

# Pseudokolinesteraza i pokazatelji oksidacijskoga stresa u djece s tumorskom bolešću u središnjem živčanom sustavu

---

Mikecin, Lili

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:750498>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Lili Mikecin**

**Pseudokolinesteraza i pokazatelji  
oksidacijskoga stresa  
u djece s tumorskom bolešću  
u središnjem živčanom sustavu**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2017**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Lili Mikecin**

**Pseudokolinesteraza i pokazatelji  
oksidacijskoga stresa  
u djece s tumorskom bolešću  
u središnjem živčanom sustavu**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2017**

Disertacija je izrađena u Referentnom centru za solidne tumore  
Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi , Klinike za dječje bolesti Zagreb

Voditelj rada: doc.dr.sc. Jasminka Stepan Giljević

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Jasminki Stepan Giljević na svoj stručnoj te posebno moralnoj i prijateljskoj pomoći oko izrade ove disertacije što mi je olakšalo provedbu istraživanja.

Zahvaljujem se dr. sc. Alici Pizent i dr.sc. Dubravki Flajs s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu; dr. sc. Jasni Leniček Krleža i svim djelatnicima Biokemijskog laboratorija Klinike za dječje bolesti Zagreb na pomoći oko laboratorijskih postupaka.

Zahvalila bih se kolegama i suradnicima u Klinici za dječje bolesti Zagreb iz Jedinice intenzivnog liječenja, Referentnom centru za solidne tumore Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi i dr.sc. Miroslavu Gjurašinu koji su mi svim srcem i nesebično pomagali u prikupljanju uzoraka.

Hvala mojoj kćeri Miji na razumijevanju za svo vrijeme koje nismo provele zajedno.

Tekst je lektorirala prof. Koraljka Sopta, Ministarstvo kulture Republike Hrvatske

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 1.1 KOLINESTERAZE.....   | 1  |
| 1.1.1 Pseudokolinesteraza.....   | 2  |
| 1.1.1.1 Pseudokolinesteraza u središnjem živčanom sustavu.....   | 3  |
| 1.1.1.2 Pseudokolinesteraza i tumorogeneza.....  | 4  |
| 1.2 OSTALE AKTIVNOSTI PSEUDOKOLINESTERAZE.....   | 5  |
| 1.3 OKSIDACIJSKI STRES.....  | 6  |
| 1.3.1 Lipidna peroksidacija.....   | 7  |
| 1.3.2 Malondialdehid (MDA).....  | 8  |
| 1.3.3 Antioksidacijski sistem obrane.....  | 9  |
| 1.3.3.1 Antioksidansi – čistači (scavenger).....   | 9  |
| 1.3.3.1.1 Superoksid dizmutaza (SOD).....  | 10 |
| 1.3.3.1.2 Katalaza (CAT).....  | 10 |
| 1.3.3.1.3 Glutation peroksidaza (GPx).....   | 11 |
| 1.3.3.2 Antioksidansi čistači – male molekule.....   | 12 |
| 1.3.4 Oksidacijski stres i tumorogeneza.....   | 13 |
| 1.3.4.1 Sustav zaštite od tumorogeneze.....  | 16 |
| 1.4 TUMORI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA.....  | 17 |
| 1.4.1 Klasifikacija tumora središnjeg živčanog sustava prema Svjetskoj<br>zdravstvenoj organizaciji iz 2007. godine..... | 17 |
| 1.4.2 TUMORI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA U DJECE.....  | 21 |
| 1.4.2.1 Gliomi niskog gradusa (eng. low grade).....  | 21 |
| 1.4.2.1.1 Astroцитomi.....   | 22 |
| 1.4.2.1.1.1 Astroцитomi I i II gradusa.....  | 22 |
| 1.4.2.1.1.2 Ostali astroцитomi niskog gradusa.....   | 23 |
| 1.4.2.1.2 Cerebelarni astroцитom.....  | 24 |
| 1.4.2.1.3 Gliomi optičkog puta.....  | 25 |
| 1.4.2.1.4 Oligodendrogliomi.....   | 26 |
| 1.4.2.2 Gliomi visokog gradusa (eng. high grade glioma).....   | 27 |
| 1.4.2.3 Gliomi moždanog debla.....   | 28 |
| 1.4.2.4 Ependimomi.....  | 29 |
| 1.4.2.5 Embrionalni tumori.....  | 30 |
| 1.4.2.5.1 Meduloblastom.....   | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.2.5.2 Atipični teratoidni tumor.....   | 31 |
| 1.4.2.5.3 Drugi embrionalni tumori.....  | 31 |
| 1.4.2.5.3.1 Pineoblastom.....  | 31 |
| 1.4.2.5.4 Ostali nonpinealni embrionalni tumori.....                                       | 32 |
| 1.4.2.5.4.1 Intrakranijalni germ cell tumori.....  | 32 |
| 1.4.2.5.4.2 Kraniofaringeom.....   | 33 |
| 1.4.2.6 Neuronalni tumori.....   | 33 |
| 1.4.2.6.1 Gangliom i gangliocitom.....   | 33 |
| 1.4.2.7 Disembrioplastični neuroepitelijalni tumor.....                                    | 33 |
| 1.3.2.8.3 Centralni neurocitom.....  | 34 |
| 1.4.2.8 Tumori korioidnog pleksusa.....  | 34 |
| 1.4.2.9 Intramedularni tumori leđne moždine.....   | 34 |
| 1.4.2.9.1.1 Ependimomi.....  | 34 |
| 1.4.2.9.2 Astrocitomi.....   | 34 |
| 1.4.2.10 Rijetki tumori.....   | 35 |
| 1.4.2.10.1 Meningeomi.....   | 35 |
| 1.4.2.10.2 Pituitarni adenomi u djece.....   | 35 |
| 1.4.2.10.3 Primarni limfomi središnjeg živčanog sustava (Primar CNS lymphoma - PCNSL)..... | 35 |
| 1.4.2.10.4 Hemangioblastomi.....   | 36 |
| 1.4.2.11 Neurokutani sindromi povezani sa tumorima SŽS.....                                | 36 |
| 1.4.2.11.1 Neurofibromatoza tip 1.....   | 36 |
| 1.4.2.11.2 Neurofibromatoza tip 2.....   | 37 |
| 1.4.2.11.3 Komplex tuberozne skleroze.....   | 37 |
| 1.4.2.11.4 Ataksija teleangiektazija.....  | 37 |
| 1.4.2.11.5 Von Hippel Lindau sindrom.....  | 37 |
| 1.4.2.11.6 Sturge Weber sindrom.....   | 37 |
| 1.5 BIOMARKERI.....  | 38 |
| 2. HIPOTEZA.....   | 39 |
| 3. CILJEVI RADA.....   | 40 |
| 4. ISPITANICI I METODE.....  | 41 |
| 4.1 ISPITANICI.....  | 41 |
| 4.2 PRIKUPLJANJE I OBRADA UZORAKA.....   | 43 |
| 4.3 OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA.....  | 43 |
| 4.4 ANALIZA UZORAKA.....   | 44 |
| 4.4.1 Analiza pseudokolinesteraze.....   | 44 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.4.2 Analiza enzima - kemikalije za analizu enzima.....  | 44  |
| 4.4.2.1 Analiza lipidne peroksidacije – malondialdehida.....                                      | 44  |
| 4.4.2.2 Metoda za određivanje aktivnosti glutation peroksidaze.....                               | 44  |
| 4.4.2.3 Metoda za određivanje aktivnosti katalaze.....  | 45  |
| 4.4.2.4 Metoda za određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze.....                                | 45  |
| 4.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....  | 46  |
| 5. REZULTATI.....   | 47  |
| 5.1 REZULTATI ZA PSEUDOKOLINESTERAZU.....   | 47  |
| 5.2 REZULTATI ZA ENZIME OKSIDACIJSKOG STRESA I MDA.....   | 54  |
| 5.2.1 Rezultati za GPx u plazmi i likvoru.....  | 55  |
| 5.2.2 Rezultati za CAT u krvi u plazmi i likvoru.....   | 57  |
| 5.2.3 Rezultati za MDA u plazmi i likvoru.....  | 59  |
| 5.2.4 Rezultati za SOD u krvi u plazmi i likvoru.....   | 61  |
| 6. RASPRAVA.....  | 67  |
| 6.1 PSEUDOKOLINESTERAZA KAO BIOMARKER SOLIDNIH TUMORA<br>SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA U DJECE..... | 68  |
| 6.2 ENZIMI OKSIDACIJSKOG STRESA KAO BIOMARKERI SOLIDNIH<br>TUMORA SŽS U DJECE.....                | 70  |
| 6.2.1 Lijekovi.....   | 71  |
| 6.2.2 Malondialdehid.....   | 72  |
| 6.2.3 Glutation peroksidaza.....  | 72  |
| 6.2.4 Katalaza.....   | 76  |
| 6.2.5 Superoksid dizmutaza.....   | 77  |
| 7. ZAKLJUČAK.....   | 80  |
| 8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU.....  | 83  |
| 9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU.....  | 85  |
| 10. POPIS LITERATURE.....   | 87  |
| 11. BIOGRAFIJA.....   | 108 |

## POPIS OZNAKA I KRATICA

|        |  |
|--------|--|
| SŽS    | središnji živčani sustav   |
| ACh    | acetilkolin  |
| AchE   | acetilkolinesetraza  |
| PchE   | pseudokolinesetaza   |
| OS     | oksidacijski stres   |
| ROS    | reaktivni spojevi kisika (eng. reactive oxygen species)                  |
| RNS    | reaktivni spojevi dušika (eng. reactive nitrogen species)                |
| PET    | pozitronska tomografija (eng. positron emission tomography)              |
| DNK    | deoksiribonukleinska kiselina  |
| PUFA   | polinezasićene masne kiseline (eng. polyunsaturated fatty acids)         |
| MDA    | malondialdehid   |
| 4-HNE  | 4 hidroksinonenal  |
| ALE    | krajnji produkti lipoksidacije (eng. advanced lipoxidation end products) |
| ADS    | antioksidacijski sistem obrane (eng. Antioxydant defense system)         |
| SOD    | superoksid dismutaza   |
| CAT    | katalaza   |
| Gpx    | glutation peroksidaza  |
| NADPH  | nikotinamid adenin dinukleotid   |
| UVB    | ultraljubičasto B zračenje   |
| GSH    | glutation  |
| NfκB   | nuklearni faktor kappa B   |
| TNF α  | tumor nekrotizirajući faktor alfa  |
| TNF β  | tumor nekrotizirajući faktor beta  |
| RALBP1 | Ra1A vezujući protein 1  |
| RNK    | ribonukleinska kiselina  |
| SZO    | Svjetska zdravstvena organizacija  |
| PYA    | pleomorfni astrocitom  |
| NF     | neurofibromatoza   |
| JPA    | juvenilni pilocitni astrocitom   |
| GFAP   | glijalni kiseli fibrilarni protein                                       |
| DIA    | desmoplastični infantilni astrocitom                                     |
| BRAF   | proto-onkogen B-Raf  |
| VEGF   | vaskularni endotelni faktor rasta  |
| PNET   | primitivni neuroektodermalni tumor                                       |
| AA     | anaplastični astrocitom  |
| GBM    | glioblastom  |
| AO     | anaplastični oligodendrogliom  |
| AMG    | anaplastični mješoviti gliom   |
| EGFR   | epidermalni faktor rasta   |



|         |   |
|---------|---|
| PTEN    | protein homolog fosfataze i tenzina (eng. phosphatase and tensin homolog)           |
| PTCH    | zakrpljeni tumorski supresorski gen (eng. patched tumor suppressor gene)            |
| ATRT    | atipični teratoidni tumor   |
| AFP     | alfa feto protein   |
| β HCG   | beta humani korionski gonadotropin  |
| DNET    | disembrioplastični neuroepitelijalni tumor  |
| NSE     | nespecifična enolaza  |
| LOH     | gubitak heterozigotnosti  |
| ACTH    | adrenokortikotropni hormon  |
| MEN     | multipla endokrina neoplazija   |
| PCNSL   | primarni limfomi središnjeg živčanog sustava  |
| AD      | autosomno dominantno  |
| VHL     | von Hippel Lindau   |
| TS      | tuberozna skleroza  |
| AT      | ataksija teleangiektazija   |
| SWS     | Sturge Weber sindrom  |
| TSC gen | gen tuberozne skleroze  |
| mTOR    | mehanistički cilj rapamicina = FK506 vezujući protein 12 rapamicin vezani protein 1 |
| AR      | autosomno recesivno   |
| BRCA    | gen karcinoma dojke   |
| PPV     | pozitivna prediktivna vrijednosti   |
| NPV     | negativna prediktivna vrijednosti   |
| AUC     | površina ispod krivulje   |
| CI      | interval pouzdanosti (eng. confidence interval)                                     |
| ROC     | receiver operating characteristic krivulja  |
| SOS     | globalni odgovor na oštećenje DNK (eng. SOS response)                               |

## 1. UVOD

Solidni tumori središnjeg živčanog sustava (SŽS) u dječjoj dobi rijetko se otkriju u ranoj fazi bolesti. Razlozi za to su položaj tumora, akutno intrakranijalno krvarenje, nedostupne radiološke metode, nedosljedna provedba dijagnostičkih postupnika itd (1). Tumori SŽS čine 20% svih dječjih tumora i njihova incidencija je u porastu (2). Rezultati liječenja su bolji ukoliko je bolest otkrivena u ranijoj fazi, što zahtijeva dovoljno osjetljive i specifične dijagnostičke metode. Iz toga su razloga potrebni biomarkeri koji ukazuju na prisutnost tumora u središnjem živčanom sustavu (3).

### 1.1 KOLINESTERAZE

Kolinesteraze su enzimi koji imaju ključnu ulogu u kolinergičnoj i neuromuskularnoj transmisiji. Prema enzimskoj skupini se ubrajaju u skupinu hidrolitičkih enzima hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina.

One hidroliziraju živčani prijenosnik acetilkolin nakon što izazove depolarizaciju u postsinaptičkoj membrani (4).

Acetilkolin (ACh) je glavni neurotransmiter središnjeg živčanog sustava rasprostranjen u cijelom tijelu. Neuron ne mogu sintetizirati kolin kojeg dobijaju putem krvi iz hrane. Acetilkolin koji se oslobađa na sinapsama se metabolizira putem acetilkolinesteraze (AChE) u acetyl koenzim A i kolin. Oko 50% kolina se ponovo upotrijebi.

Brzina hidrolize ACh eritrocitnim enzimom doseže maksimum kod relativno niskih koncentracija ACh. Enzim se pokazao specifičnim za hidrolizu acetatnih estera, dok butiratne nije hidrolizirao. Taj enzim je nazvan

pravom ili specifičnom kolinesterazom (eng. true), a kasnije acetilkolinesteraza. Njena klasifikacijska oznaka za enzim je [E.C.3.1.1.7]. Za razliku od nje kolinesteraza iz seruma pratila je Michaelis Menteninu kinetiku i hidrolizirala je butirne estere pa je stoga nazvana pseudo ili nespecifična kolinesteraza ili butirilkolinesteraza (PChE) s klasifikacijskom oznakom za enzim [E.C. 3.1.1.8] (5).

Aktivnost acetilkolina u SŽS određena je aktivnošću kolinesteraza. Inhibitori ovih enzima povećavaju kolinergičku aktivnost. U stanjima visoke moždane aktivnosti, acetilkolin u lokalnim sinapsama može doseći mikromolarni nivo koji djeluje inhibitorno na aktivnost AChE. U tom slučaju PChE sinergistički djeluje i hidrolizom dovodi do normalizacije lokalne razine acetilkolina.

Oba enzima je moguće inhibirati fizostigminom, prostigminom i alkaloidima (kompetitivnim inhibitorima kolinskog dijela acetilkolina). Organofosfori spojevi također mogu inhibirati djelovanje enzima tako što se svojom fosforilnom skupinom vežu za acilnu grupu enzima i tako onemogućuju vezanje acetilkolina.

Inhibitorni učinak mogu imati i morfin, kinini, terciarni amini, fenotiazini, pirofosfat, citrati, fluoridi, žučne soli i borati.

Postoje atipične varijante plazma kolinesteraze koje su značajne jer smanjuju aktivnost enzima prema acetilkolinu i drugim supstratima.

### **1.1.1 Pseudokolinesteraza**

PChE je enzim [E.C.3.1.1.8.] koji se primarno sintetizira u jetri i distribuira u krv i tkiva. Gen za ljudsku PChE lokaliziran je na kromosomu 3q26 koji kodira protein veličine približno 570 aminokiselina (6). Gen je kloniran 1987. godine. Dokazano je postojanje najmanje 50 prirodnih mutacija. Biosintezu enzima kontroliraju najmanje četiri genska alela na lokusu E1. Prvi genski alel E1U smatra se normalnim alelom i kontrolira sintezu normalne PChE (7).

Više od 70% aktivnosti inhibirano je dibukainom. Dibukainskim brojem otkrivaju se genetske varijante PChE koje su važne u kliničkoj anesteziji. PChE razgrađuje kolin estere, aril, alkil estere, benzoilkolin i butirilkolin. Sudjeluje u biokonverziji nekih spojeva tako da ih aktivira (npr. bambuterol, heroin) ili inaktivira (sukcinitildikolin, aspirin, kokain, amitriptilin). Inhibira ga acetilkolin. PChE se nalazi u plazmi, mukozi crijeva, slezeni, pankreasu, bijeloj tvari SŽS.

Funkcija enzima u plazmi još nije dovoljno poznata. Njena uloga je hidroliza ingestiranih estera biljnog porijekla.

Sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina, u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva. PChE čini ne više od 0.01% proteina plazme.

1996. godine Primo-Parmo i suradnici izvještavaju o fiziološkoj irelevantnosti enzima budući da potpuni deficit PChE ne dovodi do bilo kakve abnormalnosti. No isto tako miševi bez AChE aktivnosti na neuromuskularnoj sinapsi preživljavaju zbog aktivnosti PChE koja osigurava minimalnu kolinergičku aktivnost (8).

Povišena koncentracija PChE i AChE u embrijima ali i u postnatalnom razdoblju upućuje na njenu ulogu u staničnoj diferencijaciji i razvoju (9).

#### **1.1.1.1 Pseudokolinesteraza u središnjem živčanom sustavu**

PChE nema u neuronima središnjeg i perifernog živčanog sustava. Njena aktivnost u SŽS je samo 1/100 do 1/20 aktivnosti u plazmi (10). No u nekim dijelovima mozga, predominantno u bijeloj supstanci ona je zastupljenija od AChE (Burgen i Chipman 1951) (11). Povezanost PChE i bijele tvari mozga dovela je do spoznaje da je njena osnovna aktivnost u SŽS metabolizam mijelinske ovojnice i neuroglije, a ne transmisija neurona i aksona. Abrahams, Koelle i suradnici su potvrdili prisutnost PChE u glijalnim stanicama i Schwannovim stanicama mijeliniziranih živaca, npr. u vidnom živcu (12, 13).

Aktivnost PChE u odnosu na AChE je veća u korpus kalozumu, fornixu, pedunkulusima, piramidama medule, n. optikusu, n. brahialisu itd. AChE

ima veću aktivnost u području medule spinalis na osnovi sive supstance (14).

Arterije u ljudi i nekih drugih vrsta sadrže aktivne kolinesteraze koje su predominantno PChE.

Koncentracija i aktivnost PChE u likvoru je višekratno determinirana (15,16,17). U djece je ovisna i o dobi (18). Postoji potpuno neslaganje o niskoj aktivnosti PChE nakon rođenja. U prva tri tjedna života dolazi do naglog porasta njene aktivnosti na vrijednosti koje su više od onih kod zdravih odraslih osoba i takva vrijednost ostaje do kraja treće godine. Potom postupno od pete godine života pada do puberteta kada postiže vrijednost odrasle osobe. U ženske djece postoji značajna korelacija s dobi. Aktivnost PChE pada na 50 percentilu u starosti od 10 do 15 i 15 do 25 godina (18).

#### **1.1.1.2 Pseudokolinesteraza i tumorogeneza**

Već rana istraživanja PChE ukazuju na njenu povišenu aktivnost u tkivu tumora (10). Posebno je izražena povišena aktivnost PChE u odnosu na AChE u tumorima astrocitnog reda. S druge strane u meningeomima i juvenilnim meduloblastomima su izmjerene niže vrijednosti PChE u odnosu na AChE. Sve to ide u prilog činjenici da je u tim tumorima PChE povišena na osnovi bijele supstance. U tim ranim istraživanjima nije potvrđeno da vaskularni dijelovi tumora ne pridonose izmjerenim vrijednostima PChE.

Sve su brojniji izvještaji o ulozi PChE i AChE u tumorogenezi koja može nastati zbog poremećaja metabolizma ili enzima koji sudjeluju u onkogenom procesu (19,20,21,22). U brojnim tumorima u ljudi PChE i AChE geni su amplificirani, mutirani ili se pojavljuju u aberantnim oblicima. Oba sadrže peptidni motiv S/T-P-X-Z koji se nalazi u mnogim supstratima protein kinaza povezanih s cdc2. Postoji vjerojatnost da fosforilacija cdc2 vezanih protein kinaza može biti molekularni mehanizam koji povezuje kolinesteraze s proliferacijom tumorskih stanica. Inhibicija ovih enzima organofosforinim otrovima može u ljudi izazvati nastanak tumora (23).

Kasnih osamdesetih godina prošlog stoljeća klonirane su cDNK za AChE i PChE. Hibridizirajuće sekvence za PChE cDNK lokalizirane su na kromosomskim mjestima 3q21-26 i 16q12 (24, 25). Važno je naglasiti da su opaženi prekidi kromosomske regije 3q21-26 što se ponavljano vidi u kromosomima iz periferne krvi bolesnika s akutnom mijeloblastičnom i mijelomonocitnom leukemijom (26,27).

## **1.2 OSTALE AKTIVNOSTI PSEUDOKOLINESTERAZE**

Uloga pseudokolinesteraze u Alzheimerovoj i nekih drugih neurodegenerativnih bolesti nije potpuno razjašnjena, ali je u tih bolesnika snižena aktivnost AChE do 85%, a pojačana aktivnost PChE prati progresiju same bolesti (28).

Povišena je aktivnost PChE i AChE u osoba s rezistencijom na inzulin, hiperlipidemijom, šećernom bolesti, arterijskom hipertenzijom, u sklopu metaboličkog sindroma X (29).

Živčani sustav komunicira s imunološkim sustavom bidirekcionalno. Živčano tkivo sintetizira neuropeptide i citokine a imunološke stanice služe kao molekularna baza bidirekcionalnih aktivnosti. Aktivnost aferentnog puta n.vagusa endotoksinima ili proinflamatornim citokinima stimulira hipotalamo-pituitarno-adrenalni odgovor koji izaziva protuupalne signale putem eferentnog dijela n.vagusa, što se naziva kolinergičkim antiinflamatornim putem (30).

Isto tako ACh povećava produkciju eNO te i na taj način pokazuje antiinflamatornu aktivnost (31).

### 1.3 OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijsko reduktivni procesi nastaju u svakoj stanici. Prema nomenklaturi biomedicinske znanosti oksidacijski stres je stanje u kojem oksidacijsko reduktivni procesi u stanici prelaze u oksidacijsko stanje (32,33,34). Posljedično tome prekomjerna količina slobodnih radikala i reaktivnih spojeva kisika se ne može dovoljno efikasno ukloniti.

Svaki oksidacijski stres je patološki proces. No, neke stanice su se adaptirale i upotrijebile ga za vlastite aktivnosti kao npr. stanice plućnog tkiva, krvne stanice itd.

Do promjene ravnoteže oksidacijsko reduktivnog procesa može doći iz brojnih razloga što rezultira nastankom reaktivnih spojeva kisika i dušika (reactive oxygen species ROS; reactive nitrogen species RNS). ROS i RNS uključuju slobodne radikale kisika kao i brojne druge molekule.

