell defense pathway--a promising therapeutic target?" *Adv Pharmacol* **63**: 43-79.
- Cotgreave, I. A. and R. G. Gerdes (1998). "Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: A molecular link between oxidative stress and cell proliferation?" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **242**(1): 1-9.
- Courneya, K. S., K. H. Karvinen, et al. (2005). "Associations among exercise, body weight, and quality of life in a population-based sample of endometrial cancer survivors." *Gynecol Oncol* **97**(2): 422-430.
- Cramer, S. F. and A. Patel (1990). "The frequency of uterine leiomyomas." *Am J Clin Pathol* **94**(4): 435-438.
- Creasman, W. T., F. Odicino, et al. (2001). "Carcinoma of the corpus uteri." *J Epidemiol Biostat* **6**(1): 47-86.

- Crosbie, E. J., M. Zwahlen, et al. (2010). "Body mass index, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk: a meta-analysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(12): 3119-3130.
- Csar, X. F., N. J. Wilson, et al. (2001). "Copper/zinc superoxide dismutase is phosphorylated and modulated specifically by granulocyte-colony stimulating factor in myeloid cells." *Proteomics* **1**(3): 435-443.
- Cullen, J. J., F. A. Mitros, et al. (2003). "Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: Another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer." *Pancreas* **26**(1): 23-27.
- Dawra, R. K., O. P. Sharma, et al. (1989). "Erythrocyte glutathione and its metabolizing enzymes in bovine urinary bladder cancer." *Cancer Letters* **48**(2): 143-146.
- Dawson, V. L. and T. M. Dawson (1996). "Free radicals and neuronal cell death." *Cell Death Differ* **3**(1): 71-78.
- de Haan, J. B. (2011). "Nrf2 activators as attractive therapeutics for diabetic nephropathy." *Diabetes* **60**(11): 2683-2684.
- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, et al. (2005). "Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes." *Lab Invest* **85**(1): 154-159.
- Deisseroth, A. and A. L. Dounce (1970). "Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role." *Physiological Reviews* **50**(3): 319-375.
- Del Bello, B., A. Paolicchi, et al. (1999). "Hydrogen peroxide produced during γ -glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells." *FASEB Journal* **13**(1): 69-79.
- Delanty, N. and M. A. Dichter (1998). "Oxidative injury in the nervous system." *Acta Neurologica Scandinavica* **98**(3): 145-153.
- Demasi, M. and K. J. A. Davies (2003). "Proteasome inhibitors induce intracellular protein aggregation and cell death by an oxygen-dependent mechanism." *FEBS Letters* **542**(1-3): 89-94.
- Deneke, S. M. and B. L. Fanburg (1989). "Regulation of cellular glutathione." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **257**(3).
- DeNicola, G. M., F. A. Karreth, et al. (2011). "Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis." *Nature* **475**(7354): 106-109.
- DeRose, C. M. and H. G. Claycamp (1991). "Oxidative stress effects on conjugational recombination and mutation in catalase-deficient *Escherichia coli*." *Mutation Research/DNA Repair* **255**(2): 193-200.
- Deshmukh, R. and V. Trivedi (2013). "Methemoglobin exposure produces toxicological effects in macrophages due to multiple ROS spike induced apoptosis." *Toxicology in Vitro* **27**(1): 16-23.
- DeWaay, D. J., C. H. Syrop, et al. (2002). "Natural history of uterine polyps and leiomyomata." *Obstet Gynecol* **100**(1): 3-7.
- Díaz-Flores, M., L. A. Baiza-Gutman, et al. (1999). "Uterine glutathione reductase activity: Modulation by estrogens and progesterone." *Life Sciences* **65**(23): 2481-2488.
- Diaz Vivancos, P., T. Wolff, et al. (2010). "A nuclear glutathione cycle within the cell cycle." *Biochemical Journal* **431**(2): 169-178.

- Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, et al. (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(18): 11908-11913.
- Dinkova-Kostova, A. T. and P. Talalay (2008). "Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins." *Mol Nutr Food Res* **52** Suppl **1**: S128-138.
- Dionigi, A., E. Oliva, et al. (2002). "Endometrial stromal nodules and endometrial stromal tumors with limited infiltration: a clinicopathologic study of 50 cases." *Am J Surg Pathol* **26**(5): 567-581.
- Doll, A., M. Abal, et al. (2008). "Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows." *J Steroid Biochem Mol Biol* **108**(3-5): 221-229.
- Donohue Jr, T. M. and K. L. Barker (1983). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Translational regulation of synthesis and regulation of processing of the enzyme in the uterus by estradiol." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **739**(2): 148-157.
- Dorđević, V. B., D. D. Pavlović, i sar. (2000). *Biohemija slobodnih radikala*. Niš : Medicinski fakultet, (Niš : Sirius-print).
- Dreher, D. and A. F. Junod (1996). "Role of oxygen free radicals in cancer development." *Eur J Cancer* **32A**(1): 30-38.
- Duhan, N. and D. Sirohiwal (2010). "Uterine myomas revisited." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **152**(2): 119-125.
- Durak, I., Y. Bedük, et al. (1997). "Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes in cancerous and non-cancerous human kidney tissues." *International Urology and Nephrology* **29**(1): 5-11.
- Dworski, R., W. Han, et al. (2011). "Vitamin e prevents NRF2 suppression by allergens in asthmatic alveolar macrophages in vivo." *Free Radical Biology and Medicine* **51**(2): 516-521.
- Dym, O. and D. Eisenberg (2001). "Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins." *Protein Science* **10**(9): 1712-1728.
- Edderkaoui, M., P. Hong, et al. (2005). "Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **289**(6 52-6): G1137-G1147.
- Eggler, A. L., G. Liu, et al. (2005). "Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(29): 10070-10075.
- Eguchi, H., N. Fujiwara, et al. (2011). "Hydrogen peroxide enhances LPS-induced nitric oxide production via the expression of interferon beta in BV-2 microglial cells." *Neurosci Lett* **494**(1): 29-33.
- Elchuri, S., T. D. Oberley, et al. (2005). "CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life." *Oncogene* **24**(3): 367-380.
- Epplein, M., S. D. Reed, et al. (2008). "Risk of complex and atypical endometrial hyperplasia in relation to anthropometric measures and reproductive history." *Am J Epidemiol* **168**(6): 563-570.

- Erdem, O., A. Eken, et al. (2012). "Association of GPX1 polymorphism, GPX activity and prostate cancer risk." *Hum Exp Toxicol* **31**(1): 24-31.
- Erickson, A. M., Z. Nevarea, et al. (2002). "Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence." *J Biol Chem* **277**(34): 30730-30737.
- Esworthy, R. S., M. A. Baker, et al. (1995). "Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines." *Cancer Research* **55**(4): 957-962.
- Falck, E., S. Karlsson, et al. (2010). "Loss of glutathione peroxidase 3 expression is correlated with epigenetic mechanisms in endometrial adenocarcinoma." *Cancer Cell Int* **10**: 46.
- Fang, J., T. Seki, et al. (2009). "Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation." *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**(4): 290-302.
- Faraonio, R., P. Vergara, et al. (2006). "p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes." *J Biol Chem* **281**(52): 39776-39784.
- Faucher, K., H. Rabinovitch-Chable, et al. (2005). "Overexpression of human GPX1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothelial cells." *Molecular and Cellular Biochemistry* **277**(1-2): 81-87.
- Ferenczy, A. and M. Gelfand (1989). "The biologic significance of cytologic atypia in progestogen-treated endometrial hyperplasia." *Am J Obstet Gynecol* **160**(1): 126-131.
- Ferguson, S. E., R. A. Soslow, et al. (2006). "Comparison of uterine malignancies that develop during and following tamoxifen therapy." *Gynecol Oncol* **101**(2): 322-326.
- Fiaschi, A. I., A. Cozzolino, et al. (2005). "Glutathione, ascorbic acid and antioxidant enzymes in the tumor tissue and blood of patients with oral squamous cell carcinoma." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **9**(6): 361-367.
- Field, L. S., Y. Furukawa, et al. (2003). "Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria." *Journal of Biological Chemistry* **278**(30): 28052-28059.
- Filomeni, G., K. Aquilano, et al. (2005). "Activation of c-Jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells." *Free Radical Biology and Medicine* **39**(3): 345-354.
- Finch, J. S., M. E. Tome, et al. (2006). "Catalase reverses tumorigenicity in a malignant cell line by an epidermal growth factor receptor pathway." *Free radical biology & medicine* **40**(5): 863-875.
- Flohé, L. (1987). *The selenoprotein glutathione peroxidase in Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects —Part A*. New York, John Wiley & Sons, Inc, .
- Folz, R. J. and J. D. Crapo (1994). "Extracellular superoxide dismutase (SOD3): Tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene." *Genomics* **22**(1): 162-171.
- Forman, H. J. and A. Boveris (1982). *Free Radicals in Biology*. New York, Academic Press.

- Forstrom, J. W., F. H. Stults, et al. (1979). "Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: Reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **193**(1): 51-55.
- Franco, R., O. Schoneveld, et al. (2008). "Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis." *Cancer Letters* **266**(1): 6-11.
- Frenkel, K. (1992). "Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage." *Pharmacology and Therapeutics* **53**(1): 127-166.
- Frezza, M., S. Schmitt, et al. (2011). "Targeting the ubiquitin-proteasome pathway: an emerging concept in cancer therapy." *Curr Top Med Chem* **11**(23): 2888-2905.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." *Annual Review of Biochemistry* **64**: 97-112.
- Frohlich, D. A., M. T. McCabe, et al. (2008). "The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis." *Oncogene* **27**(31): 4353-4362.
- Fukai, T., Z. S. Galis, et al. (1998). "Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis." *Journal of Clinical Investigation* **101**(10): 2101-2111.
- Fukai, T., M. R. Siegfried, et al. (1999). "Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension." *Circulation Research* **85**(1): 23-28.
- Furukawa, M. and Y. Xiong (2005). "BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase." *Mol Cell Biol* **25**(1): 162-171.
- Garaci, E., A. T. Palamara, et al. (1997). "Intracellular GSH content and HIV replication in human macrophages." *Journal of Leukocyte Biology* **62**(1): 54-59.
- Getzoff, E. D., J. A. Tainer, et al. (1990). "Erratum: Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek key β -barrel structural motif (Proteins (1989) 5 (322-336))." *Proteins: Structure, Function and Genetics* **8**(4): 398-399.
- Ghio, A. J., H. B. Suliman, et al. (2002). "Overexpression of extracellular superoxide dismutase decreases lung injury after exposure to oil fly ash." *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **283**(1 27-1): L211-L218.
- Ghosh, J. and C. E. Myers (1998). "Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(22): 13182-13187.
- Giorgio, M., M. Trinei, et al. (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 722-728.
- Giuntoli, R. L., 2nd, D. S. Metzinger, et al. (2003). "Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy." *Gynecol Oncol* **89**(3): 460-469.
- Gladyshev, V. N., V. M. Factor, et al. (1998). "Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251**(2): 488-493.

- Glatzle, D., W. F. Korner, et al. (1970). "Method for the detection of a biochemical riboflavin deficiency. Stimulation of NADPH₂-dependent glutathione reductase from human erythrocytes by FAD in vitro. Investigations on the vitamin B₂ status in healthy people and geriatric patients." *Int Z Vitaminforsch* **40**(2): 166-183.
- Glorieux, C., N. Dejeans, et al. (2011). "Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy." *Biochemical Pharmacology* **82**(10): 1384-1390.
- Gokce, G., G. Ozsarlak-Sozer, et al. (2009). "Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces oxidative damage to DNA in organs of rabbits in vivo." *Biochemistry* **48**(22): 4980-4987.
- Goldstein, S. R., A. Monteagudo, et al. (2002). "Evaluation of endometrial polyps." *Am J Obstet Gynecol* **186**(4): 669-674.
- Gonzales, R., C. Auclair, et al. (1984). "Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases." *Cancer Research* **44**(9): 4137-4139.
- Gopalakrishnan, K., G. Low, et al. (2010). "Hydrogen peroxide induced genomic instability in nucleotide excision repair-deficient lymphoblastoid cells." *Genome Integrity* **1**(1): 16.
- Góth, L. and J. W. Eaton (2000). "Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes." *Lancet* **356**(9244): 1820-1821.
- Grady, D., T. Gebretsadik, et al. (1995). "Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: A meta-analysis." *Obstetrics and Gynecology* **85**(2): 304-313.
- Grandvaux, N., S. Grizot, et al. (1999). "The Ku70 autoantigen interacts with p40phox in a lymphocytes." *Journal of Cell Science* **112**(4): 503-513.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **20**(10): 2175-2183.
- Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." *Free Radical Biology and Medicine* **27**(9-10): 922-935.
- Grimes, D. A. and K. E. Economy (1995). "Primary prevention of gynecologic cancers." *Am J Obstet Gynecol* **172**(1 Pt 1): 227-235.
- Grune, T., T. Reinheckel, et al. (1997). "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells." *FASEB Journal* **11**(7): 526-534.
- Gurin, C. C., M. G. Federici, et al. (1999). "Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma." *Cancer Res* **59**(2): 462-466.
- Guyton, K. Z. and T. W. Kensler (1993). "Oxidative mechanisms in carcinogenesis." *British Medical Bulletin* **49**(3): 523-544.
- Halliwell, B. (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." *J Neurochem* **59**(5): 1609-1623.
- Halliwell, B., M. V. Clement, et al. (2000). "Hydrogen peroxide in the human body." *FEBS Letters* **486**(1): 10-13.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1999). *Free radicals in biology and medicine*. (Second Edition) Oxford, Oxford University Press.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (2007). *Free radicals in biology and medicine*. (Third Edition) Oxford, Oxford University Press.

- Hammond, C. L., T. K. Lee, et al. (2001). "Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes." *Journal of Hepatology* **34**(6): 946-954.
- Han, J. A. and S. C. Park (1999). "Hydrogen peroxide mediates doxorubicin-induced transglutaminase 2 expression in PC-14 human lung cancer cell line." *Experimental and Molecular Medicine* **31**(2): 83-88.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The Hallmarks of Cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Harman, D. (1957). "Prolongation of the normal life span by radiation protection chemicals." *J Gerontol* **12**(3): 257-263.
- Harris, E. D. (1992). "Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase." *Journal of Nutrition* **122**(3 SUPPL.): 636-640.
- Harvey, C. J., R. K. Thimmulappa, et al. (2009). "Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **46**(4): 443-453.
- Harvey, L. J. and H. J. McArdle (2008). "Biomarkers of copper status: a brief update." *Br J Nutr* **99** Suppl 3: S10-13.
- Hasegawa, Y., T. Takano, et al. (2002). "Decreased expression of glutathione peroxidase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma." *Cancer Letters* **182**(1): 69-74.
- Haskins, K., J. Kench, et al. (2004). "Role for Oxidative Stress in the Regeneration of Islet Beta Cells?" *Journal of Investigative Medicine* **52**(1): 45-49.
- Hassan, H. M. (1989). *Microbial Superoxide Dismutases*. Advances in Genetics. T. R. F. W. John G. Scandalios and G. S. John, Academic Press. Volume **26**: 65-97.
- Hatori, N., P. O. Sjoquist, et al. (1992). "Effects of recombinant human extracellular-superoxide dismutase type C on myocardial infarct size in pigs." *Free Radical Biology and Medicine* **13**(3): 221-230.
- He, X., M. G. Chen, et al. (2006). "Arsenic induces NAD(P)H-quinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2-Keap1-Cul3 complex and recruiting Nrf2-Maf to the antioxidant response element enhancer." *Journal of Biological Chemistry* **281**(33): 23620-23631.
- Hendrickson, D. J., J. H. Fisher, et al. (1990). "Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21." *Genomics* **8**(4): 736-738.
- Hendrickson, M., J. Ross, et al. (1982). "Uterine papillary serous carcinoma: a highly malignant form of endometrial adenocarcinoma." *Am J Surg Pathol* **6**(2): 93-108.
- Henle, E. S. and S. Linn (1997). "Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide." *Journal of Biological Chemistry* **272**(31): 19095-19098.
- Hertig, A. T. and S. C. Sommers (1949). "Genesis of endometrial carcinoma. I. Study of Prior Biopsies." *Cancer* **2**(6): 946-956.
- Hirooka, Y. (2008). "Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension." *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* **142**(1-2): 20-24.
- Hirpara, J. L., M. V. Clément, et al. (2001). "Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells." *Journal of Biological Chemistry* **276**(1): 514-521.