ROS – kisikovi slobodni radikali uključuju superoksid ( $O_2^-$ ), hidroksil (OH), perihidroksil ( $HO_2^-$ ), peroksil ( $RO_2$ ) i alkoksil radikal (RO).

NOS uključuje dušični oksid (NO), dušični dioksid ( $NO_2$ ) itd.

Slobodni radikal je kemijska forma atoma ili molekule koji ima jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ovojnici i zato hvata elektrone drugih molekula. Svaka molekula koju napadne slobodni radikal može postati radikal. Molekule koje nisu derivati radikala kisika (non radical oxygen derivatives) su npr. vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipoklorna kiselina (HOCl), peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), dušična kiselina ( $HNO_2$ ), ozon ( $O_3$ ) itd (32).

Kisik koji konzumiraju aerobni organizmi se uglavnom reducira do vode preko enzima citokrom c oksidaze u terminalnoj reakciji respiracijskog lanca mitohondrija. Kisik ima trovalentnu konfiguraciju (s dva nesparena elektrona u vanjskoj ovojnici). Njegova redukcija do vode može nastati u četiri koraka jednog elektrona (35). Ali 1 do 2% molekula kisika se konvertira u superoksidni anionski radikal  $O_2^-$  i ta reakcija se odvija na dva mjesta: kompleks I (NADH dehidrogenaza) i kompleks III (ubisemikvanon). Vodikov peroksid nastaje kao sekundarni produkt (putom  $O_2^-$  dizmutacije a time i stohiometrija između  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  je blizu 2.0 (36).

ROS može nastati slučajno ili namjerno. Slučajno nastaje u mitohondrijima (gubitak elektrona iz respiracijskog lanca) i u procesima u kojima kateholamini i neke druge molekule reagiraju s  $O_2$  rezultirajući u nastanku  $O_2^-$  (37). Unutar bioloških sustava ove reakcije su obično ovisne o prisutnosti katalitičkih metala, npr. željeza. Fiziološki, ROS nastaje namjenski u imunološkom sistemu. Takav primjer je aktivacija neutrofila i formacija  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ .

Mozak odraslog čovjeka teži 1300 g do 1400 g, novorođenčeta 350 do 400 g. 80% mozga čini tkivo, 10% krv i 10 % likvor. Odnos volumena sive i bijele supstance u hemisferama mozga je 1,3 u osoba starih 20 godina; 1,1 u onih starih 50 godina; a 1,5 u starih 100 godina. Bijela tvar troši 6% kisika u mozgu, siva 94% (38). Od potreba za bazalni metabolizam mozak troši 20% kisika. Potrošnja kisika u mozgu je 3,3ml/100g/min. U djece protok krvi kroz cijeli mozak iznosi 105ml/100g/min u odraslih 54ml/100g/min. Cerebralni protok krvi u sivoj supstanci je 75ml/100g/min, u bijeloj supstanci je 45ml/100g/min (39,40). Mozak za vrijeme intelektualne funkcije upotrebljava 35 ml/100g/min kisika. Tako čovjek koji teži 70 kg, a njegov mozak 1400 g, ima bazalne potrebe potrošnje kisika od 280ml/min i potrošnju u mozgu od 50ml/min. To je razlog zbog kojeg je mozak toliko osjetljiv na kisikove reakcije. Stopa cerebralnog metabolizma kisika (cerebral metabolic rate oxygen CMRO<sub>2</sub>) ovisi o protoku krvi kroz mozak (cerebral blood flow CBF) i arteriovenske razlike koncentracije kisika (AVDO<sub>2</sub>).  $CMRO_2 = CBF \times AVDO_2$ . CMRO<sub>2</sub> se može mjeriti PETom (41).

### **1.3.1 Lipidna peroksidacija**

Slobodni radikali reagiraju s najvažnijim dijelovima stanice kao što su lipidi, bjelančevine i DNK. Lipidna peroksidacija je složena lančana reakcija razgradnje nezasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acids, PUFA) potaknuta reaktivnim kisikovim vrstama i reaktivnim dušikovim spojevima (42, 43).



U sastavu lipida svih bioloških membrana nalaze se višestruko nezasićene masne kiseline koje su jako osjetljive na oksidaciju. U kontroliranim uvjetima se u stanicama proizvode oksidirani produkti PUFA pod utjecajem enzima koji djeluju kao medijatori upale (44). Pojava lipidne peroksidacije u biološkim membranama može dovesti do poremećaja funkcije i smanjenja fluidnosti što je povezano s brojnim bolesnim stanjima (45, 46). Konačni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi: malondialdehid (MDA) i 4 hidroksinonenal (HNE). Zato se nazivaju i sekundarni glasnici slobodnih radikala (42, 47). Od mnogih klasa biomolekula kao bioloških ciljeva oksidacijskog stresa najviše su zastupljeni lipidi (48). Lipidna oksigenacija potiče nastajanje brojnih sekundarnih produkata uglavnom aldehida. Malondialdehid (MDA) je gotovo najviše proučavani produkt peroksidacije PUFA i niz godina konvencionalni biomarker za lipidnu peroksidaciju zbog njegove jednostavne reakcije s tiobarbituratnom kiselinom kojom se dobije jako obojeni kromogen (49).

### **1.3.2 Malondialdehid (MDA)**

Najvažniji izvor MDA (kemijski  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ ) iz bioloških uzoraka je peroksidacija PUFA s jednim ili više metilenom prekinutih dvostrukih veza. Prekursor je biciklički endoperoksid sličan onome koji nastaje u biosintezi prostaglandina (50). Smatra se da MDA nastaje iz prekursora u stresnim uvjetima opisano u studiji Frankella i Neffa u kojoj je navedeno koji su oksidirani lipidi sposobni producirati MDA kao produkt dekompozicije (51). U normalnim fiziološkim uvjetima i neutralnom pH prisutan je kao enolatni anion niske kemijske reaktivnosti. Uključen je u proces sinteze tromboxana A<sub>2</sub> gdje ciklooksigenaze 1 i 2 metaboliziraju arahidonsku kiselinu do prostaglandina H<sub>2</sub> u trombocitima itd. (52). On je reaktivni aldehid i stvara kovalentne veze s proteinima i nastaju spojevi tzv. advanced lipoxidation end products (ALE) (53). MDA reagira sa

deoksiadenozinom i deoksigvanozinom u DNK vezama posebno u M1G što je mutageni proces (54). Ljudska ALDH1A1 aldehyd dehidrogenaze može oksidirati MDA. MDA se istovremeno povezuje s inicijacijom karcinoma dojke, cerviksa, želuca, preeklampsijom, neurološkim bolestima, dijabetesom itd. (55, 56, 57).

### **1.3.3 Antioksidacijski sistem obrane**

Regulacija oksidacijskih reakcija uključuje brojne agente i mehanizme obrane koji se nazivaju antioksidacijski sistem obrane (antioxydant defense system, ADS). On uključuje enzime i antioksidanse.

Antioksidansi mogu biti endogeni (sintetiziraju se u tijelu) ili egzogeni (konzumiraju se). Kategorizirani su kao čistači (scavenger) i preventivni antioksidansi.

#### **1.3.3.1 Antioksidansi – čistači (scavenger)**

Antioksidansi čistači uklanjaju ROS. U tom sistemu djeluju dvije grupe. Prva uključuje enzime velikih molekula: superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), glutation peroksidazu (GP<sub>x</sub>). Ove enzime moraju sintetizirati stanice i subjekt su genetskih i/ili makromolekularnih regulatornih mehanizama. Oni su antioksidacijski biomarkeri.

Drugu skupinu čine antioksidansi male molekularne težine.

### 1.3.3.1.1 Superoksid dizmutaza (SOD)

Superoksid dizmutaza [EC 1.15.1.1] je jedan od glavnih antioksidacijskih enzima. Njena obitelj je specijalizirana za eliminaciju radikala superoksid aniona koji nastaju zbog izvanstaničnih stimulacija koje uključuju oksidativna oštećenja i zračenje skupa s onima koji su nastali primarno u mitohondrijskom matriksu kao bioproduct metabolizma kisika kroz lanac transporta elektrona (58).

SOD ima ulogu da pospješi dizmutaciju  $O_2^-$  do  $H_2O_2$  i molekularnog kisika:  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ - (SOD) \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . Otkriveno je nekoliko tipova SODa, ali su samo tri prisutne kod ljudi (59). SOD1 (bakar-cink protein, cianid senzitivna) koja je vezana za citosol, SOD2 koja se nalazi u mitohondriju (manganoprotein, cianid neosjetljiva) i treća je vanstanična SOD3. Geni za SOD su lokalizirani na kromosomu 21 (21q22.1), 6 (6q25.3) i 4 (4p15.3-p15.1). SOD je dimer, a SOD2 i SOD3 su tetrameri (60, 61, 62). Većinu aktivnosti SOD registramo u eritrocitima, dok je vrlo malo aktivnosti u plazmi ili serumu (63). Dokazano je da su fosfolipidne membrane nepropusne za napunjene  $O_2$  molekule (64). Zato je potrebno da je SOD prisutna za odstranjenje  $O_2^-$  na mjestima gdje nastaju slobodni radikali (65).

### 1.3.3.1.2 Katalaza (CAT)

Katalaze [EC 1.11.1.6] su produkti svih aerobnih organizama (66). Različite stanice proizvode različite tipove katalaza (67). One štite stanicu od toksičnog učinka  $H_2O_2$ . CAT posjeduju hem protein koji katalizira konverziju  $H_2O_2$  do vode i molekularnog kisika. Neke katalaze su bifunkcionalne što znači da se mogu ponašati kao katalaze i peroksidaze [EC 1.11.1.7]. Kod bifunkcionalnih katalaza-peroksidaza mnoge organske supstance se mogu upotrijebiti kao donori hidrogena. Ova reakcija nastaje kada se alkohol oksidira u jetri. Ovakve bifunkcionalne peroksidaze su usko vezane za peroksidaze biljaka, nekih bakterija itd. (65). Neke bakterije se štite s katalazama koje koriste mangan umjesto hema (67).

Većina katalaza su tetrameri od 60 do 75 kDa. Imaju čvrstu, stabilnu strukturu koja je otporna na promjene pH, toplinske denaturacije i proteolizu što čini njihovu evolucijsku prednost. Katalaza djeluje u dva koraka. U prvom veže jednu molekulu  $H_2O_2$  i cijepa je. Odvaja se jedan atom kisika koji se veže za atom željeza, a ostatak se pretvara u vodu. U slijedećem koraku veže se za još jednu molekulu  $H_2O_2$ , također ju cijepa, a dijelovi se vežu za molekulu kisika i željeza iz prvog koraka tako da u konačnici nastaje voda i hidrogen (67).

Neke katalaze imaju NADPH kao kofaktor. On sprječava nastanak inaktivnih spojeva.

No katalaze mogu i stvarati ROS. To nastaje pod utjecajem UVB zračenja kada one generiraju hidroperoksid. UVB svjetlost se može detoksificirati kroz generacije  $H_2O_2$   $H_2O_2$  koje mogu razgraditi katalaze (66).

Svaka molekula katalaze može razgraditi milijune molekula  $H_2O_2$ .

Integritet krvno moždane barijere je izuzetno velik u usporedbi s drugim endotelnim barijerama, no u stanjima kao što je oksidacijski stres može biti izmijenjen (68, 69, 70). Hipoksijom izazvana paracelularna propusnost je snažno potencirana reoksigenacijom što preveniraju katalaze, što nam sugerira da je  $H_2O_2$  glavni medijator efekta reoksigenacije (71).

### **1.3.3.1.3 Glutation peroksidaza (GPx)**

Nekoliko proteina metabolizira  $H_2O_2$  i lipidne hidroksiperokside. Ovi proteini uključuju četiri glutacion peroksidaze koje sadrže selen (72). 1957. godine Mills hipotetski opisuje GPx aktivnost u smislu protekcije eritrocita od hemolize izazvane oksidacijom. Ovaj enzim je nazvan klasični GPx, a danas GPX-1 [EC 1.11.1.9]. Naziva se još citosolnim i celularnim GPx-om. Glutation peroksidaza je intracelularni antioksidacijski enzim koji upotrebljava glutacion (GSH) kao obligatni kosupstrat u redukciji  $H_2O_2$  do vode (73). Može metabolizirati niz organskih peroksida uključujući kolesterol i perokside masnih kiselina dugih lanaca (74). GPx2 se nalazi u gastrointestinalnom traktu (75). GPx3 ima aktivnost sličnu GPx1 i korelira joj u 50%, a nalazi se u plazmi (76). Jedini monomer obitelji GPx je GPX4 i

iz tog razloga može vezivati više supstrata nego tetrameri (77). Ukoliko se zamijeni selenocistein na aktivnom mjestu GPx-a sa cisteinom dolazi do dramatičnog smanjenja njene katalitičke aktivnosti (78). Mnoge patološke posljedice nedostatka selena se već odavno povezuju s oksidacijskim oštećenjem tkiva. No, do toga ne dolazi ukoliko postoji i minimalna GPx aktivnost, čak manja od 1% ili minimalna aktivnost E vitamina (79). Ukazuje se potreba za istraživanjem ostalih funkcija selena i selenoproteina.

Prekomjerna produkcija GPx proteina štiti od oksidacijskih produkata H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipidnih hidroksiperoksida i nekih supstanci kao što je parakvat (80, 81). Isto tako dolazi do smanjenja aktivnosti NFκB izazvane s TNFα u humanim T47D transfektantima (82). Terapijska aktivacija GPx s masnim kiselinama je značajna u redoks regulaciji transkripcijskih faktora u stanicama (83).

GPx1 knock out miš nema zbog toga promijenjen fenotip. No, takvi miševi u usporedbi sa zdravima imaju pojačanu osjetljivost za različite oksidacijske stresove. To je očito kod ishemije miokarda, ispostavljenosti parakvatu itd. (84).

### **1.3.3.2 Antioksidansi čistači – male molekule**

Sljedeću skupinu „scavenger“ antioksidansa ili čistača čine antioksidansi male molekularne težine, kao što je u vodi topivi C vitamin, glutation i E vitamin topivi u lipidima, karoteni, koenzim Q10 i lipoična kiselina. Prevenzijski antioksidansi vežu ROS i ne dozvoljavaju njegovu aktivnost. Ta grupa uključuje i albumine, metalotionine, transferin, ceruloplazmin, mioglobin i feritin (85).

### 1.3.4 Oksidacijski stres i tumorogeneza

Različiti patološki procesi mogu završiti u smislu lokalnog ili sistemskog oksidacijskog stresa. Tako je pojava malignih stanica stimulirana aktivnošću nasljednih i faktora okoliša. ROS ima snažan utjecaj. Mnoge maligne stanice sadrže velike količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktivnost ekspresijskog gena katalaze je smanjena u stanicama hepatoma. Aktivnost SOD je niska u stanicama tumora kolona, posebno adenokarcinoma u ranoj fazi bolesti (86).

Maligne stanice proizvode velike količine ROS, a simultano niska je zaštita s antioksidansima. Ipak, te su stanice otporne na ROS najvjerojatnije zbog produkcije glutationa. Medijatori oksidacijskog stresa kao što je HNE mogu konstantno aktivirati c-fos, c-jun i c-myc. Oksidativni stres inducira aktivatorski protein 1 koji aktivira gene koji kodiraju faktore rasta. Tako pospješuje rast mezenhima, krvnih žila i vezivnog tkiva koji sudjeluju u upalnom procesu, ali isto tako i rast tumora (fibrinogen citokini TGFβ i PDGF) (87).

Središnji živčani sustav je naročito osjetljiv na ROS. Mozak koristi 1/5 kisika u tijelu i većina energije nastaje u respiratornom lancu mitohondrija što dovodi do stvaranja superoksida i vodikovog peroksida. Neutralizacija ROS-a je smanjena zbog niske aktivnosti katalaze, velike količine željeza u nekim dijelovima mozga, a likvor ne sadrži dovoljno bjelančevina kako bi mogao vezati željezo (88). Lipidi ovojnice moždanih stanica sadrže puno PUFA koje s velikom količinom željeza doprinose nastanku lipidne peroksidacije.

Od mnogih klasa biomolekula kao bioloških ciljeva oksidacijskog stresa najviše su zastupljeni lipidi (48). Ove molekule djeluju i unutar i izvan stanice. U interreakciji su s proteinima, nukleinskim kiselinama i često ireverzibilno oštećuju delikatne mehanizme uključene u funkcionalnost stanice. Kada MDA dođe u kontakt s bazom nukleinske kiseline nastaju brojni spojevi. Ove potencijalno genotoksične aktivnosti mogu dovesti do mutacija i posljedično karcinoma. Uključen je i u aterogenost i toksične

efekte kolagena što je posebno izraženo u kardiovaskularnom tkivu (89, 90). U posljednjih 20 godina MDA je poznat kao marker lipidne peroksidacije. U etiologiji karcinoma on predstavlja i biomarker lipidne oksidacije i istovremeno potencijalni inicijator nastanka karcinoma. U karcinomima pluća i dojke njegova koncentracija u plazmi je visoka (91). Ima diurnale varijacije s faznom razlikom od 12 sati (92, 93). Pušenje utječe na MDA oštećenje DNK na stanicama mukoze incidenciju usne šupljine i pušači imaju veću oštećenja DNK u usporedbi s nepušačima (94).

ROS sudjeluje u signalizaciji, proliferaciji, diferencijaciji i sudbini stanice. Tumor supresor p53 ima ključnu ulogu u regulaciji o ROSu ovisne neurogeneze (95, 96). Funkcija ROS-a i njegove molekularne regulacije u živčanim progenitorskim stanicama mišjeg embriona (eNPCs) do sada još nije pojašnjena. ROS je projeko potreban za vremenski točnu neurogenezu u razvoju telencefalona. Tumor supresorni p53 modulira ovu aktivnost. Ako on izgubi svoju funkciju, dolazi do porasta ROS-a što rezultira u ranoj neurogenezi. Ukoliko se tada ponovno uspostavi funkcija p53 i djeluje s antioksidansima, djelomično će se popraviti fenotip koji je nastao zbog rane neurogeneze. Ovaj učinak svakako može imati utjecaj na nastanak tumora neurorazvojnog porijekla (96).

Lipidna peroksidacija i oksidativni stres imaju veliku ulogu kako u karcinogenezi tako i u terapiji tumora. Karcinogeneza nastaje u dvije faze: inicijacijska i promocijska. Inicijacijska faza započinje alteracijom molekularne strukture stanične DNK zbog djelovanja različitih bioloških, biokemijskih i bioloških faktora. Potom nastupa promocijska faza u kojoj dolazi do promjene ekspresije gena koji reguliraju rast stanice (proliferaciju i diferencijaciju). ROS igra najveću ulogu u promocijskoj fazi karcinogeneze (97, 98). Karcinogena aktivnost promotora tumora je također povezana sa sniženim antioksidativnim obrambenim sposobnostima stanice, kao npr. sa smanjenim koncentracijama katalaze i superoksid dizmutaze. Ral vezni protein 1 (Ral binding protein1 RALBP1) je protektivni multi specifični transporter konjugata glutationa koji nastaje

kao odgovor na stres i pomaže u razumijevanju kako tumor izbjegne regulaciju rasta i protu karcinomske efekte lipidne peroksidacije i otvara nove pristupe terapiji karcinoma. RALBP1 inhibicija dovodi do inhibicije rasta melanoma miša, non small cell karcinoma pluća (NSCLC H 358 i H520) i stanične linije kolona SW480 (99,100).

Smanjena aktivnost primarnih antioksidacijskih enzima kao što je citoplazmatska CuZnSOD (SOD1) je često prisutna u tumorima, što ukazuje na smanjenu obranu od oksidacije i povećanu produkciju ROS-a, a može se povezati s mnogim svojstvima karcinomskih stanica.

Među nasljednim faktorima razvoja karcinoma znane su genetske promjene koje su ovisne o obrani od oksidacijskog stresa. Trisomija 21 je primjer u kojem prisutnost citoplazmatske SOD1 u tkivu je povišena za 50%, a gen za kodiranje SOD1 je smješten na kromosomu 21. Mitohondrijska MnSOD je reducirana na 1/3. Gen za mitohondrijsku SOD je smješten na kromosomu 6. Tako promjena aktivnosti SOD može igrati ulogu u karcinogenezi. Bolesnici s Down sindromom imaju i do 30% veći rizik za razvoj akutne leukemije. Bolesnici s Dubin Johnsons Sprintz sindromom imaju deficit SOD2 i puno više su podložni razvoju karcinoma (101,102).

Karcinom je, sam po sebi, povezan s drugim procesom oksidacije i lipidne peroksidacije – upalom. Cilj slobodnih radikala u upalnom procesu su DNK, RNK proteini i lipidi (103).

ROS, RNS i LPO produkti mogu imati utjecaj na signalne molekule i izmijeniti ulogu bjelančevina i enzima uključenih u upalu i karcinogenezu, kao što su NFκB, iNOS i COX2 (104,105).

Razlike u načinu života, prehrani, okolišu imaju važan patofiziološki utjecaj. Svjetska zdravstvena organizacija je izdala više izvještaja u kojima upozorava na to da su neke dijete, siromašne voćem i povrćem te sadržajem antioksidansa, u vezi s pojavom nekih karcinoma npr. želuca, jednjaka, debelog crijeva (kolonorektalnih) i pluća (106).

Tumorogeneza mozga je povezana s karcinogenezom ovisnom o oksidacijskom stresu i ionizacijskim zračenjem koje može dovesti do



radiolize vode, generirati slobodne kisikove radikale i izmijeniti ključne molekule (107,108).

Oksidacijski stres ima utjecaj i na ekspresiju gena.  $H_2O_2$  aktivira veliku grupu signalnih kinaza uključenih u staničnu migraciju, proliferaciju i apoptozu. Nrf2 (nuclear erythroid 2 related factor) regulira ekspresiju mnogih antioksidantnih enzima (SOD;CAT;GTS;GPx). Njegova povišena aktivnost može doprinijeti razvoju karcinoma tako što doprinosi kemorezistenciji tumora na kemoterapiju (109). Ovi enzimi preveniraju oštećenje mozga koje bi nastalo djelovanjem slobodnih radikala. No, slobodni radikali s druge strane mogu promijeniti djelovanje gena koji ih kontrolira. Rao je prikazao da SOD aktivnost u eritrocitima je snižena u većini tipova intrakranijalnih neoplazmi (110).

#### **1.3.4.1 Sustav zaštite od tumorogeneze**

Glutation peroksidaza GPx reducira organske perokside. Polimorfizam glutacione S transferaze GSTs može imati ulogu u histološkom podtipu moždanog tumora, posebno u astrocitomima visokog gradusa dječje dobi (111). Katalaza je endogeni antioksidacijski enzim koji konvertira  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i  $O_2$ . Povezan je sa stanicama glioma (112).

SOD aktivnost se smanjuje tijekom života. Ekstracelularna SOD (SOD3) je manje zastupljena u mozgu nego SOD1 i SOD2. SOD mehanizam selektivno ubija stanice karcinoma (113).

Nekoliko inhibitora lipidne peroksidacije kao što su lazaroidi (21 aminosteroidi), inhibitori COX, kelatori željeza, vitamini (E,D,C, $\beta$  karoten), melatonin su testirani, ali njihovo djelovanje je različito ocijenjeno (114,115,116,117,118).

Na povećanju stvaranja slobodnih radikala kisika temeljen je terapijski, ali i toksični učinak antraciklinskih citostatika (119).

## 1.4 TUMORI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

### 1.4.1 Klasifikacija tumora središnjeg živčanog sustava prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji iz 2007.godine

Klasifikacija tumora SŽS po SZO iz 2007. godine razlikuje se od predhodnih ukoliko je u međuvremenu ustanovljena razlika ovisna o dobi, distribuciji, lokaciji, genetskom profilu ili kliničkom obnašanju tumora (120).

| TUMORI NEUROEPITELIJALNOG TKIVA              | ICD-O               |
|--|---------------------|
| <b>Astrocitni tumori</b>                     |                     |
| Pilocitni astrocitom                         | 9421/1 <sup>1</sup> |
| Pilomiksoidni astrocitom                     | 9425/3*             |
| Subependimalni astrocitom gigantskih stanica | 9384/1              |
| Pleomorfni ksantoastrocitom                  | 9424/3              |
| Difuzni astrocitom                           | 9400/3              |
| Fibrilarni astrocitom                        | 9420/3              |
| Gemistocitni astrocitom                      | 9411/3              |
| Protoplazmični astrocitom                    | 9410/3              |
| Anaplastični astrocitom                      | 9401/3              |
| Glioblastom                                  | 9440/3              |
| Glioblastom gigantskih stanica               | 9441/3              |
| Gliosarkom                                   | 9442/3              |
| Cerebralna gliomatoza                        | 9381/3              |
| <b>Oligodendroglijalni tumori</b>            |                     |
| Oligodendroglioma                            | 9450/3              |
| Anaplastični oligodendrogliom                | 9451/3              |
| <b>Oligoastrocitni tumori</b>                |                     |
| Oligoastrocitom                              | 9382/3              |
| Anaplastični oligoastrocitom                 | 9382/3              |
| <b>Ependimalni tumori</b>                    |                     |
| Subependimom                                 | 9383/1              |
| Miksopapilarni                               | 9394/1              |
| Ependimom                                    | 9391/3              |
| Stanični                                     | 9391/3              |
| Papilarni                                    | 9393/3              |
| Clear cell                                   | 9391/3              |
| Tanicitni                                    | 9391/3              |
| Anaplastični ependimom                       | 9392/3              |
| <b>Tumori koroidnog pleksusa</b>             |                     |
| Papilom koroidnog pleksusa                   | 9390/0              |

|   |         |
|---|---------|
| Atipični papilom korioidnog pleksusa                        | 9390/1* |
| Karcinom korioidnog pleksusa                                | 9390/3  |
| <b>Drugi neuroepitelialni tumori</b>                        |         |
| Astroblastom  | 9430/3  |
| Kordoidni gliom treće komore                                | 9444/1  |
| Angiocentrični gliom  | 9431/1* |
| <b>Neuronalni i mješoviti neuronalno glialni tumori</b>     |         |
| Displastični gangliocitom cerebeluma (Lhermitte-Duclos)     | 9493/0  |
| Dezmoplastični infantilni astroцитom/gangliogliom           | 9412/1  |
| Disembrioplastični neuroepitelijalni tumor                  | 9413/0  |
| Gangliocitom  | 9492/0  |
| Gangliogliom  | 9505/1  |
| Anaplastični gangliogliom                                   | 9505/3  |
| Centralni neuroцитom  | 9506/1  |
| Ekstraventricularni neuroцитom                              | 9506/1* |
| Cerebelarni liponeuroцитom                                  | 9506/1* |
| Papilarni ganglioneuronalni tumor                           | 9506/1* |
| Glioneuronalni tumor četvrte komore s formirajućim rosetama | 9509/1* |
| Paragangliom  | 8680/1  |
| <b>Tumori pinealne regije</b>                               |         |
| Pineocitom  | 9361/1  |
| Srednje diferencirani pinealni parenhimalni tumor           | 9362/3  |
| Pineoblastom  | 9362/3  |
| Papilarni tumor pinealne regije                             | 9395/3* |
| <b>Embrionalni tumori</b>                                   |         |
| Meduloblastom   | 9470/3  |
| Dezmoplastični/nodularni meduloblastom                      | 9471/3  |
| Meduloblastom s ekstenzivnom nodularnosti                   | 9471/3* |
| Anaplastični meduloblastom                                  | 9474/3* |
| Meduloblastom velikih stanica                               | 9474/3  |
| Primitivni neuroektodermalni tumor SŽS                      | 9474/3  |
| Neuroblastom SŽS  | 9500/3  |
| Ganglioneuroblastom SŽS                                     | 9490/3  |
| Meduloepiteliom   | 9501/3  |
| Ependimoblastom   | 9392/3  |
| Atipični teratoidni/rabdoidni tumor                         | 9508/3  |
| <b>TUMORI KRANIJALNIH I PARASPINALNIH ŽIVACA</b>            |         |
| Schwannoma (neurilemoma,neurinoma)                          | 9560/0  |
| Stanični  | 9560/0  |
| Pleksiformni  | 9560/0  |
| Melanotični   | 9560/0  |
| Neurofibrom   | 9540/0  |
| Pleksiformni  | 9550/0  |

|   |        |
|---|--------|
| Perineuriom                                     |        |
| Perineuriom,NOS                                 | 9571/0 |
| Maligni perineuriom                             | 9571/3 |
| Maligni tumor ovojnice perifernog živca (MPNST) |        |
| Epiteloidni MPNST                               | 9540/3 |
| MPNST s mezenhimalnom diferencijacijom          | 9540/3 |
| Melanotični MPNST                               | 9540/3 |
| MPNST s glandularnom diferencijacijom           | 9540/3 |
| <b>TUMORI MENINGEALNIH OVOJNICA</b>             |        |
| <b>Tumori meningotelijalnih stanica</b>         |        |
| Meningiom                                       | 9530/0 |
| Meningotelijalni                                | 9531/0 |
| Fibrozni (Fibroblastični)                       | 9532/0 |
| Tranzicionalni (mješoviti)                      | 9537/0 |
| Psamomatozni                                    | 9533/0 |
| Angiomatozni                                    | 9534/0 |
| Mikrocistični                                   | 9530/0 |
| Sekretorni                                      | 9530/0 |
| Limfoplasmacitni – bogati                       | 9530/0 |
| Metaplastični                                   | 9530/0 |
| Kordoidni                                       | 9538/1 |
| Clear cell                                      | 9538/1 |
| Atipični  | 9539/1 |
| Papilarni                                       | 9538/3 |
| Rabdoidni                                       | 9538/3 |
| Anaplastični (maligni)                          | 9530/3 |
| <b>Mezenhimalni tumori</b>                      |        |
| Lipom   | 8850/0 |
| Angiolipom                                      | 8861/0 |
| Hibernom  | 8880/0 |
| Liposarkom                                      | 8850/3 |
| Solitarni fibrozni tumor                        | 8815/0 |
| Fibrosarkom                                     | 8810/3 |
| Maligni fibrozni histiocitom                    | 8830/3 |
| Leiomiom  | 8890/0 |
| Leiomiosarkom                                   | 8890/3 |
| Rabdomiom                                       | 8900/0 |
| Rabdomiosarkom                                  | 9220/0 |
| Hondrom   | 9220/3 |
| Hondrosarkom                                    | 9180/0 |
| Osteosarkom                                     | 9180/3 |
| Osteohondrom                                    | 9210/0 |
| Hemangiom                                       | 9120/0 |
| Epiteloidni hemangioendoteliom                  | 9133/1 |
| Hemangiopericitom                               | 9150/1 |

|   |         |
|---|---------|
| Anaplastični hemangiopericitom                        | 9150/3  |
| Angiosarkom   | 9120/3  |
| Kaposijev sarkom                                      | 9140/3  |
| Ewing sarkom – PNET                                   | 9364/3  |
| <b>Primarne melanocitne lezije</b>                    |         |
| Difuzna melanocitoza                                  | 8728/0  |
| Melanocitom   | 8728/1  |
| Maligni melanom                                       | 8720/3  |
| Meningealna melanomatoza                              | 8728/3  |
| <b>Druge neoplazme vezane za meningelane ovojnice</b> |         |
| Hemangioblastom                                       | 9161/1  |
| <b>LIMFOMI I HEMATOPOETSKE NEOPLAZME</b>              |         |
| Maligni limfom  | 9590/3  |
| Plazmacitom   | 9731/3  |
| Granulocitni sarkom                                   | 9930/3  |
| <b>GERM CELL TUMORI</b>                               |         |
| Germinom  | 9064/3  |
| Embrionalni karcinom                                  | 9070/3  |
| Yolk sac tumor  | 9071/3  |
| Koriokarcinom   | 9100/3  |
| Teratom   | 9080/1  |
| Zreli   | 9080/0  |
| Nezreli   | 9080/3  |
| Teratom s malignom transformacijom                    | 9084/3  |
| Mješoviti germ cell tumor                             | 9085/3  |
| <b>TUMORI SELARNE REGIJE</b>                          |         |
| Kraniofaringeom                                       | 9350/1  |
| Adamantinozni   | 9351/1  |
| Papilarni   | 9352/1  |
| Granularni stanični tumor                             | 9582/0  |
| Pituicitom  | 9432/1* |
| Spindle cell onkocitom adenohipofize                  | 8291/0* |
| <b>METASTATSKI TUMORI</b>                             |         |

**Tablica 1 : Klasifikacija tumora središnjeg živčanog sustava prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji 2007**

<sup>1</sup> Morfološki znak Internacionalne klasifikacije bolesti za onkologiju (ICD-O) (614A) i Sistematizirane nomenklature za medicinu (<http://snomed.org>). Kodira se /= za benigne tumore; /3 za maligne tumore i /1 za tumore nejasnog ili graničnog obnašanja u smislu benignosti ili maligniteta.

\* Označeni brojevi su provizionalni znaci predloženi za 4. izdanje ICD-O. Dok se očekuje da budu uključeni u slijedeće ICD-O izdanje, ipak su podložni eventualnim izmjenama.

## **1.4.2 TUMORI SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA U DJECE**

Tumori središnjeg živčanog sustava svakako predstavljaju izazov u liječenju. Različitost u biološkoj pojavnosti unutar jedinstvenog miljea središnjeg živčanog sustava u razvoju, zahtijeva prilagodljiv i detaljan plan liječenja. Zadnjih godina eksponencijalno raste naše znanje o molekularnoj i genetskoj osnovi malignih bolesti u djece (2).

### **1.4.2.1 Gliomi niskog gradusa (eng. low grade)**

Astrocitomi su najčešća podgrupa tumora SŽS u djece. Najčešći histološki tipovi su pilocitni i fibrilarni astrocitom koji pripadaju skupini glioma niskoga gradusa. Brojni drugi glijalni tumori se isto tako mogu vidjeti u djece uključujući pleomorfne ksantoastrocitome (PXA), subependimalne astrocitome glijalnih stanica, gliomi visokog gradusa (eng. high grade), gangliogliomi i dezmoplastični infantilni gangliogliomi, astroblastomi, ependimomi i oligodendrogliomi.

#### **1.4.2.1.1 Astrocitomi**

Supratentrijalni tumori čine 40 do 60% tumora SŽS u djece. Gotovo dvaput su češći u dojenčadi nego u starije djece. Većinu supratentorijalnih tumora čine gliomi (astrocitomi, oligodendrogliom i ependimom) s najčešćim podtipom gliomom niskoga gradusa koji čini polovicu svih. Za razliku od distribucije glioma u odraslih, maligni gliomi se javljaju samo u 20% svih supratentorijalnih glioma u djece.

Za većinu glioma etiologija je nepoznata. Djeca koja imaju familijarne predisponirajuće sindrome imaju povećani rizik za nastanak glioma i niskog i visokog gradusa. Zaposlenje roditelja u kemijskoj i električnoj industriji pogoduje nastanku astroglijalnih tumora u potomaka. Ukoliko majke prenatalno uzimaju vitamine može doći do protektivnog učinka. Do sada se jasno se povezuje ionizirajuće zračenje s razvojem glioma koji je u tom slučaju 2,6 puta češći.

Neurofibromatoza tip 1 (NF1) je povezana s povećanim rizikom za intrakranijalne tumore. 15-20% bolesnika s NF1 ima intrakranijalne tumore niskog gradusa. Pilocitni astrocitom nastaje najčešće na optičkom živcu, optičkoj hijazmi, hipotalamusu i/ili moždanom deblu.

Klasifikacija astrocitoma po SZO se dijeli u 4 tipa. Tip 1 je neifiltrirajući pilocitni astrocitom; tip 2 difuzni astrocitom; tip III anaplastični astrocitom i tip IV multiformni glioblastom. Cerebelarni astrocitomi tip I i II čine 70 do 80% svih tumora tog tipa, a u djece 15%; nastaju iz različitih prekursorskih stanica.

##### **1.4.2.1.1.1 Astrocitomi I i II gradusa**

Budući su pilocitni astrocitomi najčešći u prva dva desetljeća života često se nazivaju i juvenilni pilocitni astrocitomi (JPA). Oni se nalaze duž neuroaksisa (optički put, hipotalamus, cerebralne hemisfere, moždano deblo i leđna moždina) iako ih se 80% nalazi u cerebelumu. Ovi tumori su obično dobro ograničeni i ne infiltriraju okolno tkivo. Jedina iznimka je gliom optičkog puta koji infiltrira n. optikus i izaziva gubitak vida. JPA

imaju bifazični izgled kompaktnih, bipolarnih fibriliranih astrocita s Rosenthalovim nitima. Nekroza može biti prisutna, ali nema prognostički značaj i ne ukazuje na malignitet ili lošu prognozu. Lokalna leptomeningealna diseminacija se javlja u polovice slučajeva i isto tako nema prognostički značaj.

Astrocitomi tip II se razlikuju od pilocitnih tumora prema lokaciji, stupnju infiltracije i prisutnim genetskim aberacijama. Uglavnom, astrocitomi II stupnja imaju tendenciju rasta i oštećenja struktura koje zasjedaju.

#### **1.4.2.1.1.2 Ostali astrocitomi niskog gradusa**

Nadalje, astrocitomi niskog gradusa se mogu podijeliti na temelju njihova mikroskopskog izgleda. Prognostička vrijednost ovih podgrupa nije potpuna jasna.

Fibrilarni astrocitom je najčešći podtip astrocitoma tip II i ima jedinstvenu kompaktnu organizaciju fibrilarnih astrocita s različitim stupnjem celularne atipije i slabom strukturom matriksa.

PXA je nedavno otkriven podtip; rijedak je GFAP pozitivan astrocitni tumor koji se tipično pojavljuje u cerebralnim hemisferama djece i mlađih odraslih. Karakteriziraju ga veliki, neoplastični astrociti s nuklearnim pleomorfizmom i vrlo atipičnim jezgrama.

Dezmoplastični infantilni astrocitom DIA je rijedak tumor koji se javlja u djece stare do 18 mjeseci. Ovi tumori su obično veliki, cistični, supratentorijalne lokalizacije i prijanjaju uz duru.

Najmanje učestali podtip je protoplazmični astrocitom koji ima prominentne mikrociste, mukoidnu degeneraciju i blagu GFAP pozitivnost. Neki ga smatraju histološkom formom fibrilarnog astrocitoma.

Difuzni cerebelarni astrocitom predstavljaju low grade astrocitome cerebralnih hemisfera sa slabo ograničenim granicama i invazijom okolnog parenhima.

Bez obzira na subtip, astrocitomi niskog stupnja imaju nisku celularnost, ograničenu atipiju jezgara i blagu mitotsku aktivnost.



Citogenetske abnormalnosti se pojavljuju rjeđe nego kod odraslih. U odraslih, mutacije astrocitoma nikog stupnja u p53 tumor supresorskom genu su česte i mogu upućivati na ranu malignu alteraciju, dok su u djece rijetke. Najveći dio pilocitnih astrocitoma u djece imaju normalan citogenetski nalaz. Najčešće abnormalnosti su na kromosomima 1, 7 i 8 i gubici 17p i 17q. Aberantna aktivacija mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK) zbog duplikacije BRAFa je najčešći oblik tumorogeneze u astrocitomima niskog gradusa u djece.

Drugi kromosomski abnormalni marker JPA je nestabilnost 22q13.

Bolesnici bez NF1 s JPA često imaju različiti genetski profil. Uvijek dolazi do aktivacije mTOR puta, što je moguće različitim mehanizmima. Novije eksperimentalne studije ukazuju na činjenicu da tumori II stupnja imaju višu mitotičnu aktivnost, viši postotak stanica u S fazi, izrazitiju aktivnost faktora VEGF (vascular endothelial growth faktor) nego tumori prvog stupnja.

Do sada ne postoji molekularni prognostički kriterij koji predviđa progresiju tumora. Svakako, otkrivanje tih markera navelo bi na nove molekularne ciljeve terapije, ali isto tako omogućilo brzu patološku karakterizaciju i klasifikaciju tumora.

#### **1.4.2.1.2 Cerebelarni astrocitom**

Čini 10 do 20% tumora SŽS te 20 do 40% svih tumora stražnje lubanjske jame u djece. Infratentorijalni tumori čine oko 50% svih intrakranijalnih tumora u djetinjstvu i uključuju meduloblastom/PNET (20% ), cerebelarni astrocitom (15%) , ependimom (5%), gliom moždanog debla (3%) te različite druge tipove tumora. Nakon kirurške resekcije karakteristično je dugo preživljavanje, a ovisno je o histološkom tipu, raširenosti i opsežnosti kirurške resekcije.

Novija laboratorijska istraživanja su usmjerena u definiranje molekularnih oblika različitih stupnjeva cerebelarnih astrocitoma. Klinička istraživanja usmjerena su prema terapiji rezidualnog ili rekurentnog tumora, ulogi adjuvantne terapije, funkcionalni ishod nakon terapije, terapija

komplikacija kao što su pseudomeningokele, shunting likvora i cerebelarni mutizam.

Incidencija cerebelarnih astrocitoma je između 0.2 do 0.33 slučaja na 100000 djece na godinu, s vrhom incidencije u dobi od 6 godina. Spol ne igra ulogu u pojavnosti tumora, niti postoji geografska ili etnička predispozicija. Sam naziv cerebelarni astrocitom ukazuje na benignu prirodu tumora iako to ovisi o histološkom tipu. 80% cerebelarnih astrocitoma čine JPA (st.I je benigna forma); fibrilarni astrocitom (st.II) čini 15%; anaplastični astrocitom (III st.) i glioblastom (IV st.) čine svaki oko 5%. Bolesnici koji imaju NF1 imaju 5% mogućnosti da razviju JPA.

Cerebelarni astrocitomi mogu biti cistični, solidni ili mješovite građe. JPA su tipično cistični i sadrže žuto smeđu tekućinu i neoplastične čvoriće u stijenkama. Ciste imaju pseudokapsulu od glije ili sadrži neoplastične stanice. Difuzni subtipovi nemaju ciste. Cistične lezije su češće u cerebelarnim hemisferama, dok se solidni tumori češće javljaju u srednjoj liniji u blizini vermisa.

1995. god. Gilles i suradnici su predložili još jednu klasifikaciju cerebelarnih astrocitoma na temelju histoloških karakteristika i preživljavanja (121). Gliomi A skupine imaju ciste, leptomeningealno diseminiraju, Rozentalova vlakna, oligodendrogliome. Gliomi B skupine imaju kombinaciju pseudorozeta, hipercelularnost, mitoze, nekroze ili kalcifikacije. Gliomi C skupine su kombinacija prve dvije. Desetgodišnje preživljavanje za gliome A je bilo 94% za gliome B 29% i C gliome 69%.

#### **1.4.2.1.3 Gliomi optičkog puta**

Javljaju se na svim mjestima koja se nalaze anatomske u području optičkog puta. Rastu kao infiltrativne lezije iako se znaju vidjeti i velike mase. Infiltriraju vrlo često hipotalamus. 10% ovih tumora infiltrira samo jedan optički živac, 30% oba. Gotovo svi infiltriraju hijazmu ili hipotalamus. Gliomi optičkog puta čine 4 do 6% svih tumora SŽS u djece; 2% u odraslih i 20 do 30% svih glioma u djetinjstvu. Vrh incidencije je u prvom desetljeću života. NF1 je prisutna u 25 do 60% ovih bolesnika. 15 do 25% bolesnika

s NF1 imaju gliom optičkog puta na MRI ali ih je samo 1 do 5% simptomatskih. Bolesnici s NF1 imaju bolju prognozu od onih koji je nemaju.

Većina ovih tumora diencefalona i optičkog puta su histopatološki gliomi niskog gradusa, obično pilocitni ili fibrilarni astrocitomi. Histološki optički gliomi pokazuju dva različita oblika rasta. U bolesnika bez NF1 tumor je obično samo u području optičkog puta, ne zahvaća meninge, dok u bolesnika sa NF1 zahvaća. Bolesnici s hijazmatično hipotalamičkim gliomom imaju veću mogućnost diseminacije duž neuroaksisa.

Noviji radovi Dasgupte i suradnika ukazuju da metionin aminopeptidaza 2 (Met AP2) je specifičan nalaz u likvoru bolesnika s NF1 u ljudi i miševa (122). Ne nalazi se u sporadičnih pilocitnih ili ostalih low grade glioma. Fumagilin je njen inhibitor i posljedično dolazi do smanjenja proliferacije astrocita in vitro. Ta činjenica upućuje na mogućnost terapijskog djelovanja fumagilina. U novijim istraživanjima koriste se mTor inhibitori s ciljem terapijskog djelovanja na gliome u bolesnika sa i bez NF1.

Bolesnici s unilateralnim tumorom imaju dobru prognozu nakon cjelovite kirurške resekcije. 92% preživi 15 godina ne glede na status NF1. Svakako, hijazmatično diencefalični smješteni tumori imaju lošiji ishod. U studiji Packera i suradnika statistički signifikantni prognostički faktor je bila dob djece te su djeca 5 godina i mlađa imala 3 godišnju stopu preživljavanja 74% u usporedbi sa 39% u starije djece (123, 124, 125, 126).

#### **1.4.2.1.4 Oligodendrogliomi**

Osnovni razlog zbog kojeg je još uvijek nejasna incidencija ovih tumora jesu značajne razlike između dijagnostičkih kriterija koje postavljaju neuropatolozi. U djece čine oko 1% svih tumora SŽS. Vrlo rijetko je prisutna mutacija p53. Gotovo polovica ovih tumora pokazuje karakteristični gubitak dugog kraka 1. kromosoma i kratkog kraka kromosoma 19 što može poslužiti kao dijagnostički kriterij prema astrocitnim tumorima.

Oligodendrogliomi nastaju u bijeloj tvari i imaju sklonost širenja prema korteksu. Rado se smještaju uokrug neurona i krvnih žila ispod pije. Histološki izgled se često opisuje kao jaja na oko. Perinuklearni „haloi“ se nažalost ne vide na zamrznutim ili u formalinu fiksiranim preparatima. Većina oligodendrocita pokazuje pozitivnu reakciju za S100 protein. Oligodendrogliomi niskog gradusa se razlikuju od oligodendroglioma visokog gradusa prema slabije izraženoj celularnosti, mitotskoj aktivnosti, minimalnoj atipiji jezgara, te odsutnosti proliferacije endotela i nekroze. Oligodendrogliomi imaju blagu predilekciju za frontalni režanj.

#### **1.4.2.2 Gliomi visokog gradusa (eng. high grade glioma)**

Astrocitomi su najčešći tumori SŽS u djece i čine 40 do 50% svih tumora u djece. SZO ih klasificira u niskog gradusa (I i II stupnja) i visokog gradusa (III i IV stupanj). Gliomi visokog gradusa se javljaju u 20% tumora SŽS u djece i imaju slabu prognozu. Petogodišnje preživljavanje je manje od 20%.

Gliomi visokog gradusa su anaplastični astrocitom (AA) SZO gr. III i glioblastom (GBM) SZO gr. IV. Oni su manje pojavnosti u djece nego li u odraslih i javljaju se samo u 15 do 20% djece s tumorima mozga. Anaplastični tumori s oligodendroglijalnom komponentom su rijetki u djece. Maligni gliomi se javljaju u 6.5% tumora mozga. Nekoliko je gentičkih sindroma koji se povezuju s ovim tumorima. To su NF1, Turcoov sindrom i Li Fraumeni sindrom.

AA i GBM su difuzno infiltrativni maligni gliomi. Imaju visoku mitotsku aktivnost, invadiraju u lokalno tkivo posebno duž dubokih traktova bijele tvari (npr. korpus kalozum, prednja komisura, forniks ili kasula interna). Neuobičajeni rast malignog astrocitoma kroz cijelu hemisferu naziva se cerebralna gliomatoza.