- Ho, J. C. M., S. Zheng, et al. (2001). "Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer." *Cancer Research* **61**(23): 8578-8585.
- Ho, Y. S., Y. Xiong, et al. (2004). "Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury." *Journal of Biological Chemistry* **279**(31): 32804-32812.
- Hodgson, E. K. and I. Fridovich (1975). "The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme." *Biochemistry* **14**(24): 5294-5299.
- Holmquist, L., G. Stuchbury, et al. (2007). "Hydrogen peroxide is a true first messenger." *J Neural Transm Suppl*(72): 39-41.
- Honda, T., S. Coppola, et al. (2004). "GSH depletion enhances adenoviral bax-induced apoptosis in lung cancer cells." *Cancer Gene Therapy* **11**(4): 249-255.
- Hong, F., K. E. Sekhar, et al. (2005). "Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation." *Journal of Biological Chemistry* **280**(36): 31768-31775.
- Hong, Y. B., H. J. Kang, et al. (2010). "Nuclear factor (Erythroid-Derived 2)-like 2 regulates drug resistance in pancreatic cancer cells." *Pancreas* **39**(4): 463-472.
- Horn, L. C., S. F. Lax, et al. (2001). "Präkranzeröse Läsionen des Endometriums: Aspekte der molekularen Pathogenese und Probleme der Nomenklatur." *Geburtsh Frauenheilk* **61**(01): 8-14.
- Horn, L. C., U. Schnurrbusch, et al. (2004). "Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment." *Int J Gynecol Cancer* **14**(15086736): 348-353.
- Hottinger, A. F., E. G. Fine, et al. (1997). "The copper chelator d-penicillamine delays onset of disease and extends survival in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." *European Journal of Neuroscience* **9**(7): 1548-1551.
- Hsu, J. L., G. A. Visner, et al. (1992). "Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: Isolation, characterization, and species comparison." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **186**(2): 936-943.
- Hu, R., C. L. L. Saw, et al. (2010). "Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: Antioxidant coupled with antiinflammatory." *Antioxidants and Redox Signaling* **13**(11): 1679-1698.
- Hu, Y., R. V. Benya, et al. (2005). "Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer." *Journal of Nutrition* **135**(12): 3021S-3024S.
- Hu, Y. J., M. E. Dolan, et al. (2004). "Allelic loss at the GPx-1 locus in cancer of the head and neck." *Biological Trace Element Research* **101**(2): 97-106.
- Huang, H. C., T. Nguyen, et al. (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." *Journal of Biological Chemistry* **277**(45): 42769-42774.
- Hubackova, M., R. Vaclavikova, et al. (2012). "Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas." *Int J Cancer* **130**(2): 338-348.
- Hunt, C. R., J. E. Sim, et al. (1998). "Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress." *Cancer Research* **58**(17): 3986-3992.

- Hussain, S. P., P. Amstad, et al. (2004). "p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis." *Cancer Research* **64**(7): 2350-2356.
- Hussain, S. P., L. J. Hofseth, et al. (2003). "Radical causes of cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(4): 276-285.
- Hybertson, B. M., B. Gao, et al. (2011). "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation." *Mol Aspects Med* **32**(4-6): 234-246.
- Imai, H., K. Suzuki, et al. (2001). "Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males." *Biology of Reproduction* **64**(2): 674-683.
- Imlay, J. A. and S. Linn (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." *Science* **240**(4857): 1302-1309.
- Inoue, N., S. Ramasamy, et al. (1996). "Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells." *Circulation Research* **79**(1): 32-37.
- Ishikawa, M., Y. Yaginuma, et al. (1990). "Reactivity of a monoclonal antibody to manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma." *Cancer Research* **50**(8): 2538-2542.
- Isoherranen, K., V. Peltola, et al. (1997). "Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **40**(3): 288-293.
- Iwase, K., A. Nagasaka, et al. (1993). "Localization of Cu/Zn and Mn superoxide dismutase in various thyroid disorders." *Acta Endocrinologica* **129**(6): 573-578.
- Izutani, R., S. Asano, et al. (1998). "Expression of manganese superoxide dismutase in esophageal and gastric cancers." *Journal of Gastroenterology* **33**(6): 816-822.
- Jain, A. K. and A. K. Jaiswal (2006). "Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2." *J Biol Chem* **281**(17): 12132-12142.
- Jang, B.-C., J.-H. Paik, et al. (2005). "Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia." *Cellular Signalling* **17**(5): 625-633.
- Janssen, A. M. L., C. B. Bosman, et al. (1998). "Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients." *Br J Cancer* **78**(8): 1051-1057.
- Janssen, Y. M. W., J. P. Marsh, et al. (1992). "Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica." *Journal of Biological Chemistry* **267**(15): 10625-10630.
- Janssen, Y. M. W., B. Van Houten, et al. (1993). "Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage." *Laboratory Investigation* **69**(3): 261-274.
- Jiang, T., N. Chen, et al. (2010). "High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer." *Cancer Res* **70**(13): 5486-5496.
- Johnson, D. A., S. Amirahmadi, et al. (2010). "The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis." *Toxicological Sciences* **114**(2): 237-246.
- Jung, K. A. and M. K. Kwak (2010). "The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants." *Molecules* **15**(10): 7266-7291.
- Kaaks, R., A. Lukanova, et al. (2002). "Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(12): 1531-1543.

- Kahlos, K., S. Anttila, et al. (1998). "Manganese superoxide dismutase in healthy human pleural mesothelium and in malignant pleural mesothelioma." *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**(4): 570-580.
- Kamerbeek, N. M., R. Van Zwieten, et al. (2007). "Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells." *Blood* **109**(8): 3560-3566.
- Kanazir, D. T., S. B. Pajović, i sar. (2004.). Molekularni mehanizmi stresom indukovanih obolenja kardiovaskularnog sistema Beograd, Srpska akademija nauka i umetnosti.
- Kaneko, T., Y. Iuchi, et al. (2001). "Alteration of glutathione reductase expression in the female reproductive organs during the estrous cycle." *Biology of Reproduction* **65**(5): 1410-1416.
- Karplus, P. A. and G. E. Schulz (1989). "Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2Å resolution." *Journal of Molecular Biology* **210**(1): 163-180.
- Kasapović, J., S. Pejić, et al. (2008). "Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages." *Cell Biochemistry and Function* **26**(6): 723-730.
- Kaufmann, M. (2006). Aktuelle Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie: State of the Art 2006, Zuckschwerdt Verlag.
- Kessova, I. G., Y. S. Ho, et al. (2003). "Alcohol-Induced Liver Injury in Mice Lacking Cu, Zn-Superoxide Dismutase." *Hepatology* **38**(5): 1136-1145.
- Khandrika, L., B. Kumar, et al. (2009). "Oxidative stress in prostate cancer." *Cancer Letters* **282**(2): 125-136.
- Khare, S. D., M. Caplow, et al. (2004). "The rate and equilibrium constants for a multistep reaction sequence for the aggregation of superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(42): 15094-15099.
- Khor, T. O., M.-T. Huang, et al. (2008). "Increased Susceptibility of Nrf2 Knockout Mice to Colitis-Associated Colorectal Cancer." *Cancer Prevention Research* **1**(3): 187-191.
- Khor, T. O., M. T. Huang, et al. (2006). "Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis." *Cancer Res* **66**(24): 11580-11584.
- Kim, D. H., J. K. Kundu, et al. (2011). "Redox modulation of p53: Mechanisms and functional significance." *Molecular Carcinogenesis* **50**(4): 222-234.
- Kim, H. S., T. B. Lee, et al. (2001). "Down-regulation of catalase gene expression in the doxorubicin-resistant aml subline am l-2/dx100." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **281**(1): 109-114.
- Kim, H. T., Y. H. Kim, et al. (1994). "Study of 5'-Flanking Region of Human Cu/Zn Superoxide Dismutase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**(3): 1526-1533.
- Kim, K. H., A. M. Rodriguez, et al. (2001). "Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase." *Antioxid Redox Signal* **3**(3): 361-373.
- Kim, Y. R., J. E. Oh, et al. (2010). "Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin." *Journal of Pathology* **220**(4): 446-451.
- Klaunig, J. E., Y. Xu, et al. (1998). "The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis." *Environmental Health Perspectives* **106**(SUPPL. 1): 289-295.

- Klug, D., J. Rabani, et al. (1972). "A Direct Demonstration of the Catalytic Action of Superoxide Dismutase through the Use of Pulse Radiolysis." *J. Biol. Chem.* **247**(15): 4839-4842.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, et al. (2006). "Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1." *Molecular and Cellular Biology* **26**(1): 221-229.
- Kobayashi, M., L. Li, et al. (2009). "The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds." *Molecular and Cellular Biology* **29**(2): 493-502.
- Kobayashi, M. and M. Yamamoto (2006). Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. **46**: 113-140.
- Koch, W. H. (2004). "Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays." *Nat Rev Drug Discov* **3**(9): 749-761.
- Kohen, R. and A. Nyska (2002). "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." *Toxicol Pathol* **30**(6): 620-650.
- Kolanjiappan, K., S. Manoharan, et al. (2002). "Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients." *Clinica Chimica Acta* **326**(1-2): 143-149.
- Kono, Y. and I. Fridovich (1982). "Superoxide radical inhibits catalase." *Journal of Biological Chemistry* **257**(10): 5751-5754.
- Kryukov, G. V., S. Castellano, et al. (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." *Science* **300**(5624): 1439-1443.
- Kundu, N., S. Zhang, et al. (1995). "Sublethal oxidative stress Inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma." *Clinical and Experimental Metastasis* **13**(1): 16-22.
- Kurman, R. J. and A. U. Blaustein (2002). Blaustein's pathology of the female genital tract. New York, N.Y. ; London, Springer.
- Kurman, R. J., P. F. Kaminski, et al. (1985). "The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients." *Cancer* **56**(2): 403-412.
- Kurokawa, H., M. Sakimoto, et al. (1998). "Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) correlates with prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma." *Fukuoka Igaku Zasshi* **89**(11): 321-327.
- Kwak, M. K., K. Itoh, et al. (2002). "Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter." *Mol Cell Biol* **22**(9): 2883-2892.
- Kwak, M. K. and T. W. Kensler (2006). "Induction of 26S proteasome subunit PSMB5 by the bifunctional inducer 3-methylcholanthrene through the Nrf2-ARE, but not the AhR/Arnt-XRE, pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **345**(4): 1350-1357.
- Kwak, M. K., N. Wakabayashi, et al. (2004). "Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **555**(1-2 SPEC. ISS.): 133-148.
- Kwei, K. A., J. S. Finch, et al. (2004). "Transcriptional repression of catalase in mouse skin tumor progression." *Neoplasia* **6**(5): 440-448.