Za razliku od astrocitoma II stupnja, AA pokazuje veću nuklearnu atipiju, celularnost, pleomorfizam, mitotsku aktivnost. Dijagnoza GBM se obično postavlja na temelju prisutnosti nekroze ili mikrovaskularne proliferacije.

Ostali tipovi tumora ove skupine su anaplastični oligodendrogliom (AO), anaplastični mješoviti gliom (AMG) i anaplastična varijanta pleomorfnog ksantoastrocitoma, ganglioma i pilocitnog astrocitoma.

Gliomi visokog gradusa u djece se razlikuju od onih u odraslih iako imaju slične histološke karakteristike. GBM se mogu javiti kao primarni (de novo) u odraslih ili kao sekundarni (iz glioma niskog gradusa). De novo se javljaju oni koji su povezani sa amplifikacijom EGFRa (epidermal growth factor) i protein homolog fosfataze i tenzina (PTEN) mutacija. Sekundarni se javljaju u mlađih osoba i imaju mutaciju p53 te prekomjernu ekspresiju trombocitnog receptora

Malo je poznato o molekularnim karakteristikama pedijatrijskih glioma. Neke studije su identificirale mutacije p53 koje su povezane sa slabijim ishodom.

#### **1.4.2.3 Gliomi moždanog debla**

Gliomi moždanog debla su skupina tumora s lošom prognozom. S upotrebom magnetne rezonance sada se prepoznaje ovu skupinu tumora kao heterogenu skupinu s različitim subtipovima koji se razlikuju u prognozi. Grubo se dijele u dvije skupine difuzni intrinzični gliom i ne-difuzni tumori moždanog debla. Difuzni intrinzični gliomi se najčešće javljaju i to u području ventralnog dijela ponsa, infiltriraju u okolinu i imaju lošu prognozu. Ne difuzni se nalaze obično u središnjim dijelovima mozga, dorzalno, cervikomedularno. Svi su uglavnom sporog rasta i dobro reagiraju na kiruršku terapiju.

Tumori moždanog debla čine 10 do 20% svih tumora mozga u djece, a 90% je od glije. 75% ih se javlja prije 10 godine života.

Prognoza djece s difuznim pontinim gliomom je vrlo slaba, poluživot je 4 do 15 mjeseci. Za sve tumore moždanog debla petogodišnje preživljavanje je 20 do 30%.

Difuzni gliomi ponsa čine 80% svih tumora moždanog debla.

Ovi gliomi su klasificirani više prema lokaciji nego li po histologiji. Dije se u difuzne intrinzične gliome koji nastaju primarno u ponsu i imaju lošu prognozu i ne-difuzne gliome od kojih većina ima low grade histologiju i

povoljniju prognozu. Benigni i manje maligni tumori javljaju se češće u srednjoj liniji i meduli, dok high grade gliomi se javljaju češće u području ponsa. Važno ih je odijeliti od ostalih tumora stražnje lubanjske jame zbog različitih terapije i prognoze.

Većina difuznih glioma ponsa su fibrilarni i pokazuju nuklearnu atipiju, oskudnu citoplazmu, mikrociste, vioku mitotičku aktivnost i pleomorfizam jezgara. To je karakteristika astrocitoma gr.III, za razliku od gr.IV koji se odlikuje i mikrovaskularnom proliferacijom i nekrozom.

Najveći broj tumora ove skupine čine astrocitomi gr.I (pilocitni) i gr.II.

Veliki broj ovih tumora pokazuje visoku pojavnost mutacija koji proizlaze iz p53 gena. Također imaju visoki nivo IL13 i mRNA.

#### **1.4.2.4 Ependimomi**

To je skupina tumora koja nastaje iz endodermalnog sloja stanica koji se nalazi između ventrikularnog sistema i centralnog kanala leđne moždine. Intrakranijalni ependimomi čine 9% svih tumora mozga u bolesnika mlađih od 20 godina i 1/3 svih primarnih tumora mozga u djece. Incidencija je 2,6 u dobnoj skupini do 14 godina. Tumori te skupine koji nastaju u spinalnom kanalu čine 10% incidencije. Ependimomi su dva puta češći u muške djece. Etiologija je nepoznata. Zapažena je povećana incidencija u vrijeme kada je cjepivo za poliovirus i adenovirus bilo kontaminirano simian virusom 40. U to vrijeme je opažena povećana incidencija karcinoma uopće. Neurofibromatoza tip 2 je jedini poznati genetski poremećaj koji se povezuje sa ependimomima. Bolesnici s NF2 obično razviju intramedularni spinalni tumor. 25-70% bolesnika ima NF2 mutacije.

Najčešće se javljaju u području treće, četvrte i lateralnih komora, te u lumbosakralnom dijelu spinalnog kanala. Postoje 3 stupnja ependimoma. Gradus I su subependimom i miksopapilarni ependimom. Subependimom najčešće nastaje na zidu ventrikla. Karakteristični su grozdovi monomorfni stanica oko fibrila. Često nastaje fokalna cistična degeneracija, vaskularna hijalinizacija, depozicija hemosiderina i kalcifikacija. Pokazuju niski stupanj stanične proliferacije. Nemaju

citogenetskih promjena i mnogi ih autori smatraju hamartomima. Mnoge slučajno nalazimo na autopsiji.

Miksopapilarni ependimom nastaje u području filuma terminale u regiji kaude ekvine. Povremeno prodire u okolne strukture (kost i meka tkiva), rijetko diseminira.

Ependimomi II stupnja su solidni i dobro ograničeni od okolnih struktura. Histološki pokazuju pseudorozete koje čine neoplastične stanice oko krvnih žila. Obično imaju nisku mitotičnu aktivnost.

Tip III anaplastični (maligni) ependimom pokazuje histološki anaplaziju, visoku celularnost, atipiju jezgara. Ependimomi su skupina tumora kod kojih se može dokazati genetske promjene na mnogim kromosomima npr 1, 5, 7, 9 itd. U nekima od njih se mogu prikazati stanice za koje se smatra da bi mogle pripadati onima koje iniciraju tumorsku proliferaciju.

#### **1.4.2.5 Embrionalni tumori**

Bez obzira na mjesto nastanka unutar SŽS ovi tumori su grupirani pod kišobranom termina primitivni neuroektodermalni tumori (PNET). Relativno je njihova histološka pojavnost homogena, a čine ju slabo kohezivne, nediferencirane neuroepitelijalne stanice često s visokim stupnjem mitoze i često pokazuju neuroblastičnu transformaciju. Imaju tendenciju da diseminiraju kroz likvor i to doprinosi njihovom slabom ishodu.

##### **1.4.2.5.1 Meduloblastom**

Incidencija meduloblastoma je 3,5 na 100000 djece na godinu. 1,5 puta je češći u muške djece. Etiologija tumora je nejasna. U neke djece se povezuje s Gorlinovim ili rijetko Turcotovim sindromom, Li Fraumenijevim sindromom, ataxijom- teleangiektazijom i Coffin Sirisovim sindromom.

Većina se slaže s pretpostavkom da je meduloblastom zaseban cerebelarni tumor. Klasificiran je kao IV stupnja zbog velikog stupnja maligniteta. Manja diferenciranost i anaplazija su povezani s lošijim ishodom. To je tumor malih okruglih stanica. Brojne su histološke varijante. Desmoplastični i nodularni meduloblastomi imaju bolji ishod.

Molekularni markeri su *cmyc*, *trkC*, *erbB2*. Noviji laboratorijski izvještaji upućuju na ulogu ljudskog homologa *Drosophila* gena (*PTCH*) čije mutacije se često nalaze u ovim tumorima.

#### **1.4.2.5.2 Atipični teratoidni tumor**

ATRT čini 1-2% svih tumora mozga u djece, oko 10% u dojenčadi, a srednja dob kada se postavlja dijagnoza je 1 do 7 mjeseci. Dvostruko češće se javlja u muške djece.

ATRT je maligni embrionalni tumor koji se sastoji od rabdoidnih stanica i dodatnih malih embrionalnih, mezenhimalnih i epitelijalnih stanica. Rabdoidne stanice imaju epitelijalni membranski antigen i vimentin. Index definiran s pozitivnim bojanjem za MIB1 je 80%. 90% tumora je monosomno ili ima deleciju kromosoma 22. Postoje homozigotne delecije ili mutacije *hSNF5/INI1* gena koji je na mjestu kromosoma 22q11.2.

Prognoza ovih tumora je loša, većina djece umre u prvoj godini postavljanja dijagnoze. Ne širi se duž neuroaksisa. Bubrežni rabdomioidni tumori ne metastaziraju u SŽS stoga abdominalni ili staging prsnog koša nije potreban.

#### **1.4.2.5.3 Drugi embrionalni tumori**

##### **1.4.2.5.3.1 Pineoblastom**

To su maligni tumori IV stupnja pinealne regije. Polovica njih jesu pinealni parenhimski tumori koji se javljaju u prve dvije dekade života, nešto češće u muških osoba. Imaju tendenciju širenja duž neuroaksisa. Pineoblastom se može javiti zajedno s uni ili bilateralnim retinoblastomom pa se to stanje naziva trilateralni retinoblastom. U tom slučaju srednje vrijeme preživljavanja je 11 mjeseci. Pineoblastom se opisuje i pri Turcotovom sindromu.



#### **1.4.2.5.4 Ostali nonpinealni embrionalni tumori**

##### **1.4.2.5.4.1 Intrakranijalni germ cell tumori**

Intrakranijalni germ cell tumori su skupina relativno rijetkih tumora koji pokazuju veliku sličnost germ cell tumorima koji nastaju izvan SŽS. Svi nastaju iz fetalne žumanjčane vreće (yolk sac), a lokacija tumora ovisi o migraciji stanica za vrijeme ranog fetalnog razvoja.

Dijele se u dvije skupine: germinomi i nongerminomi. Germinomi su češći (50-70% ukupnog broja slučajeva). Nongerminome čine embrionalni karcinom, endodermalni sinusni tumor (yolk sac), koriokarcinom, teratom te mješoviti germinom. Intrakranijalno germinomi nastaju najčešće supraselarno.

U Japanu i na Tajvanu incidencija ovih tumora je značajno veća od incidencije u zapadnim europskim zemljama ili Americi. 2,5 puta je češća incidencija u muške djece. U djevojčica 75% tumora nastaje supraselarno, a u dječaka 70% nastaje u pinelnoj zoni. Razlog nije poznat.

Patogeneza intrakranijalnih germ cell tumora se povezuje s gonadotropinima, pogrešnom migracijom primordijalnih germ cell stanica tijekom embrionalnog razvoja uz malignu transformaciju. Pojavljuju se izvještaji o protoonkogenu c-kit koji djeluje na površini stanice i regulira receptor za aktivnost tirozin kinaze.

Danas se ovi tumori klasificiraju na osnovi histologije i tumorskih markera kao što su AFP (alfa feto protein) i  $\beta$ HCG (beta humani korionski gonadotropin), a koji imaju i prognostičku vrijednost.

Intrakranijalni germinomi su histološki identični disgerminomima jajnika i seminomima testisa. Diferencijalna dijagnoza uključuje limfome i endodermalne tumore sinusa.

Glede citogenetskog nalaza vrlo često se navode gubici kromosoma 4, 9p, 11, 13, 17p itd.

#### **1.4.2.5.4.2 Kraniofaringeom**

Kraniofaringeomi su skupina histološki benignih neuroepitelijalnih tumora koji nastaju iz skvamoznog epitela duž primitivnog kraniofaringealnog duktusa i adenohipofize. Incidencija je 1,3 na 1000000. Čine 5-10% tumora SŽS u djece, 56% onih koji se javljaju u selarnoj i supraselarnoj regiji. Najveći broj tih tumora javlja se u odraslih.

Iako nisu maligni tumori njihova morfogeneza upućuje na abnormalan razvojni signalni put. Barbosa i suradnici su 2001.god. istraživali ulogu AChE i PChE. Potvrdili su visoke vrijednosti AChE i niske PChE. Za niske vrijednosti PChE smatraju da je razlog spor rast tumora. Korelacija između PChE i prognoze bolesti nije istraživana (127).

Genetske alteracije kraniofaringeoma nisu jasno utvrđene. Buslei i suradnici su istraživali ulogu Wnt signalnog puta patogeneze kraniofaringeoma koji bi moguće.rasvijetlio etiologiju nastanka (128).

#### **1.4.2.6 Neuronalni tumori**

##### **1.4.2.6.1 Gangliom i gangliocitom**

Ovi tumori pripadaju skupini spororastućih rijetkih tumora. Godine 1930. Courville je pojasnio naziv ovih tumora njegovom mješovitom građom od neuronalnih i glijalnih elemenata. Iako postoji razlika u patologiji ova dva tumora, u temelju su ova dva podtipa biološki ista. Gangliogliomi čine 0.4% tumora SŽS. Obično nastaju supratentorijalno, temporalno. Mogu biti solidni ili cistični. Gangliocitomi se sastoje od velikih multipolarnih neurona s displastičnim karakteristikama.

##### **1.4.2.7 Disembrioplastični neuroepitelijalni tumor**

DNET je tumor koji se nalazi supratentorijalno. Prvi put je opisan u studiji 39 djece koja su imala tumor i tvrdokorne parcijalne epileptičke napade.

Nastaje u korteksu i njime se i širi.

### **1.3.2.8.3 Centralni neurocitom**

Centralni neurocitom je rijedak tumor koji najčešće nastaje u području foramen Monroa. Slične oligodendrogliomima. Neuron specifična enolaza NSE i sinaptofizin potvrđuju neuronalno porijeklo ovih tumora.

### **1.4.2.8 Tumori korioidnog pleksusa**

Dijele se u papilome i karcinome korioidnog pleksusa. Etiologija nije poznata. Neki ih povezuju s SV40 DNK virusom u primata (129).

### **1.4.2.9 Intramedularni tumori leđne moždine**

#### **1.4.2.9.1.1 Ependimomi**

To su izrazito celularni tumori, neovisno o stupnju. Dijele se u 4 stupnja: subependimom, miksopapilarni ependimom, benigni ili klasični i anaplastični. Spororastući su. Anaplastični je izrazito invazivan. U 75% ovih tumora nalaze se promjene na kromosomima, najčešće LOH.

#### **1.4.2.9.2 Astrocitomi**

To su najčešći tumori ovog područja. Vrlo često sadrže ciste. Najčešći su pilocitni astrocitomi. Juvenilni pilocitni astrocitomi JPA se najčešće povezuju s nasljednim sindromima kao što su Li Fraumeni, Turcotte sindrom, kompleks tuberozne skleroze, Maffucci Olierovom bolesti te NF (130).

#### **1.4.2.10 Rijetki tumori**

##### **1.4.2.10.1 Meningeomi**

Meningeomi su najčešće benigni tumori koji nastaju iz arahnoideje, najčešće iza petog desetljeća života. Vrlo su rijetki u djece. Iako najveći dio njih nastaje spontano, rizični faktori su prethodna radioterapija i neurofibromatoza tip 2. NF2 nosi mutaciju 22 kromosoma što dovodi do disfunkcije NF2 tumor supresor gena. Incidencija neurofibromatoze u djece s meningeomima je od 13 do 41%.

##### **1.4.2.10.2 Pituitarni adenomi u djece**

Pituitarni adenomi čine 1 do 10% svih tumora SŽS u djece. Većina bolesnika ima hormonski sekretorne tumore. Najčešće se radi o prolaktinomima (45 do 53%), ACTH sekretornim adenomima ili kortikotropin adenomima te adenomima s produkcijom hormona rasta. Tumori koji secerniraju tiroid su rijetki.

Većina pituitarnih adenoma su benigni tumori koji nastaju iz epitelijalnih stanica adenohipofize. Prolaktinomi, kortikotrofni adenomi ili somatotrofni adenomi su česti u bolesnika sa sindromom multiple endokrine neoplazije tip 1 (MEN1). Somatotrofni adenomi su povezani s nekoliko nasljednih stanja uključujući i McCune Albright sindromom ili Carneyevim kompleksom. Makroadenomi su u promjeru veći od 1 cm. Veličina tumora je povezana s njegovom sekretornom funkcijom. Hormonski inaktivni su obično makroadenomi.

##### **1.4.2.10.3 Primarni limfomi središnjeg živčanog sustava (Primar CNS lymphoma - PCNSL)**

PCNSL čine 4 do 7% svih intrakranijskih neoplazmi i 1 do 2% svih limfoma. U posljednje tri dekade incidencija ovih tumora je narasla deset puta i to u imunokompromitiranih i imunokompetentnih osoba. Vrlo su rijetki u dječjoj dobi. Nastaju najčešće iz B limfocita i više od 90% su

difuzni veliki B stanični limfomi. Ostatak čine low grade limfomi, Burkitt limfomi ili T stanični limfomi. Povezuju ih s AIDSom, EBV, HHV8 (Kaposi sarkom povezan herpes virus). Kromosomske abnormalnosti nisu česte.

#### **1.4.2.10.4 Hemangioblastomi**

Hemangioblastomi su benigni dobro vaskularizirani tumori koji nastaju iz SŽS. U djece su iznimno rijetki. U 50% slučajeva su povezani s von Hippel Lindau bolešću. To je AD bolest koja nastaje zbog mutacije 3. kromosoma što izaziva gubitak funkcije VHL tumor supresorskog gena. Bolesnici imaju predispoziciju ne samo za hemangioblastome već i za ciste bubrega, karcinome, neuroendokrine tumore i cistadenome reproduktivnih organa.

#### **1.4.2.11 Neurokutani sindromi povezani sa tumorima SŽS**

Povijesno ovi sindromi se odnose na poremećaje koji zahvaćaju kožu, SŽS i jedan ili više organskih sistema. U tu skupinu spadaju NF1 i NF2; tuberozna skleroza (TS), ataksija teleangiektazija (AT) von Hippel Lindau (VHL) i Sturge Weber sindrom (SWS). Displazija koja nastaje zbog specifičnih genetskih alteracija unutar normalnog tkiva ektoderma dovodi do ovih neurokutanih sindroma. Ovi bolesnici imaju veliki rizik od razvoja tumora SŽS koji se međusobno mogu razlikovati po tipu.

##### **1.4.2.11.1 Neurofibromatoza tip 1**

Nekada se nazivala i von Recklinghausenova bolest. Autosomno je dominantna s incidencijom 1:3000-4000. NF1 Gen se nalazi na kromosomu 17q11.2. Postoji više od 200 mutacija. Gen kodira protein neurofibromin koji se nalazi u Schwannovim stanicama, oligodendrocitima i neuronima i djeluje kao tumor supresorni gen. Njegova mutacija dovodi do smanjene aktivnosti p21ras onkogeno, pa ne dolazi do konvertiranja p21ras u inaktivnu formu. NF1 Može zahvatiti bilo koji organ.

#### **1.4.2.11.2 Neurofibromatoza tip 2**

To je autosomno dominantna bolest s incidencijom 1:37000. Gen NF2 se nalazi na kromosomu 22q12 i kodira protein merlin koji služi poput stanično membranske veze. Mutacije ovog gena najčešće nalazimo kod meningeoma, schwanoma, ependimoma, melanoma i mesotelioma.

#### **1.4.2.11.3 Kompleks tuberozne skleroze**

Tuberozna skleroza ili Bournevillova bolest je AD bolest s incidencijom 1: 6000-9000. TSC1 gen je na kromosomu 9q34 i kodira hamartin koji je tumor supresorski gen. TSC2 gen kodira tuberin isto tako tumor supresorski gen, a nalazi se na kromosomu 16p13. Mutacije na ova dva proteina dovode do poremećaja u mTOR signalizaciji koja utječe na stanični rast. Mutacije gena dovode do nastanka hamartoma u različitim organima.

#### **1.4.2.11.4 Ataksija teleangiektazija**

Ataksija teleangiektazija (AT) je AR s incidencijom 1: 40000-80000 i obično se javlja s kutanim manifestacijama iza druge godine života. Gen za AT se nalazi na kromosomu 11 (11q23.3). AT mutirani gen otkriva DNA lomove i aktivira brojne supstrate poput p53, chk2, nibrin i BRCA1. Postoji 300 mutacija koje su do sada otkrivene.

#### **1.4.2.11.5 Von Hippel Lindau sindrom**

VHL je AD poremećaj s incidencijom 1:40000. Gen se nalazi na kromosomu 3p25-p26 i kodira tumor supresorski gen.

#### **1.4.2.11.6 Sturge Weber sindrom**

SWS ili encefalofacialna angiomatoza je rijedak neurokutani sindrom s incidencijom 1: 50000. Današnje studije upućuju na moguću ulogu fibronektina te poremećaj vaskularne drenaže u starosti 5 do 8 tjedna gestacije.

## 1.5 BIOMARKERI

Biomarker je bilo koja supstanca, struktura ili proces koji se može mjeriti u tijelu ili njegovim produktima i utječe i/ili predviđa učestalost ili ishod bolesti (131).

Iako biomarkeri imaju dugu povijest u medicini i javnom zdravstvu, sistematičan razvoj, validacija i primjena su predmet nove grane ekologije i okoliša (132).

Mogu se klasificirati kao markeri izloženosti, posljedice ili osjetljivosti. Moraju biti relevantni što znači da pružaju klinički relevantnu informaciju te da su od neosporne vrijednosti glede svoje korisnosti u smislu surogata konačnog ishoda (surrogate endpoint) (133). U zadnjem uvjetu mora postojati klinički evidentna potvrda (epidemiološka, terapijska i/ili patofiziološka) da biomarker sa sigurnošću predviđa klinički ishod, bilo dobar ili loš. On sam po sebi ne predstavlja klinički ishod. Faktori koji imaju utjecaj na studije o biomarkerima su analitički (način i broj prikupljenih uzoraka, invazivnost procedure, pohranjivanje uzorka, kontrola kontaminacije, jednostavnost i mogućnost rutinske upotrebe, preciznost, senzitivnost, specifičnost komponente koja treba biti određena, standardizacija procedure) i intrinzičke karakteristike biomarkera (signifikantnost, specifičnost, senzitivnost), njegovo poznavanje u smislu cjelokupne populacije, poštivanje varijabilnosti te poznavanje kofaktora koji mogu imati utjecaj na marker.

Biomarkeri se moraju kontinuirano klinički reevaluirati u najmanju ruku retrospektivnim analizama. Njihov potencijal omogućuje razvoj farmaceutskih pripravaka, smanjuje izlaganje neučinkovitim eksperimentalnim pokušajima liječenja itd.; ali oni predstavljaju isto tako i potencijalni rizik u trenutku kada ih u provođenju istraživanja zamijene za klinički ishod.

## **2. HIPOTEZA**

Pseudokolinesteraza (PChE) i enzimi oksidacijskog stresa: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) su dobri biomarkeri za solidne tumore središnjeg živčanog sustava u djece.



### 3. CILJEVI RADA

- a) Ispitati koncentraciju pseudokolinesteraze u likvoru i serumu djece sa solidnim tumorom središnjeg živčanog sustava i u zdrave djece kontrolne skupine.
- b) Ispitati koncentraciju superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze u plazmi i likvoru u djece sa solidnim tumorom središnjeg živčanog sustava i u zdrave djece kontrolne skupine. Odrediti malondialdehid kao marker oksidacijskog stresa u plazmi i likvoru.
- c) Dobivene rezultate glavne i kontrolne skupine ispitanika usporediti, kako bi se pseudokolinesteraza, superoksid dizmutaza, katalaza i glutation peroksidaza ocijenili u smislu biomarkera za solidne tumore središnjeg živčanog sustava u djece.

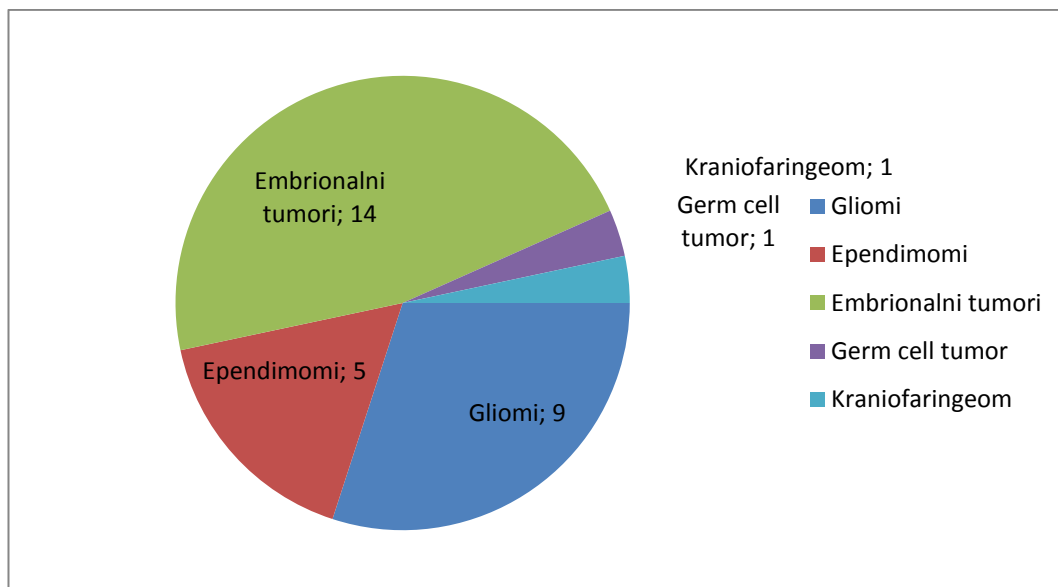
## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1 ISPITANICI

U istraživanje smo uključili ukupno 60 ispitanika u dobi od 2 mjeseca do 16 godina.

U glavnoj skupini bili su ispitanici sa solidnim tumorima SŽS. Bilo je 12 djevojčica i 18 dječaka u dobi između 2,8 i 16 godina. Srednja dob je bila 8,48 godina. Tumore smo razvrstali prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2007. godine (120). Glavnu skupinu smo podijelili prema klasifikaciji tumora i histopatološkim dijagnozama u gliome (niskog i visokog stupnja), ependimome, embrionalne tumore, germ cell tumore i kraniofaringeome.

Gliome je imalo devetero djece. Od njih je sedmero djece imalo gliome niskoga stupnja. Unutar te skupine jedno dijete je imalo anaplastični gangliogliom, dvoje djece astrocitom i četvero djece je imalo gliome. U skupini glioma visokog stupnja bilo je dvoje djece. Oboje je imalo glioblastome. Petero djece je imalo ependimome, četrnaestero embrionalne tumore, jedno dijete je imalo germ cell tumor i jedno dijete kraniofaringeom. U skupini s embrionalnim tumorima dvanaestero djece je imalo meduloblastom, jedno dijete primitivni neuroektodermalni tumor (PNET) i jedno dijete atipični rabdoidni tumor (TRAT). Svim tumorima je primarno ishodište bilo SŽS.



**Slika 1 : Solidni tumori SŽS u glavnoj skupini ispitanika**

U kontrolnoj skupini djece ispitanika bilo je šesnaest dječaka i četrnaest djevojčica u dobi između 2 mjeseca i 16 godina, s prosječnom dobi 4,35 godina. Ova djeca nisu nikada bolovala od tumorske bolesti. Bila su hospitalizirana zbog dijagnostike febrilnih konvulzija, kontrolne obrade nakon neurotraume bez znakova minimalnog krvarenja u SŽS te zbog rasta potrebe za reimplantacijom ventrikuloperitonejskog drenažnog sistema. Sva djeca su imala uredan neurološki status, nalaz CT-a mozga te biokemijske, citološke i mikrobiološke nalaze likvora.

## **4.2 PRIKUPLJANJE I OBRADA UZORAKA**

Istraživanje je provedeno u Klinici za dječje bolesti u Zagrebu, Hrvatska, u vremenu od 1. listopada 2007. do 30. studenoga 2011. godine.

Protokol studije je predstavljen Etičkoj komisiji Klinike za dječje bolesti Zagreb koja ga je odobrila. Također smo dobili pismeni pristanak roditelja svakog djeteta koje je bilo uključeno u studiju, a prethodno su dobili pismena i usmena pojašnjenja studije u cijelosti.

Od svakog djeteta prikupili smo istovremeno dva uzorka krvi i likvora. Jedan uzorak od 0.5 mL, a drugi 1 mL. Uzorci su odmah centrifugirani i odvojeni od eritrocita i zamrznuti, te pohranjeni na temperaturi od  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Likvor smo dobili lumbalnom punkcijom. Laboratorijska obrada je uključivala citološki pregled stanica, mikrobiološki (bakteriologiju) i biokemijsku analizu (glukoza u mmol/L, Cl u mmol/L, ukupni proteini g/L i albumine u g/L).

Zabilježeni su i svi lijekovi koje su djeca primala u vrijeme prikupljanja uzoraka.

Uzorci su obrađeni u laboratorijima Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti Zagreb, Klaićeva 16, Zagreb; Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice Zagreb, Vinogradska cesta 29, Zagreb i Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb.

## **4.3 OGRANIČENJA ISTRAŽIVANJA**

Bilo je nekoliko ograničenja studije. Istraživanje je provedeno u Klinici za dječje bolesti Zagreb unutar koje djeluje Referentni centar za solidne tumore dječje dobi Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske. Glede brojnosti naše populacije prikupljanje većeg broja ispitanika bi zahtijevalo odgovarajuće dulje vrijeme istraživanja. Zbog toga su studiju uključena djeca s različitim vrstama solidnih tumora SŽS. Iz istog razloga su se ispitanici razlikovali prema dobi.

## **4.4 ANALIZA UZORAKA**

### **4.4.1 Analiza pseudokolinesteraze**

Aktivnost pseudokolinesteraze određena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu s Careside TM cholinesterase test system (Careside Inc, Culver City, CA, USA) s p-hidroksibenzoil kolinom kao supstratom, proizvođača Vitros DT Slides (134).

### **4.4.2 Analiza enzima - kemikalije za analizu enzima**

#### **4.4.2.1 Analiza lipidne peroksidacije - malondialdehida**

MDA smo odredili prema metodi S. Chirico u plazmi i likvoru (135). Kontron 420 HPLC pumpa, Waters Lambda Max UV detektor na valnoj duljini 532 nm, Hewlett Packard 3392A integrator, Waters ixBondapak C18, 10  $\mu$ m 3.9 x 300 mm HPLC i Guard kolumne. 65%, 50 mmol/l kalij fosfat (pH = 7.0), 35% metanol predstavljaju mobilnu fazu s protokom od 2 ml/min. Sistem je ispran s 80% metanolom. Rezultati su izraženi u  $\mu$ mol/L.

#### **4.4.2.2 Metoda za određivanje aktivnosti glutation peroksidaze**

Aktivnost glutation peroksidaze određivana je spektrofotometrijski korišćenjem RANSEL (Randox) kita. Ova spektrofotometrijska metoda zasniva se na metodi Paglia-e i Valentine-a (136). Peroksidaza prevodi hidroperoksid u odgovarajući alkohol, pri čemu se specifični donor vodika, reducirani glutation, gSH prevodi u glutation disulfid, gSSg. u reakciji, koju katalizira glutation reduktaza, glutation disulfid se u prisustvu nadPH+ kao kofaktora prevodi u reducirani glutation. Oksidacija nadPH u nadP+ se prati spektrofotometrijski, kao smanjenje apsorbancije na 340nm i predstavlja mjeru aktivnosti glutation peroksidaze. Jedinica aktivnosti glutation peroksidaze definirana je kao količina enzima koja uzrokuje

oksidaciju 1nmol/l nadPH u minuti u prisustvu supstrata. Aktivnost glutation peroksidaze izražena je kao aktivnost enzima u jedinicama U/ml.

#### **4.4.2.3 Metoda za određivanje aktivnosti katalaze**

Za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze korištena je metoda Got-a (137). Određivanje aktivnosti katalaze bazira se na reakciji provođenja dvije molekule vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik pod uticajem katalaze:  $\text{Cat H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$  katalaza razgrađuje vodikov peroksid kao supstrat. Polazeći od pretpostavke da je aktivnost katalaze proporcionalna količini utrošenog vodikovog peroksida u jedinici vremena (min), razlika u sadržaju vodikovog peroksida u reakcijskoj smjesi prije dodavanja enzima i poslije toga predstavlja mjeru enzimske (katalazne) aktivnosti. Koncentracija vodikovog peroksida određuje se spektrofotometrijski u prisustvu amonijevog molibdata. Vodikov peroksid sa amonijevim molibdatom gradi žuto obojen, stabilan, kompleksan spoj čija se apsorbancija određuje na valnoj dužini od 405 nm. Količina utrošenog vodikovog peroksida data je kao razlika u koncentraciji vodikovog peroksida u reakcijskoj mješavini prije dodavanja enzima i poslije toga. Jedinica katalazne aktivnosti definirana je kao količina enzima koja katalizira 1 $\mu$ mol supstrata na min. pod standardnim uvjetima. Aktivnost katalaze izražena je kao aktivnost enzima izražena brojem jedinica U/ml ili U/L.

#### **4.4.2.4 Metoda za određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze**

Aktivnost superoksid dizmutaze određivana je spektrofotometrijski korištenjem RANSOD (Randox) kitta. reakcija se zasniva na pretvorbi 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolij klorida (inT) u formazan pod djelovanjem superoksid anion radikala ( $\text{O}_2 \cdot^-$ ). Superoksid anion radikal nastaje u reakciji pretvorbe ksantina u mokraćnu kiselinu pod dejstvom ksantin oksidaze. Aktivnost superoksid dizmutaze mjeri se spektrofotometrijski, na 505nm, kao stupanj inhibicije reakcije prevođenja

inT u formazan. Jedinica aktivnosti superoksid dizmutaze definirana je kao količina enzima koja uzrokuje inhibiciju ove reakcije za 50% u odgovarajućim uvjetima. Aktivnost superoksid dizmutaze izražena je kao aktivnost enzima u jedinicama U/ml.

#### **4.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Sve analize su izvedene koristeći IBM SPSS statistički paket verzija 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

U skeletni grafikon kutijastog okvira s ručicama (eng. box-and-whisker plot), donje i gornje horizontalne linije (eng. whiskers) su izvučeni iz kvartila do ekstremnih vrijednosti grupe. Normalnost je ocijenjena s Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom. Usporedba skupina izvedena je pomoću neparametrijski Mann-Whitney U-testa za kontinuirane podatke i Fisher-ov egzaktni test za rangirane podatke. Kao neparametrijska mjera statističke ovisnosti između dvije varijable upotrijebili smo Spearmanov koeficijent korelacije. Razina značajnosti postavljena je na  $P < 0,05$ . Krivulja analize Receiver Operator Karakteristika (ROC) korištena je za svaku od četiri varijable (SOD, GPX, CAT i MDA u serumu i likvor) kako bi se odredila optimalna granična vrijednost, točka granične vrijednosti (eng. cut-off), koja maksimizira željena ispitivana svojstva. Optimalna granična vrijednost od ispitivanih parametara je izračunata vrijednost praga s najvišim specifičnosti i osjetljivosti. Za odrezanih bodova, rezultati su prikazani kao osjetljivost, specifičnost, i pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti (PPV i NPV). Za svaku varijablu površine ispod krivulje (AUC) osjetljivosti prikazane su prema 1-specifičnosti koja je također određena s 95% intervalima pouzdanosti (CI).

## 5. REZULTATI

### 5.1 REZULTATI ZA PSEUDOKOLINESTERAZU

Izmjerena je aktivnost pseudokolinesteraze u likvoru i serumu ispitanika. Kako bi se isključio bilo kakav fiziološki ili patološki utjecaj od strane ispitanika, za ovu studiju osmišljen je i korišten omjer PChE likvor/serum.

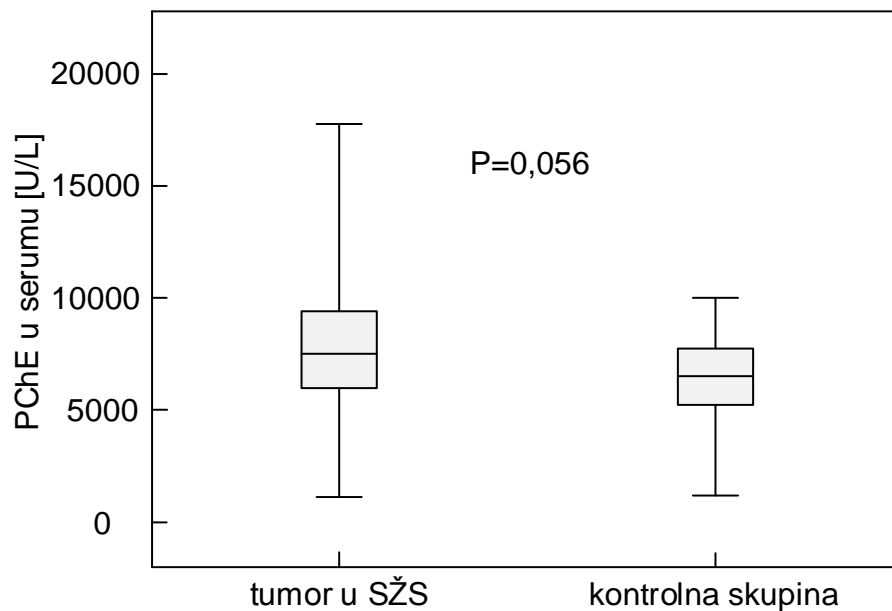
Grupe se nisu signifikantno razlikovale po spolu ( $P = 0,795$ ), ali jesu po dobi ( $P = 0,001$ ). U glavnoj skupini bilo je dvanaest djevojčica i osamnaest dječaka u dobi između 2,8 i 16 godina (srednja vrijednost 8,38 godina; IQR 4-11,25). U kontrolnoj skupini je bilo šesnaest dječaka i četrnaest djevojčica u dobi između 2 mjeseca i 16 godina (srednja vrijednost 3 godine; IQR 1,08-6,54).

PChE aktivnost u likvoru pokazala je pozitivnu korelaciju s dobi u glavnoj skupini ( $P = 0,037$ ,  $r = 0,38$ ) i negativnu korelaciju u kontrolnoj skupini ( $P = 0,883$ ,  $r = 0,003$ ). Iste rezultate dobili smo i za serum (glavna skupina,  $P = 0,057$ ,  $r = 0,35$ ; kontrolna skupina  $P = 0,259$ ,  $r = -0,21$ ). Omjer PChE likvor/serum pokazuje pozitivnu korelaciju s dobi u obje skupine ispitanika (glavna skupina  $P = 0,384$ ,  $r = 0,165$ ; kontrolna skupina ( $P = 0,74$ ,  $r = 0,063$ ).

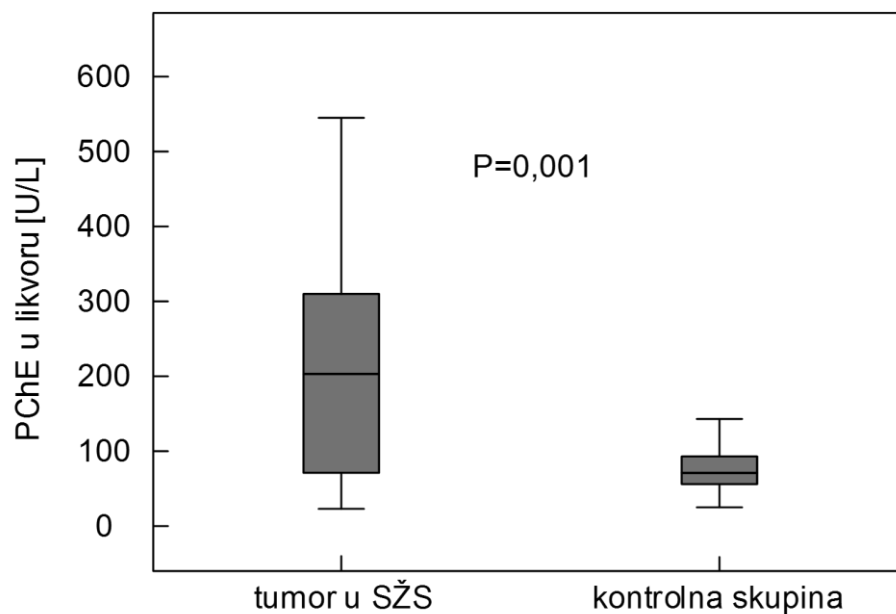
U kontrolnoj skupini srednja vrijednost, median, aktivnosti PChE u serumu je 6488 U/L (IQR 5202-7772) i u likvoru 70 U/L (IQR 55-93) (Slika 2, Slika 3). Srednja vrijednost, median, omjera PChE likvor/serum je 1,09% (IQR 0,95-1,45), a najviša vrijednost omjera PChE likvor/serum 2,66 % (Slika 4). U glavnoj skupini srednja vrijednost, median, PChE aktivnosti u serumu je 7505 U/L (IQR 5972-9397) i 202 U/L (IQR 70-310) u likvoru (Slika 2,3). Srednja vrijednost, median omjera PChE likvor/serum je 2,38% (IQR 1,14-3,97) i vršna vrijednost je 5,86% (Slika 4). PChE aktivnost u likvoru kao i omjer PChE likvor/serum su bili signifikantno viših vrijednosti u glavnoj skupini bolesnika nego u kontrolnoj (PChE u likvoru  $P = 0,001$ ; omjer



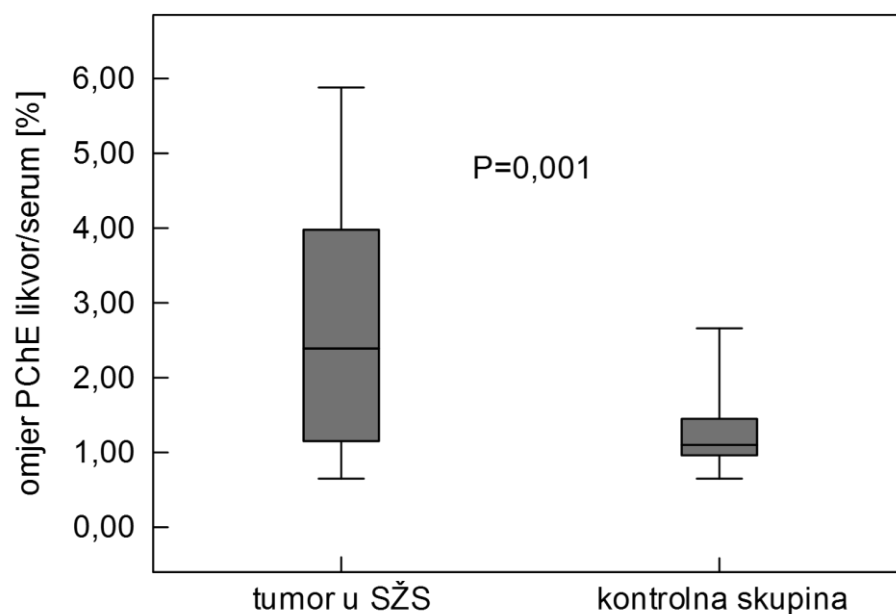
PChE likvor/serum  $P = 0,001$ ). PChE aktivnost u serumu je bila viša u glavnoj skupini, ali ne signifikantno ( $P = 0,056$ ).



**Slika 2 : Aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u serumu (U/L) u djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini**



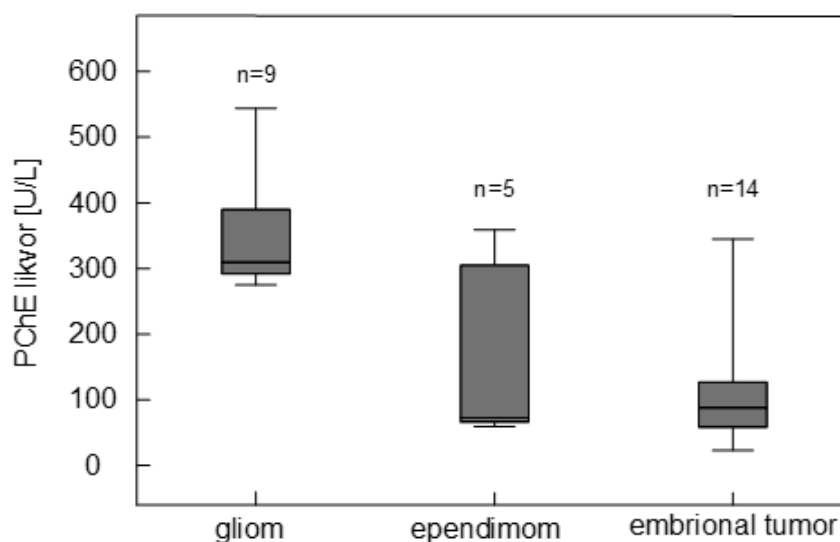
**Slika 3 : Aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u likvoru (U/L) u djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini**



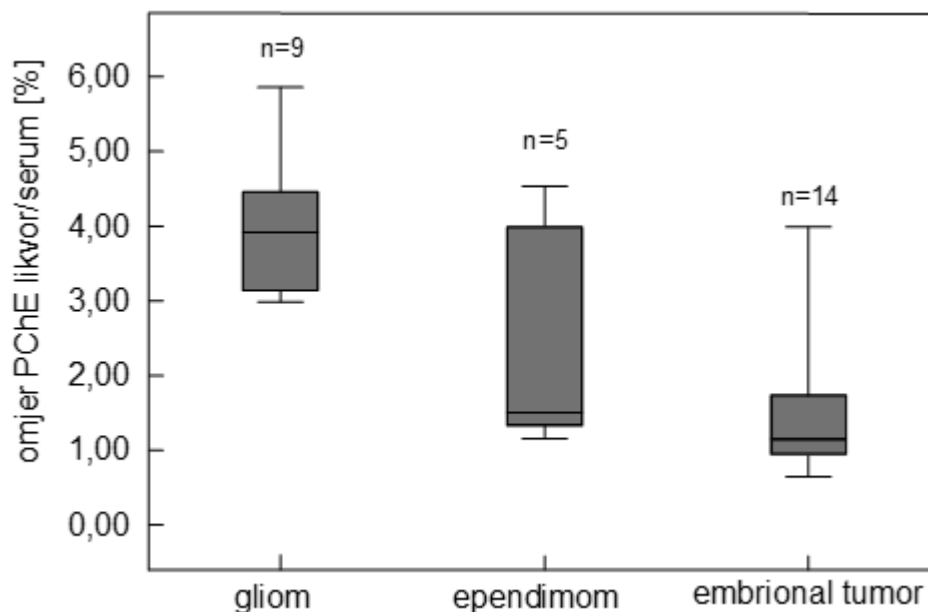
**Slika 4 : Omjer (%) pseudokolinesteraze PChE u likvoru i serumu (PChE likvor/serum) u djece u djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini**

Rezultati ukazuju na visoku varijabilnost aktivnosti PChE u likvoru u glavnoj skupini u kojoj smo isto tako dobili pozitivnu korelaciju ( $r = 0,68$ ) između PChE aktivnosti u serumu i omjera PChE likvor/serum ( $P = 0,001$ ). U kontrolnoj skupini ova korelacija je isto tako pozitivna ( $r = 0,26$ ) ali ne značajno ( $P = 0,167$ ).

Devetero djece u studiji je imalo gliome. U toj skupini varijabla omjera PChE likvor/serum je bila između 3 i 5,86% i razlike prema kontrolnoj skupini su bile najizraženije. Omjer PChE likvor/serum i PChE u likvoru u ostalim tumorima je bio niži nego li u gliomima (Slika 5, Slika 6).