- Lacey, J. V., Jr., G. L. Mutter, et al. (2008). "Risk of subsequent endometrial carcinoma associated with endometrial intraepithelial neoplasia classification of endometrial biopsies." *Cancer* **113**(8): 2073-2081.
- Lakari, E., P. Pääkkö, et al. (1998). "Manganese superoxide dismutase, but not CuZn superoxide dismutase, is highly expressed in the granulomas of pulmonary sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **158**(2): 589-596.
- Lau, A., N. F. Villeneuve, et al. (2008). "Dual roles of Nrf2 in cancer." *Pharmacological Research* **58**(5-6): 262-270.
- Lau, A., X. J. Wang, et al. (2010). "A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62." *Mol Cell Biol* **30**(13): 3275-3285.
- Lauchlan, S. C. (1981). "Tubal (serous) carcinoma of the endometrium." *Arch Pathol Lab Med* **105**(11): 615-618.
- Lax, S. F., B. Kendall, et al. (2000). "The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways." *Cancer* **88**(4): 814-824.
- Lebovitz, R. M., H. Zhang, et al. (1996). "Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(18): 9782-9787.
- Lecker, S. H., A. L. Goldberg, et al. (2006). "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J Am Soc Nephrol* **17**(7): 1807-1819.
- Lee, I. K., K. A. Kang, et al. (2011). "Mitochondria protection of baicalein against oxidative damage via induction of manganese superoxide dismutase." *Environ Toxicol Pharmacol* **31**(1): 233-241.
- Lee, J. H., T. O. Khor, et al. (2013). "Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression." *Pharmacology & Therapeutics* **137**(2): 153-171.
- Lee, W. Y., C. C. Tzeng, et al. (1994). "Uterine leiomyosarcomas coexistent with cellular and atypical leiomyomata in a young woman during the treatment with luteinizing hormone-releasing hormone agonist." *Gynecol Oncol* **52**(1): 74-79.
- Lethaby, A., J. Suckling, et al. (2004). "Hormone replacement therapy in postmenopausal women: endometrial hyperplasia and irregular bleeding." *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD000402.
- Levanon, D., J. Lieman-Hurwitz, et al. (1985). "Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase." *EMBO Journal* **4**(1): 77-84.
- Levin, E. D., F. H. Brucato, et al. (2000). "Molecular overexpression of extracellular superoxide dismutase increases the dependency of learning and memory performance on motivational state." *Behavior Genetics* **30**(2): 95-100.
- Li, C. and H. M. Zhou (2011). "The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense." *Enzyme Res* **2011**: 387176.
- Li, J., T. Ichikawa, et al. (2009). "Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease." *Expert Opin Ther Targets* **13**(7): 785-794.

- Li, J. M. and A. M. Shah (2002). "Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells." *Journal of Biological Chemistry* **277**(22): 19952-19960.
- Li, M., L. Zhao, et al. (2009). "Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts." *Anat Rec (Hoboken)* **292**(8): 1107-1113.
- Li, S., T. Yan, et al. (2000). "The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase." *Cancer Research* **60**(14): 3927-3939.
- Liaw, K. Y., P. H. Lee, et al. (1997). "Zinc, copper, and superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma." *American Journal of Gastroenterology* **92**(12 SUPPL.): 2260-2263.
- Lim, S. D., C. Sun, et al. (2005). "Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer." *Prostate* **62**(2): 200-207.
- Lin, J., N. R. Cook, et al. (2009). "Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial." *J Natl Cancer Inst* **101**(1): 14-23.
- Lindenau, J., H. Noack, et al. (2000). "Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS." *GLIA* **29**(1): 25-34.
- Liu, H., H. Wang, et al. (2004). "Glutathione Metabolism during Aging and in Alzheimer Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019**(1): 346-349.
- Livak, K. J., S. J. Flood, et al. (1995). "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." *PCR Methods Appl* **4**(6): 357-362.
- Loew, O. (1900). "A new enzyme of general occurrence in organisms." *Science* **11**: 701-702.
- Lu, S. C. (1998). "Regulation of hepatic glutathione synthesis." *Seminars in Liver Disease* **18**(4): 331-343.
- Lu, S. C. (2001). Regulation of glutathione synthesis. *Current Topics in Cellular Regulation*. R. S. Earl and P. B. Chock, Academic Press. Volume **36**: 95-116.
- Lu, Y. P., Y. R. Lou, et al. (1997). "Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase." *Cancer Research* **57**(8): 1468-1474.
- Ludwig, M. L., A. L. Metzger, et al. (1991). "Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Å resolution." *J Mol Biol* **219**(2): 335-358.
- M Flint, B. (1996). "Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration." *Current Opinion in Neurobiology* **6**(5): 661-666.
- Ma, Q., L. Battelli, et al. (2006). "Multiorgan Autoimmune Inflammation, Enhanced Lymphoproliferation, and Impaired Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Mice Lacking the Antioxidant-Activated Transcription Factor Nrf2." *The American Journal of Pathology* **168**(6): 1960-1974.
- Maddaiah, V. T. (1990). "Glutathione correlates with lipid peroxidation in liver mitochondria of triiodothyronine-injected hypophysectomized rats." *FASEB Journal* **4**(5): 1513-1518.
- Maffei, F., C. Angeloni, et al. (2011). "Plasma antioxidant enzymes and clastogenic factors as possible biomarkers of colorectal cancer risk." *Mutat Res* **714**(1-2): 88-92.

- Malhotra, D., R. Thimmulappa, et al. (2009). "Heightened endoplasmic reticulum stress in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease: The role of Nrf2-regulated proteasomal activity." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **180**(12): 1197-1207.
- Manju, V., J. Kalavani Sailaja, et al. (2002). "Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study." *Clinical Biochemistry* **35**(8): 621-625.
- Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* **454**(7203): 436-444.
- Margolin, Y., R. F. Aten, et al. (1990). "Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells." *Endocrinology* **127**(1): 245-250.
- Marklund, S. (1980). "Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids." *Acta Physiol Scand Suppl* **492**: 19-23.
- Marklund, S. L. (1982). "Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(24 I): 7634-7638.
- Marklund, S. L. (1984). "Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species." *Biochemical Journal* **222**(3): 649-655.
- Marklund, S. L. (1984). "Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines." *Journal of Clinical Investigation* **74**(4): 1398-1403.
- Marlhens, F., A. Nicole, et al. (1985). "Lowered level of translatable messenger RNAs for manganese superoxide dismutase in human fibroblasts transformed by SV 40." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **129**(1): 300-305.
- Marsden, D. E. and N. F. Hacker (2003). "The classification, diagnosis and management of endometrial hyperplasia." *Reviews in Gynaecological Practice* **3**(2): 89-97.
- Martin-Montalvo, A., J. M. Villalba, et al. (2011). "NRF2, cancer and calorie restriction." *Oncogene* **30**(5): 505-520.
- Martin, H. L. and P. Teismann (2009). "Glutathione - A review on its role and significance in Parkinson's disease." *FASEB Journal* **23**(10): 3263-3272.
- Martin, R. C., Y. Li, et al. (2010). "Manganese superoxide dismutase expression as a function of genotype and lung cancer pathology." *Cancer Invest* **28**(8): 813-819.
- Masters, C., M. Pegg, et al. (1986). "On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver." *Molecular and Cellular Biochemistry* **70**(2): 113-120.
- MatÉs, J. M., C. Pérez-Gómez, et al. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clinical Biochemistry* **32**(8): 595-603.
- Matzuk, M. M., L. Dionne, et al. (1998). "Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice." *Endocrinology* **139**(9): 4008-4011.
- Mazur, M. T. (2005). "Endometrial hyperplasia/adenocarcinoma. a conventional approach." *Ann Diagn Pathol* **9**(3): 174-181.
- Mazur, M. T. and R. J. Kurman (2005). *Diagnosis of endometrial biopsies and curettings : a practical approach.* New York ; London, Springer.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocytein (hemocuprein)." *Journal of Biological Chemistry* **244**(22): 6049-6055.