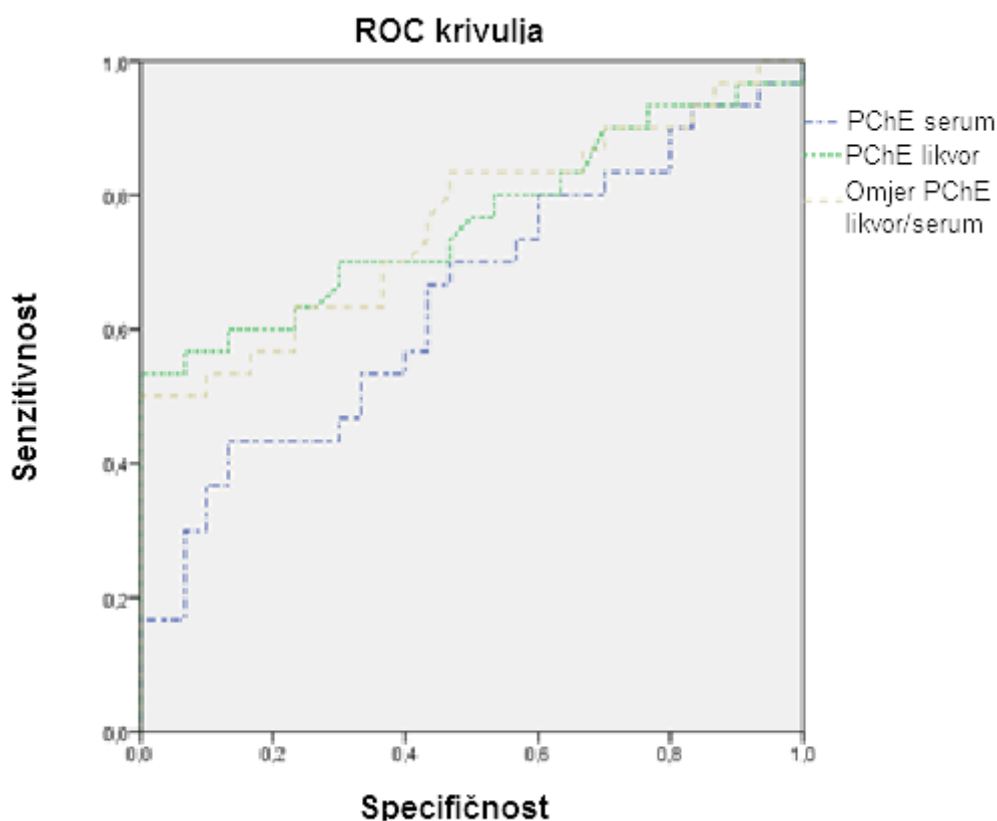
**Slika 5 : Aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) u likvoru (U/L) kod djece s različitim vrstama solidnih tumora SŽS**



**Slika 6 : Omjer (%) pseudokolinesteraze PChE u likvoru i serumu (PChE likvor/serum) u djece s različitim vrstama solidnih tumora**

Upotrijebivši analizu ROC krivulje testirana je PChE u likvoru i serumu i omjer PChE likvor/serum kako bi se ustanovilo jesu li prikladne varijable za identifikaciju prisutnosti tumora u SŽS/likvoru. Za PChE u serumu AUC je 0,64 (CI 0,50-0,78), za PChE u likvoru 0,65 (CI 0,55-0,75) i za omjer PChE likvor/serum 0,76 (CI 0,63-0,88). Analiza ROC krivulje upućuje na to da granična vrijednost za PChE u likvoru 80 U/L (21/30 bolesnika s tumorima je imalo vrijednost PChE >80 U/L) daje 70% senzitivnost, 70% specifičnost, 70% PPV i 70% NPV. Kada je granična vrijednost još više dignuta na 150 U/L svih šesnaest bolesnika sa PChE u likvoru >150 U/L je bilo pozitivno na solidni tumor, s odgovarajućom specifičnošću od 100%,senzitivnosti 53%, PPV 100% i NPV 68%.

Za omjer PChE likvor/serum granična vrijednost (cutt off) je bila 1.09. Dvadeset pet od 29 bolesnika s povišenom vrijednosti omjera PChE likvor/serum je bilo pozitivno na tumor sa senzitivnosti od 83%, specifičnosti od 53%, PPV 64% i NPV 76%. S ciljem da se maksimizira specifičnost, granična vrijednost od 2.70% odgovara specifičnosti od 100%, senzitivnosti od 50%, PPV 100% i NPV 67% (Slika 7).



**Slika 7 : Receiver operating characteristic (ROC) krivulja za predviđanje solidnih tumora SZS u djece na osnovi aktivnosti PChE u serumu, likvoru i mjera PChE likvor/serum**

Sva djeca, iz obiju grupa, su imala citološki, biokemijski i mikrobiološki nalaz likvora unutar normalnih vrijednosti za dob. Vrijednost cjelokupnih proteina i albumina su bile urednih vrijednosti. Time smo isključili neka druga patološka klinička stanja koja nisu bila prisutna u naših ispitanika. Zabilježili smo sve lijekove koje su djeca iz obiju skupina primala u vrijeme istraživanja (Tablica 2).

U kontrolnoj skupini od tridesetero djece, njih devet je primalo lijekove. Troje djece ranitidin, dvoje valproičnu kiselinu, jedno dijete promazin natrij, jedno dijete cefuroksim, jedno prednizolon i jedno dijete fenobarbiton, nitrazepam, pantoprazol, vitamin D3, laktulozu i vigabatrin. U glavnoj skupini osamnaestero djece nije primalo lijekove. Sedmero djece je

primalo ranitidin, jedno hidrokortizon, jedno aciklovir, jedno flukonazol, jedno trimetoprim sulfametoksazol i jedno dijete radioterapiju.

| Glavna skupina ispitanika   |                 | Kontrolna skupina ispitanika   |                 |
|-----------------------------|-----------------|--|-----------------|
| Lijek                       | Broj ispitanika | Lijek  | Broj ispitanika |
| Flukonazol                  | 1               | Promazin natrij  | 1               |
| Aciklovir                   | 1               | Cefuroksim   | 1               |
| Hidrokortizon               | 1               | Prednizon  | 1               |
| Trimetoprim sulfametoksazol | 1               | Valproična kiselina  | 2               |
| Radioterapija               | 1               | Fenobarbiton, nitrazepam, pantoprazol, vitamin D3, laktuloza, vigabatrim | 1               |
| Ranitidin                   | 7               | Ranitidin  | 3               |
| Ukupno                      | 12              | Ukupno   | 9               |

**Tablica 2 : Lijekovi koje su ispitanici primali u vrijeme uzimanja uzoraka**

## 5.2 REZULTATI ZA ENZIME OKSIDACIJSKOG STRESA I MDA

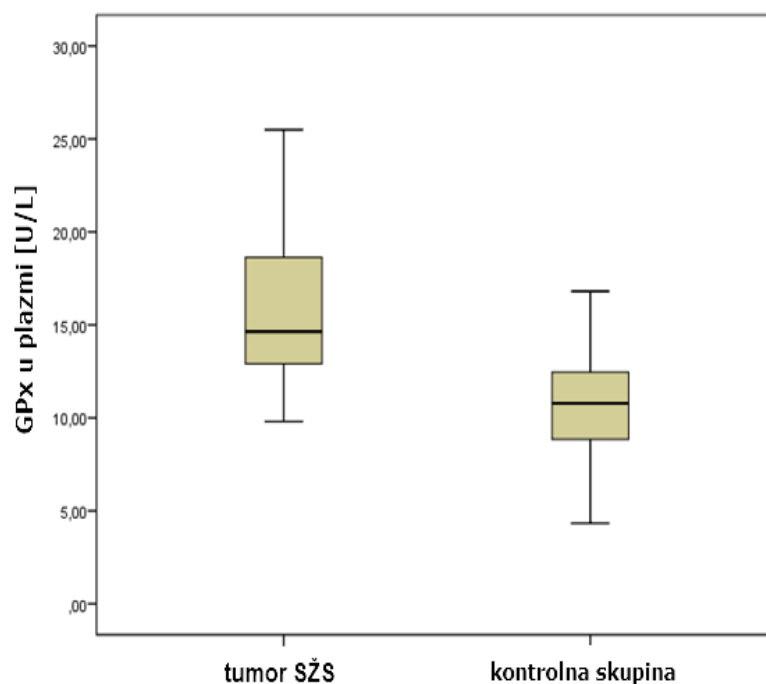
Kako bi se ustanovilo jesu li enzimi oksidacijskog stresa valjani biomarkeri za solidne tumore SŽS u djece odredili smo GPx, CAT i SOD te MDA kao marker oksidacijskog stresa u plazmi i likvoru u skupini djece koja boluju od solidnog tumora SŽS i u skupini zdrave djece koja nikada nisu imala tumorsku bolest. Rezultate obiju skupina smo međusobno usporedili (Tablica 3).

|              | Plazma                  |                          | P      | Likvor                 |                        | P      |
|--------------|-------------------------|--------------------------|--------|------------------------|------------------------|--------|
|              | Median                  |                          |        | Median                 |                        |        |
|              | Glavna grupa            | Kontrolna grupa          |        | Glavna grupa           | Kontrolna grupa        |        |
| GPx (U/L)    | 14,63<br>(12,91-18,63)  | 10,78<br>(8,85-12,46)    | <0,001 | 1,94<br>(1,44-2,74)    | 0,60<br>(0,27-1,09)    | <0,001 |
| CAT (U/ml)   | 36,26<br>(28,41-40,95)  | 25,50<br>(20,68-35,84)   | 0,02   | 4,95<br>(3,00-6,27)    | 1,25<br>(0,74-2,61)    | <0,001 |
| SOD (U/L)    | 504,93<br>(407,1-674,7) | 558,2<br>(434,41-659,36) | 0,85   | 102,06<br>(7,18-132,8) | 20,32<br>(14,75-27,02) | <0,001 |
| MDA (μmol/L) | 0,715<br>(0,521-0,946)  | 0,229<br>(0,148-0,401)   | <0,001 | 0,041<br>(0,030-0,048) | 0,026<br>(0,021-0,030) | <0,001 |

**Tablica 3 : Rezultati istraživanja: GPx, CAT, SOD i MDA u plazmi i likvoru djece sa solidnim tumorom središnjeg živčanog sustava**

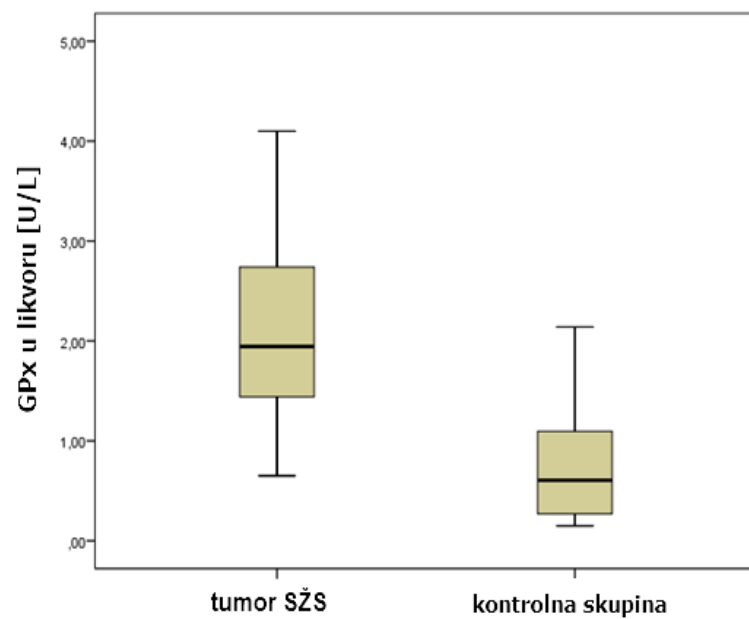
### 5.2.1 Rezultati za GPx u plazmi i likvoru

Aktivnost GPx u plazmi i likvoru je bila puno viša u grupi ispitanika sa solidnim tumorom SŽS nego li u kontrolnoj grupi ( $P < 0,001$ ). Srednja vrijednost za GPx za glavnu skupinu djece u punoj krvi je 14,63 U/L (IQR:12,91-18,63) i u kontrolnoj skupini 10,78 U/L (IQR:8,85-12,46) (Slika 8). U likvoru, za GPx srednja vrijednost za glavnu skupinu ispitanika je bila 1,94 U/L (IQR:1,44-2,74), a u kontrolnoj skupini ispitanika 0,60 U/L (IQR:0,27-1,09) (Slika 9).



**Slika 8 : GPx u plazmi [U/L] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece**

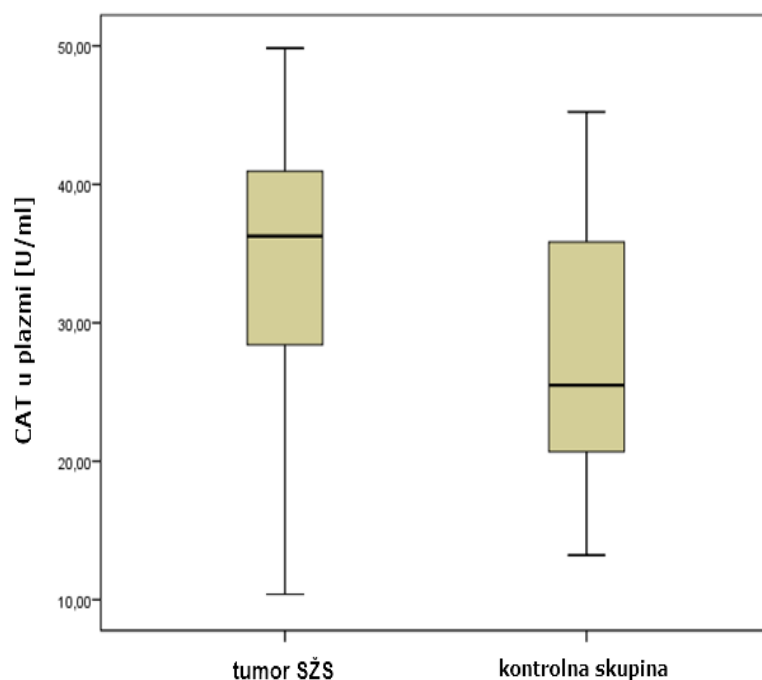




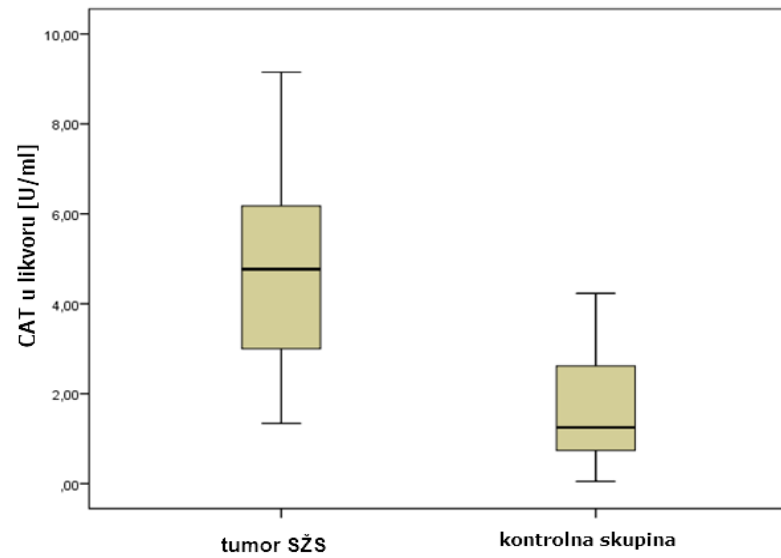
**Slika 9 : GPx u likvoru [U/L] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece**

## 5.2.2 Rezultati za CAT u krvi u plazmi i likvoru

Aktivnost CAT je bila viša i u plazmi i u likvoru u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS. U plazmi, srednja vrijednost za CAT za glavnu skupinu ispitanika bila je 36,26 U/ml (IQR 28,41-40,95) i u kontrolnoj skupini 25,50 U/ml (IQR: 20,68-35,48) ( $p=0,018$ ) (Slika 10). CAT aktivnost je još viša u likvoru u skupini djece sa solidnim tumorom SŽSa. Srednja vrijednost je 4,95 U/ml (IQR:3,00-6,27). U kontrolnoj skupini izmjereno je za srednju vrijednost 1,25 U/ml (IQR: 0,74-2,61) ( $p<0,001$ ) (Slika 11.)



**Slika 10 : CAT u plazmi [U/ml] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece**

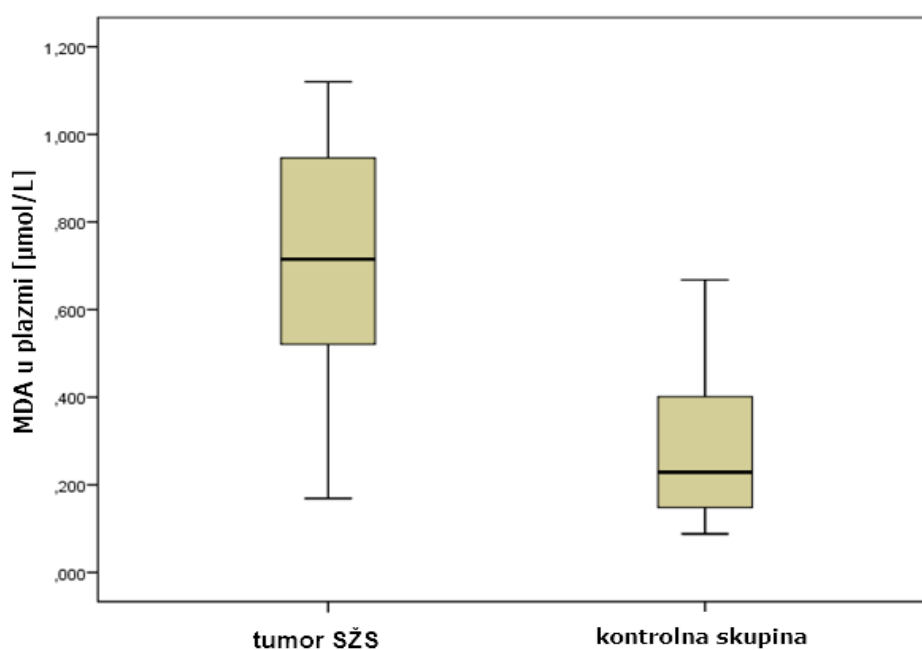


**Slika 11 : CAT u likvoru [U/ml] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece**

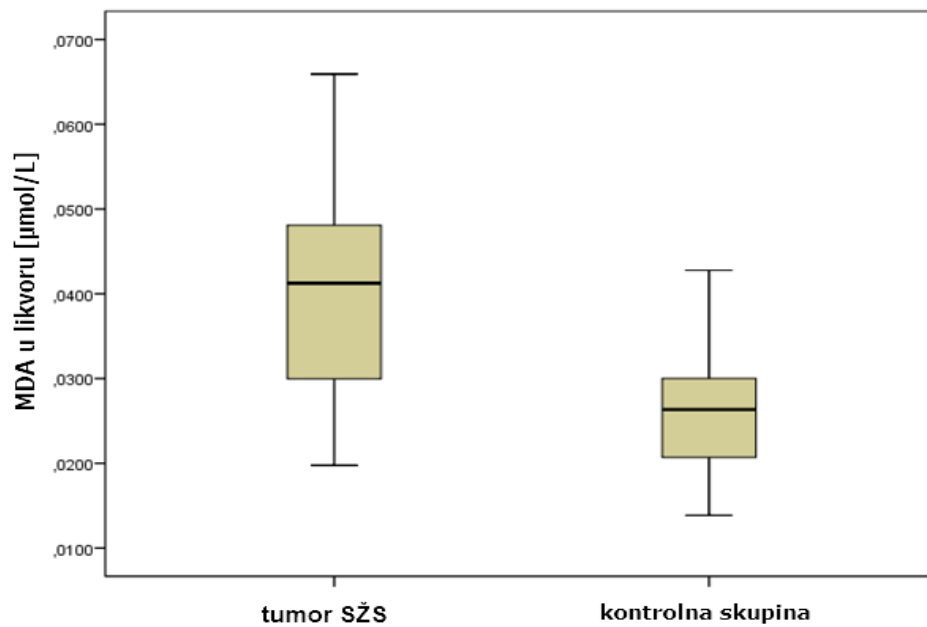
### 5.2.3 Rezultati za MDA u plazmi i likvoru

MDA u plazmi je bila više vrijednosti u glavnoj skupini ispitanika ( $p < 0,001$ ) sa srednjom vrijednosti  $0,715 \mu\text{mol/L}$  (IQR:  $0,521-0,946$ ). U kontrolnoj skupini vrijednost je bila  $0,229 \mu\text{mol/L}$  (IQR:  $0,148-0,401$ ) (Slika 12).

U likvoru srednja vrijednost za MDA je bila  $0,041 \mu\text{mol/L}$  (IQR:  $0,030-0,048$ ) a u kontrolnoj skupini  $0,026 \mu\text{mol/L}$  (IQR:  $0,021-0,030$ ) ( $p < 0,001$ ) (Slika 13).



Slika 12 : MDA u plazmi [ $\mu\text{mol/L}$ ] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece

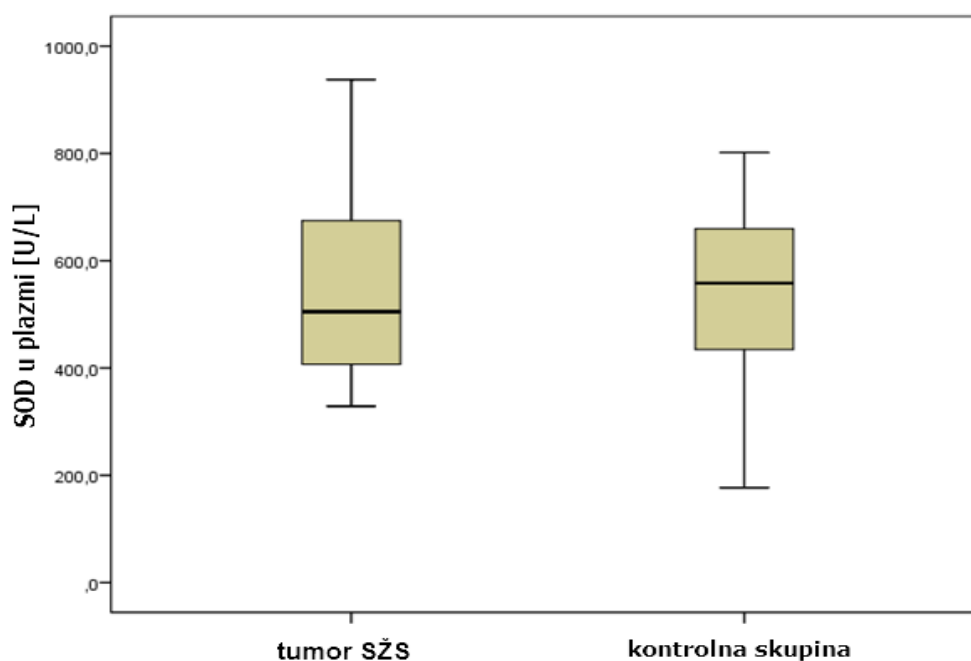


**Slika 13 : MDA u likvoru [ $\mu\text{mol/L}$ ] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece**

#### 5.2.4 Rezultati za SOD u krvi u plazmi i likvoru

SOD je pokazala niže vrijednosti u plazmi u skupini djece sa solidnim tumorom, ali njena vrijednost u likvoru je mnogo viša u toj skupini djece nego li u kontrolnoj. Srednja vrijednost za SOD u plazmi u skupini sa solidnim tumorom SŽS je 504,93 U/L (IQR:407,14-674,70) i u kontrolnoj skupini 558,2 U/L (IQR: 434,41- 659,36) (P=0,851) (Slika 14).