- McIlwain, H., J. C. Silverfield, et al. (1989). "Intra-articular orngotein in osteoarthritis of the knee: A placebo-controlled efficacy, safety, and dosage comparison." *The American Journal of Medicine* **87**(3): 295-300.
- McNeill, R. E., N. Miller, et al. (2007). "Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer." *BMC Mol Biol* **8**: 107.
- Meira, L. B., J. M. Bugni, et al. (2008). "DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice." *Journal of Clinical Investigation* **118**(7): 2516-2525.
- Meister, A. (1988). "Glutathione metabolism and its selective modification." *Journal of Biological Chemistry* **263**(33): 17205-17208.
- Mera-Adasme, R., F. Mendizabal, et al. (2012). "Computational studies of the metal-binding site of the wild-type and the H46R mutant of the copper, zinc superoxide dismutase." *Inorg Chem* **51**(10): 5561-5568.
- Merante, F., S. M. Altamentova, et al. (2002). "The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension." *Molecular and Cellular Biochemistry* **229**(1-2): 73-83.
- Meyer, M., R. Schreck, et al. (1993). "H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor." *EMBO J* **12**(5): 2005-2015.
- Miao, W., L. Hu, et al. (2005). "Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes." *J Biol Chem* **280**(21): 20340-20348.
- Mieyal, J. J. and P. B. Chock (2012). "Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: Focus on S-Glutathionylation." *Antioxidants and Redox Signaling* **16**(6): 471-475.
- Miller, A. A., T. M. De Silva, et al. (2007). "Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**(10): 1037-1043.
- Mills, G. C. (1957). "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown." *J Biol Chem* **229**(1): 189-197.
- Min, J. Y., S.-O. Lim, et al. (2010). "Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter." *FEBS Letters* **584**(11): 2427-2432.
- Miyajima, A., J. Nakashima, et al. (1997). "Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells." *Br J Cancer* **76**(2): 206-210.
- Miyazawa, M., T. Ishii, et al. (2009). "The role of mitochondrial superoxide anion (O₂⁻) on physiological aging in C57BL/6J mice." *J Radiat Res (Tokyo)* **50**(1): 73-83.
- Miyazawa, T., T. Suzuki, et al. (1996). "Age-related change of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide levels in normal human red blood cells." *Mechanisms of Ageing and Development* **86**(3): 145-150.
- Moad, G. and D. H. Solomon (2005). *The Chemistry of Radical Polymerization (Second Edition)*. Amsterdam, Elsevier Science Ltd.

- Moghadasian, M. H., H. J. Freeman, et al. (1996). "Endogenous antioxidant status in neoplastic and adjacent tissues in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats: Effects of olsalazine." *Carcinogenesis* **17**(5): 983-987.
- Moi, P., K. Chan, et al. (1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(21): 9926-9930.
- Monks, T. J., M. W. Anders, et al. (1990). "Glutathione conjugate mediated toxicities." *Toxicology and Applied Pharmacology* **106**(1): 1-19.
- Mortensen, A., L. H. Skibsted, et al. (2001). "The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**(1): 13-19.
- Morton, C. C. (2000). "Genetic approaches to the study of uterine leiomyomata." *Environ Health Perspect* **108** Suppl **5**: 775-778.
- Moscow, J. A., L. Schmidt, et al. (1994). "Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer." *Carcinogenesis* **15**(12): 2769-2773.
- Motegi, A., Y. Murakawa, et al. (2009). "The vital link between the ubiquitin-proteasome pathway and DNA repair: impact on cancer therapy." *Cancer Lett* **283**(1): 1-9.
- Motohashi, H., T. O'Connor, et al. (2002). "Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors." *Gene* **294**(1-2): 1-12.
- Motohashi, H. and M. Yamamoto (2004). "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism." *Trends in Molecular Medicine* **10**(11): 549-557.
- Mruk, D., C. H. Cheng, et al. (1998). "Rat testicular extracellular superoxide dismutase: Its purification, cellular distribution, and regulation." *Biology of Reproduction* **59**(2): 298-308.
- Mueller, A. S., S. D. Klomann, et al. (2008). "Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by manipulation of dietary selenium affects the triglyceride concentration in rat liver." *J Nutr* **138**(12): 2328-2336.
- Mueller, S., H. D. Riedel, et al. (1997). "Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes." *Blood* **90**(12): 4973-4978.
- Murawaki, Y., H. Tsuchiya, et al. (2008). "Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer." *Cancer Letters* **259**(2): 218-230.
- Mutter, G. L., R. J. Zaino, et al. (2007). "Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia." *Int J Gynecol Pathol* **26**(2): 103-114.
- Nakada, T., H. Koike, et al. (1987). "Low level of superoxide dismutase activity in pheochromocytoma." *Journal of Urology* **138**(1): 9-13.
- Nakanishi, S., K. Yamane, et al. (2008). "Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans." *Diabetes Research and Clinical Practice* **81**(3): 381-385.
- Nakano, T., K. Oka, et al. (1996). "Manganese superoxide dismutase expression correlates with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy." *Cancer Research* **56**(12): 2771-2775.
- Nakashima, H., M. Yamamoto, et al. (1989). "Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene." *Gene* **79**(2): 279-288.

- Nauseef, W. M. (1999). "The NADPH-dependent oxidase of phagocytes." *Proc Assoc Am Physicians* **111**(5): 373-382.
- Navarro, J., E. Obrador, et al. (1999). "Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(3-4): 410-418.
- Navarro, J., E. Obrador, et al. (1997). "Blood Glutathione as an Index of Radiation-Induced Oxidative Stress in Mice and Humans." *Free Radical Biology and Medicine* **22**(7): 1203-1209.
- Negi, G., A. Kumar, et al. (2011). "Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: Old perspective with a new angle." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **408**(1): 1-5.
- Neiger, R., J. D. Sonek, et al. (2006). "Pregnancy-related changes in the size of uterine leiomyomas." *J Reprod Med* **51**(9): 671-674.
- Nelson, K. K., A. C. Ranganathan, et al. (2003). "Elevated Sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: Evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis." *Clinical Cancer Research* **9**(11): 424-432.
- Nelson, S. K., S. K. Bose, et al. (2006). "The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy." *Free Radical Biology and Medicine* **40**(2): 341-347.
- Nelson, S. K., S. K. Bose, et al. (1994). "The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart." *Free Radical Biology and Medicine* **16**(2): 195-200.
- Nicco, C., A. Laurent, et al. (2005). "Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **59**(4): 169-174.
- Nicholls, P., I. Fita, et al. (2000). *Enzymology and structure of catalases*. *Advances in Inorganic Chemistry*, Academic Press. Volume **51**: 51-106.
- Nioi, P. and T. Nguyen (2007). "A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362**(4): 816-821.
- Nishida, S., F. Akai, et al. (1993). "Manganese superoxide dismutase content and localization in human thyroid tumours." *Journal of Pathology* **169**(3): 341-345.
- Nishikawa, M., A. Tamada, et al. (2004). "Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice." *Clinical and Experimental Metastasis* **21**(3): 213-221.
- Niture, S. K., J. W. Kaspar, et al. (2010). "Nrf2 signaling and cell survival." *Toxicology and Applied Pharmacology* **244**(1): 37-42.
- Nordberg, J. and E. S. J. Arnér (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." *Free Radical Biology and Medicine* **31**(11): 1287-1312.
- Nur, E., M. Verwijs, et al. (2011). "Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812**(11): 1412-1417.
- Ohta, T., K. Iijima, et al. (2008). "Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth." *Cancer Res* **68**(5): 1303-1309.

- Ohye, H. and M. Sugawara (2010). "Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases." *Experimental Biology and Medicine* **235**(4): 424-433.
- Okamoto, M., K. Kawai, et al. (1996). "Transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by hydrogen peroxide." *Cancer Research* **56**(20): 4649-4653.
- Okamoto, M., J. K. Reddy, et al. (1997). "Tumorigenic conversion of a non-tumorigenic rat urothelial cell line by overexpression of H₂O₂-generating peroxisomal fatty acyl-coa oxidase." *International Journal of Cancer* **70**(6): 716-721.
- Olin, K. L., M. S. Golub, et al. (1995). "Extracellular superoxide dismutase activity is affected by dietary zinc intake in nonhuman primate and rodent models." *American Journal of Clinical Nutrition* **61**(6): 1263-1267.
- Oliveira, C. P. M. S., P. Kassab, et al. (2003). "Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer: Reduction of oxidative stress." *World Journal of Gastroenterology* **9**(3): 446-448.
- Ookawara, T., N. Kawamura, et al. (1992). "Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species." *Journal of Biological Chemistry* **267**(26): 18505-18510.
- Oral, H. B., A. J. T. George, et al. (1996). "Prevention of hydrogen peroxide- and cisplatin-induced apoptosis by catalase overexpression." *Biochemical Society Transactions* **24**(4).
- Ortega, A. L., S. Mena, et al. (2011). "Glutathione in Cancer Cell Death." *Cancers* **3**(1): 1285-1310.
- Osburn, W. O., B. Karim, et al. (2007). "Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment." *Int J Cancer* **121**(9): 1883-1891.
- Öztürk, H. S., M. Karaayvaz, et al. (1997). "Activities of the enzymes participating in purine and freeradical metabolism in cancerous human colorectal tissues." *Cancer Biochemistry Biophysics* **16**(1): 157-168.
- Padmanabhan, B., K. I. Tong, et al. (2006). "Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer." *Molecular Cell* **21**(5): 689-700.
- Pae, C. U., S. J. Yoon, et al. (2006). "Manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) gene polymorphism and mood disorders: a preliminary study." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **30**(7): 1326-1329.
- Pajović, S. B., Z. S. Saičić, i sar. (2006). "Antioxidative biomarkers and cancerogenesis." *Jugoslovenska Medicinska Biohemija* **25**(4): 397-402.
- Pallardó, F. V., J. Markovic, et al. (2009). "Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation." *Molecular Aspects of Medicine* **30**(1-2): 77-85.
- Palmer, G. C. (1987). "Free radicals generated by xanthine oxidase-hypoxanthine damage adenylate cyclase and ATPase in gerbil cerebral cortex." *Metab Brain Dis* **2**(4): 243-257.
- Panieri, E., V. Gogvadze, et al. (2013). "Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence." *Free Radic Biol Med*.
- Pardo, C. A., Z. Xu, et al. (1995). "Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(4): 954-958.

- Park, S., X. You, et al. (2005). "Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(26): 9317-9322.
- Parker, W. H., Y. S. Fu, et al. (1994). "Uterine sarcoma in patients operated on for presumed leiomyoma and rapidly growing leiomyoma." *Obstet Gynecol* **83**(3): 414-418.
- Pastore, A., G. Federici, et al. (2003). "Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification." *Clinica Chimica Acta* **333**(1-2): 19-39.
- Pejić, S., J. Kasapović, et al. (2006). "Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of patients with uterine myoma, endometrial polypus, hyperplastic and malignant endometrium." *Biol Res* **39**(4): 619-629.
- Pejić, S., A. Todorović, et al. (2009). "Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrium of patients with polyps, myoma, hyperplasia and adenocarcinoma." *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 149.
- Percy, M. E. (1984). "Catalase: An old enzyme with a new role?" *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **62**(10): 1006-1014.
- Pergola, P. E., P. Raskin, et al. (2011). "Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes." *New England Journal of Medicine* **365**(4): 327-336.
- Perry, A. C. F., R. Jones, et al. (1992). "Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon." *Biochemical Journal* **285**(3): 863-870.
- Perry, R. R., J. Mazetta, et al. (1993). "Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue." *Cancer* **72**(3): 783-787.
- Petersen, S. V., T. Kristensen, et al. (2008). "The folding of human active and inactive extracellular superoxide dismutases is an intracellular event." *J Biol Chem* **283**(22): 15031-15036.
- Petersen, S. V., T. D. Oury, et al. (2003). "The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13875-13880.
- Petković, S. (2004.). *Ginekologija*. Beograd, Elit- Medica.
- Pickering, A. M., R. A. Linder, et al. (2012). "Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28alpha-beta regulator are required for adaptation to oxidative stress." *J Biol Chem* **287**(13): 10021-10031.
- Policastro, L., B. Molinari, et al. (2004). "Imbalance of Antioxidant Enzymes in Tumor Cells and Inhibition of Proliferation and Malignant Features by Scavenging Hydrogen Peroxide." *Molecular Carcinogenesis* **39**(2): 103-113.
- Polytarchou, C., M. Hatzia Apostolou, et al. (2005). "Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affin regulatory peptide gene." *Journal of Biological Chemistry* **280**(49): 40428-40435.
- Primiano, T., T. R. Sutter, et al. (1997). "Redox Regulation of Genes that Protect Against Carcinogens." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **118**(3): 487-497.
- Qian, Y., J. Luo, et al. (2003). "Hydrogen peroxide formation and actin filament reorganization by Cdc42 are essential for ethanol-induced in vitro angiogenesis." *Journal of Biological Chemistry* **278**(18): 16189-16197.

- Quan, F., R. G. Korneluk, et al. (1986). "Isolation and characterization of the human catalase gene." *Nucleic Acids Research* **14**(13): 5321-5335.
- Radonic, A., S. Thulke, et al. (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4): 856-862.
- Ramos-Gomez, M., M. K. Kwak, et al. (2001). "Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(6): 3410-3415.
- Ravindranath, S. D. and I. Fridovich (1975). "Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast." *J Biol Chem* **250**(15): 6107-6112.
- Rebsch, C. M., F. J. Penna, et al. (2006). "Selenoprotein expression is regulated at multiple levels in prostate cells." *Cell Res* **16**(12): 940-948.
- Reddy, N. M., S. R. Kleeberger, et al. (2008). "Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling." *Oncogene* **27**(44): 5821-5832.
- Reddy, N. M., S. R. Kleeberger, et al. (2007). "Genetic dissection of the Nrf2-dependent redox signaling-regulated transcriptional programs of cell proliferation and cytoprotection." *Physiol Genomics* **32**(1): 74-81.
- Reddy, N. M., H. R. Potteti, et al. (2011). "Conditional deletion of nrf2 in airway epithelium exacerbates acute lung injury and impairs the resolution of inflammation." *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**(6): 1161-1168.
- Reimer, D. L., J. Bailey, et al. (1994). "Complete cDNA and 5' genomic sequences and multilevel regulation of the mouse catalase gene." *Genomics* **21**(2): 325-336.
- Reynaert, N. L. (2011). "Glutathione biochemistry in asthma." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1810**(11): 1045-1051.
- Rhee, S. G. (1999). "Redox signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger." *Experimental and Molecular Medicine* **31**(2): 53-59.
- Rhee, S. G., Y. S. Bae, et al. (2000). "Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation." *Science's STKE [electronic resource] : signal transduction knowledge environment* **2000**(53).
- Richmond, R., B. Halliwell, et al. (1981). "Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds." *Analytical Biochemistry* **118**(2): 328-335.
- Riley, J. C. M. and H. R. Behrman (1991). "*In vivo* generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis." *Endocrinology* **128**(4): 1749-1753.
- Robboy, S. J., R. C. Bentley, et al. (2000). "Pathology and pathophysiology of uterine smooth-muscle tumors." *Environ Health Perspect* **108 Suppl 5**: 779-784.
- Roberts, V. A., C. L. Fisher, et al. (1991). "Mechanism and atomic structure of superoxide dismutase." *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 1**: 269-278.
- Roebuck, K. A. (1999). "Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review)." *International Journal of Molecular Medicine* **4**(3): 223-230.
- Rosin, M. P., S. Saad El Din Zaki, et al. (1994). "Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **305**(2): 283-292.

- Rotilio, G., R. C. Bray, et al. (1972). "A pulse radiolysis study of superoxide dismutase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **268**(2): 605-609.
- Roum, J. H., R. Buhl, et al. (1993). "Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis." *Journal of Applied Physiology* **75**(6): 2419-2424.
- Roy H, B. (1995). "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation." *Free Radical Biology and Medicine* **18**(4): 775-794.
- Ryan, A. J., B. Susil, et al. (2005). "Endometrial cancer." *Cell Tissue Res* **322**(1): 53-61.
- Sasaki, Y. (2006). "Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma?" *Journal of Gastroenterology* **41**(12): 1135-1148.
- Sasano, H., A. Mizorogi, et al. (1999). "Superoxide Dismutase in Human Adrenal and its Disorders: A Correlation with Development and Neoplastic Changes." *Endocr Pathol* **10**(4): 325-333.
- Sato, K., K. Ito, et al. (1992). "Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells." *Molecular and Cellular Biology* **12**(6): 2525-2533.
- Satomi, A., S. Murakami, et al. (1995). "Significance of superoxide dismutase (SOD) in human colorectal cancer tissue: Correlation with malignant intensity." *Journal of Gastroenterology* **30**(2): 177-182.
- Sattler, W., M. Maiorino, et al. (1994). "Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and abselen (PZ 51)." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **309**(2): 214-221.
- Saydam, N., A. Kirb, et al. (1997). "Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues." *Cancer Letters* **119**(1): 13-19.
- Schadendorf, D., T. Zuberbier, et al. (1995). "Serum manganese superoxide dismutase is a new tumour marker for malignant melanoma." *Melanoma Research* **5**(5): 351-353.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." *Free Radical Biology and Medicine* **30**(11): 1191-1212.
- Schetter, A. J., N. H. H. Heegaard, et al. (2010). "Inflammation and cancer: Interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways." *Carcinogenesis* **31**(1): 37-49.
- Schmutz, S. M., D. Cornwall, et al. (1996). "Physical mapping of SOD1 to bovine chromosome." *Cytogenetics and Cell Genetics* **72**(1): 37-39.
- Schor, N. F. (1988). "Inactivation of mammalian brain glutamine synthetase by oxygen radicals." *Brain Research* **456**(1): 17-21.
- Schriner, S. E., N. J. Linford, et al. (2005). "Medecine: Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." *Science* **308**(5730): 1909-1911.
- Schulte-Hermann, R., I. Timmermann-Trosiener, et al. (1990). "DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion." *Cancer Research* **50**(16): 5127-5135.
- Schutte, R., A. E. Schutte, et al. (2009). "Blood Glutathione and Subclinical Atherosclerosis in African Men: The SABPA Study." *Am J Hypertens* **22**(11): 1154-1159.