U likvoru SOD aktivnost je bila 102,06 U/L (IQR:70,18-132,8) u skupini s tumorom i u kontrolnoj skupini 20,32 U/L (IQR 14,75-27,02) (P<0,001) (Slika 15).



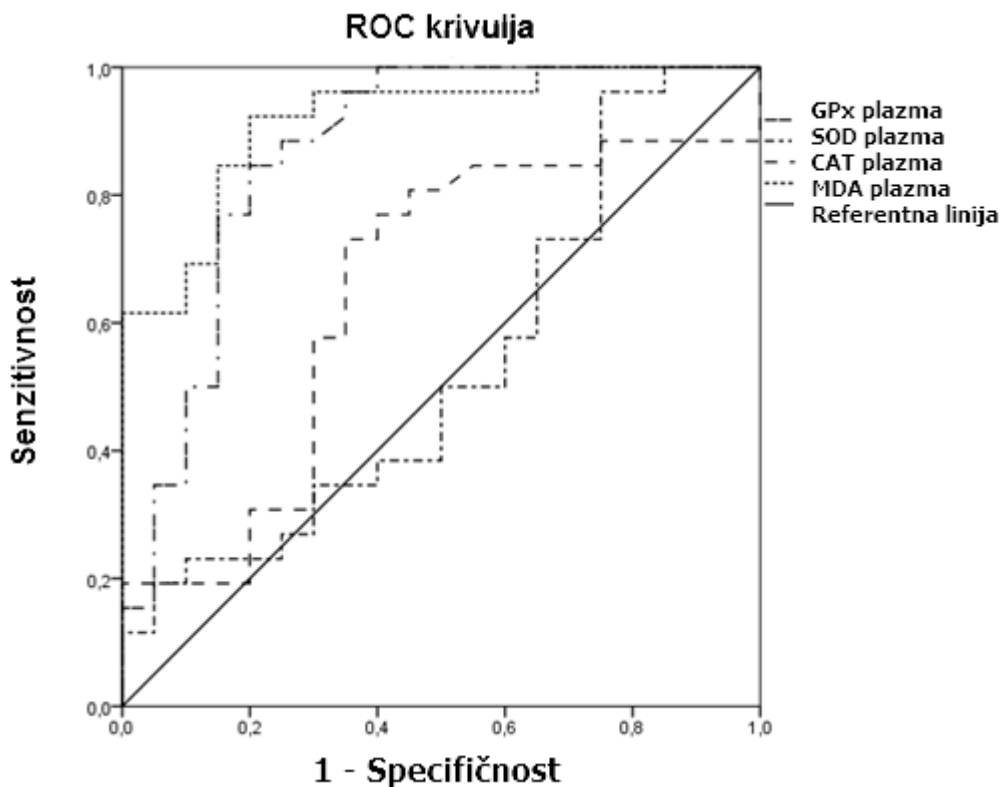
Slika 14 : SOD u plazmi [U/L] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece



**Slika 15 : SOD u likvoru [U/L] u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS i u kontrolnoj skupini djece**

Analizom ROC krivulje testirani su GPx, CAT, SOD i MDA kako bi se utvrdilo jesu li pogodne varijable za prepoznavanje prisutnosti tumora u središnjem živčanom sustavu.

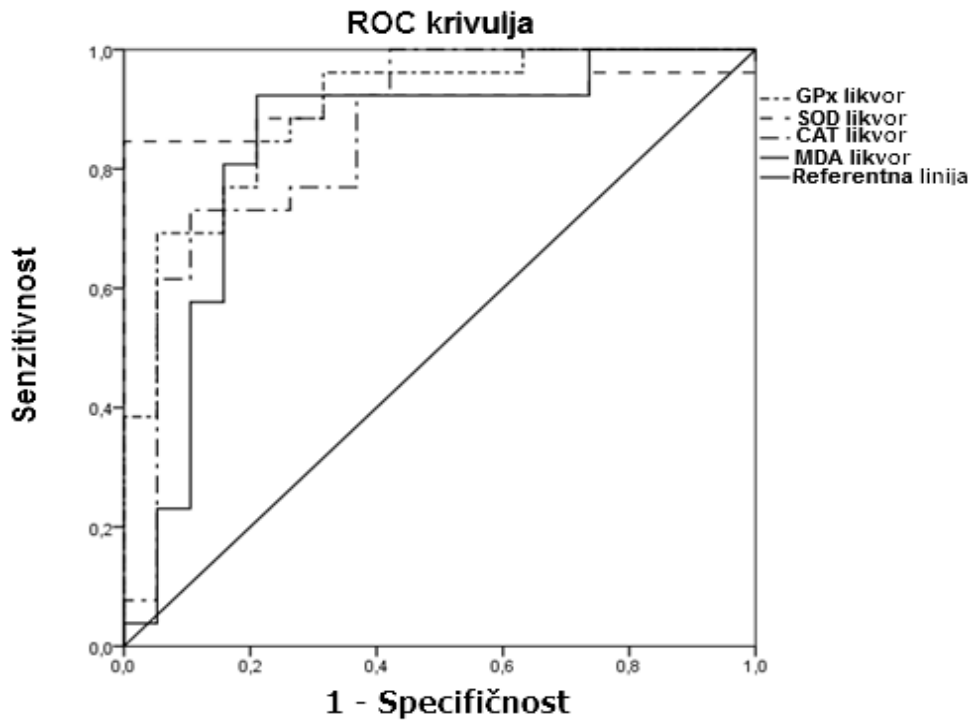
Rezultati analize ROC krivulje za GPx u plazmi pokazuje senzitivnost od 78,57% i specifičnost 75,00%, graničnu (cut off) vrijednost >12,6 U/L. Djeca sa višom vrijednošću imaju i veću vjerojatnost za solidni tumor u SŽS. Ona sa nižom vrijednosti, nemaju. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,85 (Slika 16).



**Slika 16 : Receiver operating characteristic (ROC) krivulja za prediktivnu ocjenu prisutnosti solidnog tumora u središnjem živčanom sustavu u djece na osnovi vrijednosti SOD, CAT, GPx i MDA u plazmi**

Rezultati analize ROC krivulje za GPx u likvoru pokazuje senzitivnost od 89,29% i specifičnost od 82,14%, te graničnu (cut off) vrijednost  $>1,18$  U/L. Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost za tumor SŽS dok ona sa nižom vrijednosti nemaju. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,93 (Slika 17).





**Slika 17 : Receiver operating characteristic (ROC) krivulje za prediktivnu ocjenu prisutnosti solidnog tumora SŽS u djece na osnovi SOD, CAT, GPx i MDA aktivnosti u likvoru**

Rezultati analize ROC krivulje za CAT u plazmi pokazuju senzitivnost od 75,00% i specifičnost 61,54%, graničnu vrijednost  $> 28,40$  U/ml. Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost za tumor SŽS nego djeca s nižom vrijednosti. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,69 (Slika 16).

Rezultati analize ROC krivulje za CAT u likvoru pokazuju senzitivnost od 75,00%, specifičnost 88,89%, graničnu vrijednost  $> 3,1$  U/ml. Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost da imaju tumor u SŽS. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,90 (Slika 17).

Rezultati analize ROC krivulje za MDA u plazmi pokazuju senzitivnost od 80,00% i specifičnost 85,19%, graničnu vrijednost  $> 0,515$   $\mu\text{mol/L}$ . Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost za tumor SŽS nego djeca s nižom vrijednosti. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,89 (Slika 16).

Rezultati analize ROC krivulje za MDA u likvoru pokazuju senzitivnost od

70,00%, specifičnost 78,57%, graničnu vrijednost >0,031  $\mu\text{mol/L}$ . Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost da imaju tumor u SŽS. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,78 (Slika 17).

Rezultati analize ROC krivulje za SOD u plazmi pokazuju senzitivnost od 84,62% i specifičnost 28,00%, graničnu vrijednost > 380 U/L. Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost za tumor SŽS nego djeca s nižom vrijednosti. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,51 (Slika 16).

Rezultati analize ROC krivulje za SOD u likvoru pokazuju senzitivnost od 82,76%, specifičnost 100,00%, graničnu vrijednost > 53 U/L. Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost da imaju tumor u SŽS. Prostor ispod krivulje (AUC) je 0,91 (Slika 17).

Najvišu pozitivnu prediktivnu vrijednost u plazmi ima MDA 85,71, najnižu SOD 55,00 (Tablica 4). U likvoru je upravo obratan nalaz. Najvišu vrijednost ima SOD 100,00, najnižu MDA 77,78 (Tablica 4).

|            | <b>Cut-off vrijednost</b>   | <b>Senzitivnost (%)</b> | <b>Specifičnost (%)</b> | <b>PPV</b> | <b>NPV</b> | <b>AUC</b> |
|------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|
| <b>GPx</b> | 12,6 (U/L)                  | 78,57                   | 75                      | 78,57      | 75         | 0,85       |
| <b>CAT</b> | 28.40 (U/ml)                | 75                      | 61,54                   | 67,74      | 69,57      | 0,69       |
| <b>SOD</b> | 380 (U/L)                   | 84,62                   | 28                      | 55         | 63,64      | 0,51       |
| <b>MDA</b> | 0.515 ( $\mu\text{mol/L}$ ) | 80                      | 85,19                   | 85,71      | 79,31      | 0,89       |

**Tablica 4 : Vrijednosti granične vrijednosti (cut-off varijable), senzitivnosti, specifičnosti, PPV, NPV i AUC za GPx, CAT, SOD i MDA u plazmi ispitanika s tumorom mozga**

|            | <b>Granična vrijednost</b> | <b>Senzitivnost (%)</b> | <b>Specifičnost (%)</b> | <b>PPV</b> | <b>NPV</b> | <b>AUC</b> |
|------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|
| <b>GPx</b> | 1,18<br>(U/L)              | 89,29                   | 82,14                   | 83,33      | 88,46      | 0,93       |
| <b>CAT</b> | 3,1<br>(U/ml)              | 75                      | 88,89                   | 87,5       | 77,42      | 0,9        |
| <b>SOD</b> | 53,00<br>(U/L)             | 82,76                   | 100                     | 100        | 83,87      | 0,91       |
| <b>MDA</b> | 0,031<br>( $\mu$ mol/L)    | 70                      | 78,57                   | 77,78      | 70,97      | 0,78       |

**Tablica 5 : Vrijednosti granične vrijednosti (cut-off varijable), senzitivnosti, specifičnosti, PPV, NPV i AUC za GPx, CAT, SOD i MDA za GPx, CAT, SOD i MDA u likvoru ispitanika s tumorom mozga**

## 6. RASPRAVA

Tumori mozga su najčešći uzrok smrti zbog solidnog tumora u djece.

Iako su moderne dijagnostičke metode tumora unaprijeđene, dijagnoza tumora mozga u ranoj fazi još uvijek predstavlja problem. Russel i suradnici proveli su istraživanje na PubMedu s ciljem da se dobije uvid u studije koje izvještavaju o biomarkerima u tjelesnim tekućinama djece koja boluju od tumora mozga. Ustanovili su 19 biomarkera od kojih je 12 izolirano iz likvora, dva iz seruma, 3 iz urina i 2 iz ostalih tjelesnih tekućina. Sve studije osim jedne izvještavaju o statistički značajnim razlikama koje govore u prilog njihovim biomarkerima (138).

Cilj istraživanja je bio pronaći lako dostupan biomarker za solidne tumore SŽS u djece za koji bi postupak dobivanja bio što manje invazivan. Istraživanje je provedeno kako bi se u tom smislu analizirala aktivnost PChE, GPx, CAT i SOD u plazmi djece sa solidnim tumorom SŽS. Odredili smo i MDA kao pokazatelja oksidacijskog stresa. Prikupljanje uzoraka tkiva iz SŽS je uglavnom nedostupno tako da smo se odlučili za likvor koji je u direktnom kontaktu sa moždanim strukturama koje oplakuje. Do danas je u likvoru otkriveno 528 proteina iz tumora od kojih su mnogi ispitivani kao mogući biomarkeri (3,139).

## 6.1 PSEUDOKOLINESTERAZA KAO BIOMARKER SOLIDNIH TUMORA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA U DJECE

Pseudokolinesteraza je enzim koji je uključen u rast i razvoj (140,141). Iako kolinesteraze nisu homologne onkogenima njihove alterirane aktivnosti su pronađene u tkivu malignih glioma te u serumu bolesnika s različitim karcinomima (142, 143). Upravo njena niska aktivnost u SŽS kao i izvještaji o njenoj ulozi u nastanku tumora te relativno jednostavna laboratorijska dijagnostika bili su odlučujući faktori za odabir i ispitivanje PChE u smislu biomarkera u ovom istraživanju.

PChE je do sada više puta preporučena za biomarker za različite tumore (22). Vlasta Bradamante i suradnici su proveli istraživanje 2000.god. kojim ukazuju na normalnu aktivnost PChE u serumu bolesnika s ranim stadijem karcinoma uterusa, za razliku od uznapredovalog stadija kada je njena aktivnost snižena (144). PChE se kao biomarker može tako upotrijebiti i u smislu praćenja uznapredovalosti tumorske bolesti.

U ovoj studiji ispitanici su se razlikovali prema dobi, a poznato je i da je aktivnost PChE različita u različitim dobnim skupinama (18). Glede dobi ispitanika, očekivali smo višu PChE aktivnost u kontrolnoj skupini, obzirom na mlađu životnu dob (18). No, aktivnost PChE je bila signifikantno veća u glavnoj skupini. U toj grupi ispitanika korelacija između PChE aktivnosti u likvoru i serumu je bila pozitivna; s time da su starija djeca imala višu PChE aktivnost i u serumu i u likvoru. Ovi podaci još više podupiru pretpostavku da je aktivnost PChE povišena u prisutnosti solidnog tumora. Ispitanici obje skupine su primali lijekove koji su mogli imati utjecaj na aktivnost PChE. Antiepileptički lijekovi ili sedativi su induktori aktivnosti AChE i PChE u serumu (145,146), dok ranitidin i hidrokortizon snižuju aktivnost PChE (147,148). Njihov utjecaj više smanjuje razlike između grupa ispitanika nego li ih pojačava, kako smo očekivali. PChE aktivnost u likvoru i serumu je bila viša u glavnoj skupini, a možda bi bila i viša da bolesnici nije bilo utjecaja hidrokortizona i ranitidina. U kontrolnoj skupini, aktivnost PChE bi vjerojatno bila i niža da nisu uzimali antiepileptičke lijekove.

Zbog malog broja ispitanika u studiju smo uključili djecu s različitim vrstama solidnih tumora SŽS. Aktivnost PChE je bila viša i u likvoru i u serumu te djece nego li u kontrolnoj skupini.

U glavnoj skupini ispitanika dobivena je pozitivna korelacija između PChE u serumu i omjera PChE likvor/serum ( $P = 0.001$ ). U kontrolnoj skupini ta je korelacija isto tako pozitivna, ali nesignifikantno ( $P = 0.167$ ). Varijabilnost aktivnosti PChE u likvoru je bila veća u djece s tumorima. Smatramo da je to rezultat razlike između pojedinih vrsta tumora, posebno se to odnosi na skupinu glioma. Cavanagh i suradnici su prikazali da tkivo glioma sadrži visoke vrijednosti PChE (10). U našoj studiji bolesnici s gliomima su imali najviše vrijednosti PChE. Kim i suradnici su 2006.god. opisali kromosomske abnormalnosti u glioblastomima multiforme i staničnim linijama glioma i između ostalih česte su amplifikacije na 3q26.2-29, što odgovara kromosomu za PChE (149). U glavnoj skupini ispitanika od devetero djece iz skupine s gliomima dvoje djece je imalo glioblastom. Glioblastom multiforme (GBM) je najmaligniji tip glioma. Unatoč novim terapijskim metodama, prognoza liječenja je loša sa srednjom vrijednosti post terapijskog preživljavanja od manje od jedne godine. Moderna molekularna genetika ukazuje na činjenicu da su abnormalne alteracije tumor supresorskih gena i okogena glavni razlog za inicijaciju i rast ovog tumora, posebno na 14 kromosomu (150).

Kako bi se isključio bilo kakav fiziološki ili patološki utjecaj od strane ispitanika, za studiju je osmišljen i izračunat omjer PChE likvor/serum. On je signifikantno viši u glavnoj skupini. Posebno treba naglasiti da je u toj skupini njegova vrijednost najizraženija kod glioma (Slika 6). Zato ove razlike potiču na slijedeća istraživanja solidnih tumora posebno glioma.

U odnosu na naše ispitivane varijable, omjer PChE likvor/serum pokazuje u smislu biomarkera najbolje rezultate.

U zaključku, ova studija pokazuje da aktivnost PChE u likvoru izražena kao omjer PChE CSF/serum se može upotrijebiti za rano otkrivanje solidnih tumora SŽS u djece.

## **6.2 ENZIMI OKSIDACIJSKOG STRESA KAO BIOMARKERI SOLIDNIH TUMORA SŽS U DJECE**

Tumorogeneza mozga je često povezana s oksidacijskim stresom koji trigerira lipidnu peroksidaciju staničnih membrana, oksidaciju bjelančevina i DNA. To dovodi do promjena strukture kromosoma, genetskih mutacija i modulacija staničnog rasta. Razvoj moždanih tumora uključuje ne samo oksidacijsku agresiju već isto tako i odgovor na nju u smislu antioksidacijske bolesti. Za vrijeme prolongiranog oksidacijskog stresa, dolazi do promjene aktivnosti antioksidacijskih enzima u mozgu uključujući i SOD, GPx, CAT i GTS. Ove enzime koji u normalnim uvjetima djeluju tako da sprečavaju ili umanjuju oštećenja nastala djelovanjem prekomjerne količine slobodnih radikala, kontroliraju polimorfni geni koje mogu izmijeniti slobodni radikali. Iz tog razloga su upotrijebljeni kao biomarkeri za tumore mozga u djece u ovom istraživanju koje se razlikuje od ostalih iz više razloga. Najprije, prema dobi ispitanika. Antioksidacijske enzime u likvoru smo odredili kao biomarkere isključivo u dječjoj dobi. Zatim prema odabiru uzorka koji smo koristili za ispitivanje, a to je likvor. Ostale studije najčešće su koristile tkivo tumora i serum u odraslih ispitanika. Kawakami i suradnici prikazali su svoje rezultate za likvor u djece s konvulzivnim bolestima i aseptičkim meningitisom (151).

Prikupljali smo dvije vrste uzoraka, krv i likvor, zato što su to uzorci koje je najlakše dobiti najmanje invazivnim metodama u bolesnika koji boluju od tumora mozga koje je obzirom na lokaciju na specifično nedostupnm mjestu. Uzorci su odraz miljea cijelog tijela i stoga smo pretpostavili da će dati izvrsne pokazatelje koji će biti informativni.

## 6.2.1 Lijekovi

U analizi lijekova koje su ispitanici primali u vrijeme provođenja studije, u glavnoj skupini sedmero djece je primalo ranitidin, a po jedno dijete jedan od slijedeće navedenih lijekova: hidrokortizon, aciklovir, flukonazol, trimetoprim sulfometoksazol i radioterapiju.

Antibiotici induciraju promjene u metabolizmu koji dovode do formacije ROS koji igraju ulogu u smrti stanica koje induciraju SOS kao odgovor (152), ali one mogu generirati ROS jedino u lozama koje su osjetljive na ove antibiotike (153). U našoj glavnoj skupini ispitanika, djeca su dobivala antibiotike s ciljem profilakse, tako da je naša pretpostavka da antibiotici nemaju utjecaj na dobivene rezultate.

Jedno dijete je primalo radioterapiju. Ona može izazvati usputne efekte koje možemo definirati kao biološke efekte koji nastaju nakon zračenja stanica čije jezgre nisu direktno ozračene tj. nisu bile cilj radioterapije (154).

Jedno dijete je primalo hidrokortizon. Metilprednizolon inhibira lipidnu peroksidaciju neurona, glije i krvožilnih membrana kao posljedicu slobodnih radikala kisika, ali u visokim dozama (155). Naš ispitanik je primao supstitucijsku dozu.

Za rezultate koje smo dobili ovi podaci nisu bili statistički značajni.

U kontrolnoj skupini ispitanika četvero djece je primalo antiepileptike. Novija izvješća ukazuju na povezanost mitohondrijskog stresa i epilepsije (156). Antiepileptici sprečavaju epileptogena izbijanja koja dovode do oksidacijskog stresa tako da je na taj način eliminiran njihov utjecaj na naše rezultate.

Podaci našeg ispitivanja pokazuju da antioksidansi GPx i CAT i produkt lipidne peroksidacije MDA imaju više vrijednosti i u likvoru i u krvi djece koja boluju od solidnog tumora SŽS od onih koja su zdrava. SOD kao antioksidans pokazuje niže vrijednosti u plazmi, ali visoke u likvoru.



## 6.2.2 Malondialdehid

Po prvi puta je 1972. godine ukazano na karcinogenost MDA nakon što je lokalno apliciran na miša (157). To je bio neobičan rezultat budući je tumor nastao u vrlo kratkom vremenu i nije bio jedan od tumora koji najčešće, uobičajeno, nastaju na mišjoj koži. MDA je mutagen i karcinogen (158). Njegovo mjerenje je popularna metoda za kvantitativno određivanje oštećenja nastalih zbog djelovanja slobodnih radikala in vivo.

U našoj studiji, MDA pokazuje u plazmi i likvoru više vrijednosti u glavnoj skupini ispitanika ( $P=0,001$ ). Drury i suradnici su ispitivali odnos između MDA u plazmi i urinu u nedonošene djece i potvrdili su pozitivnu korelaciju „bolesti nedonošenosti“ (retinopatija, nekrotizirajući enterokolitis, intraventrikularno krvarenje) koje nastaju u patofiziološkim uvjetima oksidacije i reoksigenacije u vrijeme prijevremenog poroda (159). U tumorskoj bolesti nastaje lipidna peroksidacija, a intracerebralni milje je zahvaljujući svojoj histologiji zapravo idealna lokalizacija (160). MDA reagira s nukleinskim bazama kako bi im se višestruko pripojio, a njihovi produkti reagiraju s DNK (161). Rezultati ove studije potvrdili su pozitivnu korelaciju između MDA u likvoru i plazmi u stanjima tumorske bolesti SŽS.

## 6.2.3 Glutation peroksidaza

GPx vrijednosti u plazmi i likvoru koje smo dobili su u glavnoj skupini ispitanika više od onih koje smo dobili u kontrolnoj skupini,  $p<0.001$  (Slika 1). Tanriverdi i suradnici su mjerili nivo GPx u tkivu tumora bolesnika s glioblastomom multiforme i tranzicionalnim meningeomom. U tkivu tih tumora aktivnost GPx je bila značajno niža u usporedbi s normalnim tkivom mozga (162). Aggarwal također pokazuje proporcionalno sniženu aktivnost GPx i SOD u odnosu na povećani stupanj maligniteta tumora mozga (163).

Zašto se rezultati ove studije razlikuju od navedenih? Njene postavke upućuju na mogući odgovor. Do sada objavljene studije nisu proučavale iste uzorke tako da su teško usporedive. Određena je aktivnost enzima u likvoru, ostale studije u tkivu tumora. Svi ispitanici su prema dobi djeca i time puno uniformnija skupina nego li su to ispitanici ostalih studija oksidacijskog stresa u tumora mozga. Svi bolesnici su bili na početku dijagnostike svoje tumorske bolesti s manjim utjecajem primarne patologije i sekundarnih učinaka terapije.

ROS sudjeluje u procesu mitohondrijskog starenja, gubitak antioksidansa smanjuje životni vijek i obratno (164).