- Ścibior, D., M. Skrzycki, et al. (2008). "Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors." *Clinical Biochemistry* **41**(10–11): 852-858.
- Senthil, K., S. Aranganathan, et al. (2004). "Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients." *Clinica Chimica Acta* **339**(1–2): 27-32.
- Shacter, E., E. J. Beecham, et al. (1988). "Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells." *Carcinogenesis* **9**(12): 2297-2304.
- Sherman, M. E., P. Bitterman, et al. (1992). "Uterine serous carcinoma. A morphologically diverse neoplasm with unifying clinicopathologic features." *Am J Surg Pathol* **16**(6): 600-610.
- Shibata, T., A. Kokubu, et al. (2008). "Genetic Alteration of Keap1 Confers Constitutive Nrf2 Activation and Resistance to Chemotherapy in Gallbladder Cancer." *Gastroenterology* **135**(4): 1358-1368.e1354.
- Shih, A. Y., H. Erb, et al. (2006). "Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation." *J Neurosci* **26**(41): 10514-10523.
- Shimoda-Matsubayashi, S., H. Matsumine, et al. (1996). "Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene: A Predictive Evidence for Conformational Change to Influence Mitochondrial Transport and a Study of Allelic Association in Parkinson's Disease." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **226**(2): 561-565.
- Shingu, M., T. Todoroki, et al. (1987). "Generation of superoxide by immunologically stimulated normal human neutrophils and possible modulation by intracellular and extracellular SOD and rheumatoid factors." *Inflammation* **11**(2): 143-151.
- Shkolnik, K., A. Tadmor, et al. (2011). "Reactive oxygen species are indispensable in ovulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(4): 1462-1467.
- Shull, S., N. H. Heintz, et al. (1991). "Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants." *Journal of Biological Chemistry* **266**(36): 24398-24403.
- Sies, H. (1999). "Glutathione and its role in cellular functions." *Free Radical Biology and Medicine* **27**(9-10): 916-921.
- Sies, H. and T. P. Akerboom (1984). "Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues." *Methods Enzymol* **105**: 445-451.
- Silverberg, S. G. and R. J. Kurman (1992). *Tumors of the uterine corpus and gestational trophoblastic disease*. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology.
- Simizu, S., M. Takada, et al. (1998). "Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs." *Journal of Biological Chemistry* **273**(41): 26900-26907.
- Singh, A., S. Boldin-Adamsky, et al. (2008). "RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy." *Cancer Res* **68**(19): 7975-7984.
- Singh, I. (1997). "Biochemistry of peroxisomes in health and disease." *Molecular and Cellular Biochemistry* **167**(1-2): 1-29.
- Skrzycki, M. and H. Czczot (2007). "Superoxide dismutase as a potential therapeutic agent." *Advances in Clinical and Experimental Medicine* **16**(4): 561-568.

- Skrzydłewska, E., A. Stankiewicz, et al. (2001). "Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* **64**(3): 213-222.
- Skrzydłewska, E., S. Sulkowski, et al. (2005). "Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer." *World J Gastroenterol* **11**(3): 403-406.
- Slocum, S. L. and T. W. Kensler (2011). "Nrf2: Control of sensitivity to carcinogens." *Archives of Toxicology* **85**(4): 273-284.
- Spooren, A. A. and C. T. Evelo (1998). "Only the glutathione dependent antioxidant enzymes are inhibited by haematotoxic hydroxylamines." *Hum Exp Toxicol* **17**(10): 554-559.
- Steinman, H. M., L. Weinstein, et al. (1994). "The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA." *J Biol Chem* **269**(46): 28629-28634.
- Stralin, P. and S. L. Marklund (1994). "Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts." *Biochemical Journal* **298**(2): 347-352.
- Strålin, P. and S. L. Marklund (2000). "Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells." *Atherosclerosis* **151**(2): 433-441.
- Strauss Iii, J. F. and B. A. Lessey (2009). *The Structure, Function, and Evaluation of the Female Reproductive Tract. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (6th Edition). Philadelphia, W.B. Saunders: 191-233.
- Sturtz, L. A., K. Diekert, et al. (2001). "A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage." *Journal of Biological Chemistry* **276**(41): 38084-38089.
- Subramani, S. (1993). "Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle." *Annual Review of Cell Biology* **9**: 445-478.
- Sun, Y. (1990). "Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis." *Free Radical Biology and Medicine* **8**(6): 583-599.
- Suresh, S. (1996). "Convergence of model systems for peroxisome biogenesis." *Current Opinion in Cell Biology* **8**(4): 513-518.
- Suthanthiran, M., M. E. Anderson, et al. (1990). "Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(9): 3343-3347.
- Suzukawa, K., K. Miura, et al. (2000). "Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species." *Journal of Biological Chemistry* **275**(18): 13175-13178.
- Swanson, L. V. and K. L. Barker (1983). "Antagonistic effects of progesterone on estradiol-induced synthesis and degradation of uterine glucose-6-phosphate dehydrogenase." *Endocrinology* **112**(2): 459-465.
- Switala, J. and P. C. Loewen (2002). "Diversity of properties among catalases." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **401**(2): 145-154.
- Szatrowski, T. P. and C. F. Nathan (1991). "Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells." *Cancer Research* **51**(3): 794-798.

- Szymczyk, K. H., B. A. Kerr, et al. (2006). "Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation and apoptosis of preosteoclastic cells exposed to arsenite." *Biochem Pharmacol* **72**(6): 761-769.
- Štajn, A. Š., R. V. Žikić, i sar. (2007). *Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja*, Prirodno-matematički fakultet.
- Tainer, J. A., E. D. Getzoff, et al. (1982). "Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase." *Journal of Molecular Biology* **160**(2): 181-217.
- Takahashi, K., N. Avissar, et al. (1987). "Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **256**(2): 677-686.
- Tavassoli, F. A. and P. Devilee (2003). *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Lyon, IARC Press.
- Te Linde, R. W., H. W. Jones, et al. (1953). "What are the earliest endometrial changes to justify a diagnosis of endometrial cancer?" *Am J Obstet Gynecol* **66**(5): 953-969.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(6): L1005-1028.
- Thomas, J. P., M. Maiorino, et al. (1990). "Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides." *Journal of Biological Chemistry* **265**(1): 454-461.
- Thome, J., W. Gsell, et al. (1997). "Oxidative-stress associated parameters (lactoferrin, superoxide dismutases) in serum of patients with Alzheimer's disease." *Life Sci* **60**(1): 13-19.
- Thor, A. (1996). "Diagnosis of endometrial biopsies and curettings: A practical approach : Michael T. Mazur and Robert J. Kurman. New York, Springer-Verlag.
- Todorovic-Rakovic, N. (2011). "Genome-based versus gene-based theory of cancer: Possible implications for clinical practice." *J Biosci* **36**(4): 719-724.
- Tong, K. I., Y. Katoh, et al. (2006). "Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: Characterization of the two-site molecular recognition model." *Molecular and Cellular Biology* **26**(8): 2887-2900.
- Touati, D. and S. B. Farr (1990). Elevated mutagenesis in bacterial mutants lacking superoxide dismutase. *Methods in Enzymology*. A. N. G. Lester Packer, Academic Press. Volume **186**: 646-651.
- Toussaint, O., A. Houbion, et al. (1993). "Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity." *Toxicology* **81**(2): 89-101.
- Trachootham, D., W. Lu, et al. (2008). "Redox regulation of cell survival." *Antioxidants and Redox Signaling* **10**(8): 1343-1374.
- Tsan, M. F. (2001). "Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review)." *International journal of molecular medicine* **7**(1): 13-19.
- Tu, Y., C. Chen, et al. (2012). "The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis." *Int J Clin Exp Pathol* **5**(8): 726-738.

- Umemura, T., Y. Kuroiwa, et al. (2006). "A crucial role of Nrf2 in in vivo defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol." *Toxicological Sciences* **90**(1): 111-119.
- Ursini, F. and A. Bindoli (1987). "The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes." *Chemistry and Physics of Lipids* **44**(2-4): 255-276.
- Ursini, F., M. Maiorino, et al. (1985). "The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **839**(1): 62-70.
- Valentine, J. S., P. A. Doucette, et al. (2005). Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **74**: 563-593.
- Valko, M., M. Izakovic, et al. (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Mol Cell Biochem* **266**(1-2): 37-56.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* **160**(1): 1-40.
- Van Driel, B. E. M., H. Lyon, et al. (1997). "Expression of CuZn- and Mn-Superoxide Dismutase in Human Colorectal Neoplasms." *Free Radical Biology and Medicine* **23**(3): 435-444.
- Ventriglia, M., L. Bocchio Chiavetto, et al. (2005). "Lack of association between MnSOD gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease." *Aging Clin Exp Res* **17**(6): 445-448.
- Viña, J., C. Borrás, et al. (2005). "Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds." *FEBS Letters* **579**(12): 2541-2545.
- Voss, P. and T. Grune (2007). "The nuclear proteasome and the degradation of oxidatively damaged proteins." *Amino Acids* **32**(4): 527-534.
- Wakabayashi, N., A. T. Dinkova-Kostova, et al. (2004). "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(7): 2040-2045.
- Wallach, E. E. and N. F. Vlahos (2004). "Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management." *Obstet Gynecol* **104**(2): 393-406.
- Wan, X. S., M. N. Devalaraja, et al. (1994). "Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene." *DNA and Cell Biology* **13**(11): 1127-1136.
- Wang, R., J. An, et al. (2008). "Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **373**(1): 151-154.
- Wang, T. G., Y. Gotoh, et al. (2000). "Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance." *FASEB J* **14**(11): 1567-1576.
- Wang, X.-J., Z. Sun, et al. (2008). "Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2." *Carcinogenesis* **29**(6): 1235-1243.
- Weisiger, R. A. and I. Fridovich (1973). "Superoxide dismutase. Organelle specificity." *J Biol Chem* **248**(10): 3582-3592.

- Weitzman, S. A. and L. I. Gordon (1990). "Inflammation and cancer: Role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis." *Blood* **76**(4): 655-663.
- Wen, J. J., M. Dhiman, et al. (2008). "Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice." *Microbes Infect* **10**(10-11): 1201-1209.
- Wilcox, K. C., L. Zhou, et al. (2009). "Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes: A possible role in amyotrophic lateral sclerosis." *Journal of Biological Chemistry* **284**(20): 13940-13947.
- Worthington, D. J. and M. A. Rosemeyer (1975). "Glutathione Reductase from Human Erythrocytes." *European Journal of Biochemistry* **60**(2): 459-466.
- Wu, G., Y. Z. Fang, et al. (2004). "Glutathione Metabolism and Its Implications for Health." *Journal of Nutrition* **134**(3): 489-492.
- Xu, C., M. T. Huang, et al. (2006). "Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2." *Cancer Res* **66**(16): 8293-8296.
- Yamada, M., K. Hashinaka, et al. (1991). "Expression of catalase and myeloperoxidase genes in hydrogen peroxide-resistant HL-60 cells." *DNA Cell Biol* **10**(10): 735-742.
- Yamakura, F., T. Matsumoto, et al. (2001). "Modification of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite in the presence of bicarbonate." *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1548**(1): 38-46.
- Yamakura, F., T. Matsumoto, et al. (2005). "Nitrated and oxidized products of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase treated with either peroxynitrite-carbon dioxide or myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite." *Journal of Biochemistry* **138**(1): 57-69.
- Yamamoto, Y. and K. Takahashi (1993). "Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **305**(2): 541-545.
- Yang, A. H., T. D. Oberley, et al. (1987). "*In vitro* modulation of antioxidant enzymes in normal and malignant renal epithelium." *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* **23**(8): 546-558.
- Yeh, C. C. (1998). "Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene." *DNA and Cell Biology* **17**(11): 921-930.
- Yeh, C. C., M. F. Hou, et al. (2005). "Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer." *Clin Chim Acta* **361**(1-2): 104-111.
- Yi, X. and W. Zheng (2008). "Endometrial glandular dysplasia and endometrial intraepithelial neoplasia." *Curr Opin Obstet Gynecol* **20**(1): 20-25.
- Yin, G. Y., Y. F. Yin, et al. (1995). "Effect of zhuchun pill on immunity and endocrine function of elderly with kidney-yang deficiency." *Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi = Chinese journal of integrated traditional and Western medicine / Zhongguo Zhong xi yi jie he xue hui, Zhongguo Zhong yi yan jiu yuan zhu ban* **15**(10): 601-603.

- Yoo, H. Y., M. S. Chang, et al. (1999). "Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element." *Molecular and General Genetics* **262**(2): 310-313.
- Yoshimura, S., K. Watanabe, et al. (1991). "Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney." *Journal of Biochemistry* **109**(6): 918-923.
- Yoshizaki, N., Y. Mogi, et al. (1994). "Suppressive effect of recombinant human Cu, Zn-superoxide dismutase on lung metastasis of murine tumor cells." *International Journal of Cancer* **57**(2): 287-292.
- You, A., C.-w. Nam, et al. (2011). "Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **507**(2): 356-364.
- Yu, S., T. O. Khor, et al. (2010). "Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice." *PLoS One* **5**(1): e8579.
- Zelko, I. N., T. J. Mariani, et al. (2002). "Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." *Free Radical Biology and Medicine* **33**(3): 337-349.
- Zhang, D. D., S. C. Lo, et al. (2004). "Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex." *Molecular and Cellular Biology* **24**(24): 10941-10953.
- Zhang, Q., J. Pi, et al. (2010). "A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response." *Toxicology and Applied Pharmacology* **244**(1): 84-97.
- Zhao, Y., T. Seefeldt, et al. (2009). "Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X-ray irradiation." *Free Radical Biology and Medicine* **47**(2): 176-183.
- Ziech, D., R. Franco, et al. (2010). "The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development." *Chem Biol Interact* **188**(2): 334-339.
- Žikić, R. V., A. Š. Štajn, et al. (2000). Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja, Prirodno-matematički fakultet.
- Zimmerman, R. and P. Cerutti (1984). "Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T 1/2 /C18 fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**(7 I): 2085-2087.

PRILOZI

STRUČNA BIOGRAFIJA

Ana U. Todorović je rođena 21.01.1970. godine u Požarevcu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Školske 1988/89. godine upisala je studije na smeru Biohemija, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 05. 07. 1996. odbranom diplomskog rada pod naslovom: „Uticaj insulina na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u mrkom masnom tkivu i hipokampusu intaktnih i hemijski simpatektomisanih životinja“ urađenog na Katedri za fiziologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Vukosave Davidović. Prosečna ocena u toku studija bila je 8,54, a ocena na diplomskom ispitu 10. Školske 1998/99. godine Ana Todorović je upisala poslediplomske studije na smeru Molekularna biologija i biohemija, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Magistarski rad pod naslovom: „Uloga antioksidativnih enzima u radiološkom odgovoru nervnog tkiva pacova“ uradila je pod rukovodstvom prof. dr Snežane Pajović i prof. dr Ratka Radojičića, u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke "Vinča", a odbranila ga 16.02.2006. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Ana Todorović je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke "Vinča" zaposlena na određeno vreme od 20. oktobra 1998. godine, a od 10. oktobra 2001. je u stalnom radnom odnosu.

Do sada je publikovala 15 radova u naučnim časopisima i 35 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova. Trenutno je angažovana na sledećim projektima Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije: 1) Ćelijske i molekulske osnove malignih i kardiovaskularnih oboljenja – kliničke implikacije (III41027); 2) Molekularno fiziološki biomonitoring aerobnih organizama zasnovan na određivanju biohemijskih biomarkera oksidacionog stresa (ON173041).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Тодоровић

Број индекса или пријаве докторске дисертације _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Експресија антиоксидативних ензима и транскрипционог фактора Nrf2 код пацијенткиња са бенигно, премалигно и малигно трансформисаним ендометријумом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 20.02.2013.

Потпис докторанда



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора Ана Тодоровић

Број индекса или пријаве докторске дисертације _____

Студијски програм _____

Наслов докторске дисертације Експресија антиоксидативних ензима и
транскрипционог фактора Nrf2 код пацијенткиња са бенигно, премалигно и
малигно трансформисаним ендометријумом

Ментори

др Снежана Пејић, научни сарадник Института за нуклеарне науке "Винча",
Универзитета у Београду

др Синиша Ђурашевић, ванредни професор Биолошког факултета, Универзитета у
Београду

Потписани/а Ана Тодоровић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 20.02.2013.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Експресија антиоксидативних ензима и транскрипционог фактора Nrf2 код пацијенткиња са бенигно, премалигно и малигно трансформисаним ендометријумом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

У Београду, 20. 02. 2013.

Потпис докторанда

Ана Богдановић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.