GPx može djelovati i štetno i protektivno. Njegovi protektivni učinci su u smislu uklanjanja viška ROS-a i na taj način se smanjuje mogućnost DNA mutagenoze. U tumorskoj bolesti postoji višak ROS-a tako da se očekuju i povišene vrijednosti GPx. U svom štetnom djelovanju uklanjanje ROS-a može izazvati reduktivni stres koji karakterizira gubitak normalnih patofizioloških odgovora: smanjenje GF regulirane signalizacije i stanične proliferacije, povećanje apoptoze. Posljedice suviška GPx treba uzeti u obzir u svakoj terapijskoj shemi. Najuspješnije strategije bile bi one koje usmjeravaju prekomjernu ekspresiju GPx na modulaciju suviška OS povezanog sa patološkim zbivanjima u pojedinoj bolesti (73).

Identifikacija GPx polimorfizma upućuje na učešće GPx varijanti na etiologiju glioma (165,166).

Joshi i suradnici prikazali su povišene vrijednosti GPx, GST i GR u tkivu tumora mozga miša koji je liječen adriamicinom. Između ostalog, izvještavaju o tome da adriamicin izaziva oksidacijski stres u mozgu (167). Sve osim jedne stanične linije stanica tumora glioblastoma multiforme pokazuju deficit aktivnosti i ekspresije GPx. Astrociti, mikroglia/makrofagi i stanične linije glioma pokazuju aktivnost GPx1 (168). Pretpostavljam da rezultati ove studije pokazuju povišene vrijednosti GPx iz istog razloga. U tumoru koji raste, pretpostavljam da je povišena aktivnost u smislu OS. GPx reducira H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ostale perokside.

Utjecaj okoline se može povezati s tumorima mozga. U bolesnika s meningeomom i glioblastomom nakon izlaganju olovu GPx1 postaje manje osjetljiva na stimulaciju i može pospješiti razvoj karcinoma (169,170). Za ovu skupinu ispitanika nismo mogli dobiti jasne podatke o izloženosti djelovanju olova. Od rođenja sva djeca žive samo u Hrvatskoj kratko vrijeme nakon rata koji je sigurno doveo do nekog oblika poremećaja ekvilibrija okoliša. GPx je jedan od selenoproteina koji je najvisniji o nivou selena. Nekoliko studija navode pozitivan učinak dodavanja selena na smanjenje rizika od karcinoma (171).

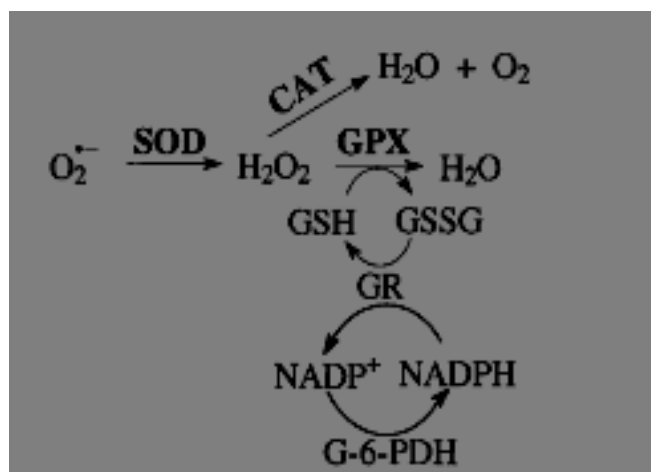
Kao i mnoge studije prije ove, nismo mjerili selen u serumu naših bolesnika. Studija SELECT je pokazala da dodatak selena nije imao utjecaj na prevenciju karcinoma zbog različitih formi selena u smislu vrste namirnice te da isto tako može doprinijeti inhibiciji staničnog rasta i apoptozi štoviše povećati nakupljanje selenovih metabolita što može imati toksični učinak na stanicu (172).

Ovim istraživanjem određena je GPx aktivnost. Postoje podgrupe GPxa: GPx1, GPx2 itd. Deficit nekih od njih se može povezati s razvojem tumora, npr. kolona i tankog crijeva. Ovi tumori se razvijaju jedino u osoba koje imaju deficit oba enzima i GPx1 i GPx2. Deficit samo jednog od njih ne izaziva karcinom (173).

Gen za GPx1 u ljudi je lokaliziran na regiji kromosoma 3p21 koja je povezana sa gubitkom heterozigotnosti (loss of heterozygosity – LOH) procesom koji uključuje deleciju jednog do dva autosoma kromosomske regije što dovodi do detekcije samo jedne varijante alela u osoba koje su u svim ostalim tkivima heterozigotni. Sudjelovanje GPx u LOH procesima se povezuje s karcinomom pluća, dojke, glave, vrata i kolona (174). Polimorfizam gena za GPx je povezan s razvojem karcinoma pluća, dojke, ovarija itd, ali do sada nije bio predmet istraživanja za tumore mozga (175).

Prekomjerna ekspresija GPx1 štiti stanicu od oksidacijskog oštećenja (176,177,178).

Aerobni organizmi generiraju toksični ROS za vrijeme oksidacijskog metabolizma ili pod patološkim uvjetima. Organizmi imaju antioksidacijski sustav obrane predominantno enzimatski antioksidacijski put.



**Slika 18 : Antioksidacijski enzimatski sistem. SOD konvertira superoksidni radikal u  $H_2O_2$ . CAT i GPx konvertiraju  $H_2O_2$  u vodu. Na ovom putu dva toksična spoja se konvertiraju u bezopasnu vodu. GPx zahtijeva dodatne enzime (G-6-PDH, GR = smatraju se sekundarnim antioksidacijskim enzimima zato što direktno ne sudjeluju u ROSu već pomažu djelovanje GPx) i kofaktore (GSH, NADPH, i glukoza 6 fosfat) (178).**

Ovaj put ukazuje na činjenicu da prekomjerna ekspresija SOD bez adekvatnog porasta GPx1 rezultira u akumulaciji  $H_2O_2$  što mijenja redoks status i participira u Fentonovoj reakciji vodeći do produkcije hidroksilnih radikala. U studiji Shijun Li i suradnika 2000, postavljena je hipoteza da prekomjerna ekspresija MnSOD u stanicama humanog glioma rezultira nakupljanjem  $H_2O_2$  i ostalih hidroperoksida uzrokujući smanjenja rasta stanica glioma. Transfekcija tih stanica sa ljudskim GPx1 genom sprječava supresivno djelovanje MnSODa (179). Ta pretpostavka podupire naš nalaz povišene vrijednosti i SOD i GPx u likvoru ispitanika sa solidnim tumorima, posebno gliomima. Glavna skupina ispitanika uključuje tridesetero djece. Njih devet boluje od glioma.

## 6.2.4 Katalaza

Aktivnost katalaze je pokazala visoku vrijednost u plazmi ( $P=0,018$ ) i likvoru ( $P<0,001$ ) u glavnoj skupini ispitanika.

Rao i suradnici izvještavaju o nižim vrijednostima katalaze u eritrocitima osoba s tumorima mozga (110). Ukazuju na promjene aktivnosti enzima u odnosu na terapiju i redukciju tumora. Glede njene vrijednosti postoji jaka povezanost između katalitičkih (kataliziraju dekompoziciju  $H_2O_2$ ) i peroksidacijskih djelovanja (oksidacija H donora) katalaze (180). Referentna vrijednost  $2869 \pm 103$  U/gHb je viša nego li je vrijednost koju je objavio Pastor 1998. god. u Španjolskoj  $1843 \pm 250$  U/gHb (181). U njegovoj studiji dobi spol nemaju utjecaj na aktivnost katalaze. No, 1997. godine King izvještava o proporcionalnom porastu aktivnosti katalaze s dobi (182). Casado 1988. godine ponovno ukazuje na suprotno – na smanjenje aktivnosti katalaze s porastom životne dobi i višoj aktivnosti u zdravih žena nego li u zdravih muškaraca (183).

Sve bolesti u kojima sudjeluje oksidacijski stres bile su praćene smanjenom aktivnošću katalaze (kardiovaskularne bolesti, dijabetes, tumori, infekcije, upale, dermatološke bolesti, anemije, Wilsonova bolest) (184).

Njena aktivnost je dobar biomarker za stanja teškog oksidacijskog stresa i toplinski stres ali ne i za kiselinski stres. Navodi i na moguću prediktivnu ulogu oksidacijskog stresa, njegove silovitosti i snage. Aktivnost katalaze može služiti kao biomarker za stresu prilagođeno ponašanje bakterije, ali je specifična njena prediktivna vrijednost (185).

Wozniak i suradnici su obradili dvadeset četvero bolesnika između koji je devet imalo glioblastom i petnaest astrocitom. Pokazali su statistički značajno povišenu koncentraciju MDA u eritrocitima i plazmi te povišene vrijednosti CAT i SOD u eritrocitima bolesnika koji su imali tumorsku bolest u usporedbi sa zdravom skupinom ispitanika (185).

Katalaza je  $H_2O_2$  ovisan enzim i zanimljiva je kao važan cilj antioksidacijske terapije. Nanotehnološki princip je testiran katalazom s

učitanim nanopartiklima (Nps) s ciljem protekcije ljudskih neurona na oksidacijski stres. Ovi nanopartikelji na katalazi značajno snižuju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induciranu oksidaciju proteina, DNK oštećenja i OS (186). Ta činjenica kao novi terapijski pristup je jedan razlog više da se odredi katalaza u likvoru i plazmi u djece sa solidnim tumorima SŽS.

### 6.2.5 Superoksid dizmutaza

SOD u našem istraživanju je pokazala niže vrijednosti u plazmi glavne skupine ispitanika ( $P = 0,851$ ) nego li u kontrolnoj grupi, ali je zato njena aktivnost puno viša u likvoru ispitanika glavne skupine nego li u kontrolne ( $p < 0.001$ ) (Slika 15).

SOD je enzim koji se intenzivno ispituje kod mnogih tumorskih bolesti.

Aggarwalova studija ukazuje na nisku aktivnost SOD u krvi i u tkivu tumora mozga oboljelih osoba u usporedbi s kontrolnom skupinom (163).

SOD [ EC 1.15.1.1.] aktivnost u različitim bolestima postaje od kliničkog interesa. SOD enzimi koji kataliziraju spontanu dismutaciju radikala superoksida do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su prisutni u svim dijelovima živčanog sustava, uključujući mitohondrijske intermembranozne prostore (SOD1 bakar/cink SOD); mitohondrijski matriks (SOD2 manganska SOD); plazmatska, limfna, sinovijalna SOD (SOD3 ili ekstracelularna SOD) (187). Više puta je izvještavano kako je aktivnost SOD-a u eritrocitima snižena u većini intrakranijalnih neoplazmi (188), što korelira s našim rezultatima. CuZnSOD aktivnost je u mnogim tumorima snižena, ali ne u svim. Obično tumorske stanice pokazuju niže vrijednosti MnSOD aktivnosti. Tendencija CuZnSOD u krvi bolesnika s karcinomom debelog crijeva prije i poslije operativnog zahvata pokazuje porast i pad njene aktivnosti, ali trend nije statistički značajan (189).

Dijelovi stanice koji su posebno osjetljivi na oksidacijsko oštećenje su pogođeni deficitom CuZnSOD i posljedice toga se odražavaju kao poremećaj stanične homeostaze i krajnje, do razvoja

hepatokarcinogeneze u kasnijem životu (187). Topikalna aplikacija SODa reducira postiradijacijsku fibrozu karcinoma dojke (190).

Najčešće upotrebljavana SOD kao biomarker je MnSOD. Postoje mnogi izvještaji o visokim vrijednostima MnSOD u karcinomu štitnjače, tumorima SŽSa, akutnoj leukemiji, oligodendrogliomima a isto tako je snažno povezan sa visoko proširenim, metastatskim karcinomom želuca i kolorektalnim karcinomom (191). MnSOD nivo ekspresije u tkivu tumora je kandidat za prognostičkog markera za bolesnike s glioblastomom (192,193). Ekstracelularna SOD iz seruma može biti dobar marker kandidat za dijagnozu prolaktinoma (194).

Mogućnost promptne dijagnoze tumora mozga u ranoj fazi još je uvijek nedostižna, unatoč svim poboljšanjima dijagnostičkih metoda. To je u suprotnosti s nekim drugim vrstama tumora gdje npr. serumski biomarkeri kao Ca125 olakšavaju ovu fazu bolesti u dijagnostičkom smislu.

Tumorski biomarker bi se trebao jednostavno detektirati i izmjeriti. Faktor koji doprinosi činjenici da kod tumora mozga imamo malo biomarkera je krvno moždana barijera. Upravo iz tog razloga istražuje se likvor u potrazi za biomarkerima kao npr. poliamini kod bolesnika s meduloblastomom (195).

Sve do 2013 godine bilo je poznato 12 biomarkera iz likvora te još 7 u ostalim tjelesnim tekućinama i tkivima. Svi osim jednoga su odijelili bolesnike s tumorom od kontrolne skupine i to sa statistički značajnom razlikom (138).

Naši rezultati pokazuju da antioksidansi čistači GPx, CAT, SOD i lipidni produkt peroksidacije MDA u likvoru pokazuju dobru senzitivnost i specifičnost kao biomarkeri tumora mozga u djece i pružaju granične vrijednosti za svaki determinirani parametar (Tablica 3,4). Dobili smo više vrijednosti aktivnosti naših enzima u uzorcima bolesnika s tumorima mozga. Neki od njih sukladni su rezultatima sličnih studija, neki su u suprotnosti.

Rezultati ove studije pseudokolinesteraze i enzima oksidacijskog stresa u plazmi i likvoru ukazuju na prisutnost solidnog tumora u središnjem živčanom sustavu. Smatram da je glede razlike prema drugim studijama, potrebno individualizirati praćenje dinamike promjena aktivnosti pojedinih varijabli pri svakom bolesniku kako bi se još preciznije dijagnosticirao solidni tumor, pratio njegov rast i odgovor na liječenje.

Omjer PChE likvor/serum se može upotrijebiti za otkrivanje solidnih tumora SŽS u djece, posebno glioma.

GPx , CAT i SOD u likvoru su statistički izvrsni testovi za solidne tumore SŽS u djece.

Slijedeći koraci bili bi usmjereni u multicentrične studije kako bi se statistički još više unaprijedili rezultati (138).



## 7. ZAKLJUČAK

1. Aktivnost pseudokolinesteraze u serumu djece sa solidnim tumorom središnjeg živčanog sustava je viša nego li u zdrave djece, ali neznačajno  $P=0,056$ . PChE u serumu analizom ROC krivulje pokazuje vrijednost AUC od 0,64 što je svrstava u skupinu slabijih testova u smislu biomarkera.
2. Aktivnost pseudokolinesteraze u likvoru djece sa solidnim tumorom središnjeg živčanog sustava je značajno viša nego li u zdrave djece,  $P=0,001$ . Pseudokolinesteraza u likvoru pokazuje vrijednost AUC od 0.65 što je tim rezultatom svrstava u skupinu slabijih testova u smislu biomarkera. Pri tome je granična vrijednost za PChE u likvoru 80 U/L i daje 70% senzitivnost, 70% specifičnost, 70% PPV i 70% NPV. Cutt off vrijednost od 150 U/L daje specifičnost od 100%, senzitivnost 53%, PPV 100% i NPV 68%.
3. Omjer PChE likvor/serum (%) je značajno viši u djece sa solidnim tumorima SŽS  $P=0,001$ . Omjer PChE likvor/serum pokazuje vrijednost AUC od 0,76 što ga svrstava u skupinu osrednjih testova u smislu biomarkera. Za omjer PChE likvor/serum vrijednost za granična vrijednost je bila 1.09%, sa senzitivnosti od 83%, specifičnosti od 53%, PPV 64% i NPV 76%. Granična vrijednost od 2.70% odgovara specifičnosti od 100%, senzitivnosti od 50%, PPV 100% i NPV 67%.
4. Glede vrste tumora, aktivnost pseudokolinesteraze u likvoru i omjer PChE likvor/serum (%) najviši su u djece koja imaju gliome.
5. Aktivnost GPx u plazmi krvi i likvoru je značajno viša u grupi ispitanika sa solidnim tumorom SŽS nego li u zdrave djece

$P < 0,001$ . Rezultati analize ROC krivulje za GPx u likvoru pokazuje senzitivnost od 89,29% i specifičnost od 82,14%, te graničnu vrijednost  $> 1,18$  U/L. Vrijednost AUC je 0,93, što GPx u likvoru svrstava u izvrsne testove u smislu biomarkera. Rezultati analize ROC krivulje za GPx u plazmi pokazuje senzitivnost od 78,57% i specifičnost 75,00%, uz graničnu vrijednost  $> 12,6$  U/L. AUC je 0,85 i u tom smislu je GPx u plazmi dobar test u smislu biomarkera.

6. Aktivnost CAT je viša i u plazmi i u likvoru u skupini djece sa solidnim tumorom u SŽS. U plazmi, neznajno  $P = 0,018$ , u likvoru značajno  $P < 0,001$ . Rezultati analize ROC krivulje za CAT u plazmi pokazuju AUC 0,69. Rezultati analize ROC krivulje za CAT u likvoru pokazuju senzitivnost od 75,00%, specifičnost 88,89%, pri graničnoj vrijednosti  $> 3,1$  U/ml. Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost da imaju tumor u SŽS. Prostor ispod ROC krivulje AUC je 0,90 što vrijedost CAT u likvoru svrstava u izvrsne testove u smislu biomarkera.
7. SOD pokazuje niže vrijednosti u plazmi u skupini djece sa solidnim tumorom u usporedbi sa zdravom djecom. Njena vrijednost u likvoru je mnogo viša u toj skupini djece nego li u kontrolnoj  $P < 0,001$ .
8. Rezultati analize ROC krivulje za SOD u plazmi pokazuju senzitivnost od 84,62% i specifičnost 28,00%, uz graničnu vrijednost  $> 380$  U/L. Prostor ispod krivulje AUC je 0,51, statistički neuspješan test. Rezultati analize ROC krivulje za SOD u likvoru pokazuju senzitivnost od 82,76%, specifičnost 100,00%, uz graničnu vrijednost  $> 53$  U/L. Djeca sa višom vrijednosti imaju veću vjerojatnost da imaju tumor u SŽS. Prostor ispod krivulje AUC je 0,91 što vrijednost SOD u likvoru svrstava u skupinu izvrsnih testova.

9. MDA i u plazmi i u likvoru je bila značajno više vrijednosti u glavnoj skupini ispitanika  $P < 0,001$ . Rezultati analize ROC krivulje za MDA u plazmi pokazuju senzitivnost od 80,00% i specifičnost 85,19%, uz graničnu vrijednost  $> 0,515 \mu\text{mol/L}$ . Prostor ispod krivulje AUC je 0,89 što ga svrstava u skupinu dobrih testova. Rezultati analize ROC krivulje za MDA u likvoru pokazuju senzitivnost od 70,00%, specifičnost 78,57%, graničnu vrijednost  $> 0,031 \mu\text{mol/L}$ . Prostor ispod krivulje AUC je 0,78 što ga statistički čini osrednjim testom.

## 8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Cilj studije je odrediti aktivnost pseudokolinesteraze (PChE) i enzima oksidacijskog stresa superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) u likvoru i krvi djece sa solidnim tumorom središnjeg živčanog sustava (SŽS) kako bi se ustanovilo jesu li aktivnosti PChE, SOD, CAT i GPx valjani biomarkeri za solidne tumore SŽS u djece. Određen je i malondialdehid (MDA) kao jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije.

### Metode

Glavna i kontrolna skupina ispitanika imale su svaka po 30 ispitanika. Djeca glavne skupine imala su solidni tumor SŽS, dok ona iz kontrolne skupine nisu nikada bolovala od tumorske bolesti. Svim ispitanicima uzeti su uzorci krvi i likvora. SOD, GPx i CAT su određeni spektrofotometrijski; MDA aktivnost HPLC metodom, PChE metodom po Ellmanu. PChE aktivnost u likvoru je prikazana kao PChE likvor/serum omjer izražen u postocima. Receiver operating characteristic (ROC) krivulje su korištene kako bi se utvrdilo jesu li PChE, SOD, CAT, GPx aktivnosti valjani biomarkeri za identifikaciju djece sa solidnim tumorom SŽS.

### Rezultati

Djeca sa solidnim tumorom središnjeg živčanog sustava imaju sigifikantno višu aktivnost PChE u likvoru i serumu, kao i PChE likvor/serum omjer ( $P=0.001$ ). PChE likvor/serum omjer u glavnoj skupini je 2.38% (interkvartilni opseg [IQR] 1,14-3,97) i 1,09% (IQR 0,95-1,45) u kontrolnoj skupini. Analiza ROC krivulje PChE likvor/serum omjera pokazala je vrijednost prostora ispod krivulje (AUC) od 0,76 (95% interval pouzdanosti (eng. confidence interval) [CI] 0,63-0,88) i granična vrijednost (eng. cut-

off) od 1,09. Dvadeset pet od 29 bolesnika s visokim omjerom PChE likvor/serum je imalo tumor SŽS i pokazuje senzitivnost od 83% i specifičnost 53%.

SOD, CAT, GPx i MDA u likvoru pokazuju visoku specifičnost i senzitivnost za solidne tumore središnjeg živčanog sustava u djece. Studija pruža granične vrijednosti za svaku od njih. Između antioksidansa, najveću senzitivnost u plazmi pokazuje SOD od 84,62%; najvišu specifičnost GPx od 75%. U likvoru najvišu senzitivnost pokazuje GPx od 89,29%, najvišu specifičnost SOD od 100%. MDA ima senzitivnost od 80,0% u plazmi te 70,0% u likvoru. Njegova specifičnost kao biomarkera iz plazme je 85,19% a za likvor 78,57%. Prostor ispod krivulje (AUC) za SOD u plazmi je 0,51; u likvoru 0,91. Za GPx u plazmi 0,85, u likvoru 0,93; za CAT u plazmi 0,69, u likvoru 0,90; MDA u plazmi 0,89 i likvoru 0,78.

## Zaključak

Omjer PChE likvor/serum i SOD, CAT i GPx likvoru pokazuju opseg AUC od 0,80 do 0,93 što mjeri točnost testa i stavlja ga statistički u skupinu dobrog ili i izvrsnog tako da se mogu upotrijebiti kao biomarkeri sa dobrom senzitivnošću za solidne tumore središnjeg živčanog sustava u djece.

## 9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLISKOM JEZIKU

The aim of the study is to determine the activity of pseudocholinesterase (PChE) in serum and cerebrospinal fluid (CSF) and oxidative stress enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in CSF and blood in children with solid central nervous system (CNS) tumor and to assess whether PChE activity and SOD, CAT and GPx could be a valid biomarker for solid CNS tumors in children. One of the final products of lipid peroxidation is malodialdehyde (MDA) was determined too.

### Methods

The study and control group included 30 children each. Children in the study group had a solid CNS tumor, while those from the control group had never suffered from any tumor diseases. CSF and blood samples were collected from all participants. PChE activity was determined using the Ellman's spectrophotometric method. GPx, SOD and CAT activity were measured spectrophotometrically; MDA with HPLC method. PChE activity in CSF was shown as a cerebrospinal fluid/serum ratio expressed in percentage, ie, PChE CSF/serum ratio. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to assess whether PChE activity, SOD, CAT and GPx can be used as a biomarker for identifying children with solid CNS tumors.

### Results

Children with solid CNS tumor had significantly higher PChE activity in CSF and serum, as well as PChE CSF/serum ratio ( $P= 0.001$ ). PChE CSF/serum ratio in the study group was 2.38% (interquartile range [IQR] 1.14-3.97) and 1.09% (IQR 0.95-1.45) in the control group. ROC curve

analysis of PChE CSF/serum ratio resulted in an area under the curve (AUC) value of 0.76 (95% confidence interval [CI] 0.63-0.88) and a cut-off of 1.09. Twenty five of 29 patients with elevated PChE CSF/serum ratio had a tumor, corresponding to a sensitivity of 83% and a specificity of 53%.

SOD, CAT, GPx and MDA in CSF have high specificity and sensitivity for the solid brain tumors in children and this study provide a cutt of values for the each of them. Between antioxidants highest sensitivity in plasma has SOD 84.62%; highest specificity has GPx 75%. In CSF highest sensitivity showed GPx 89.29%, highest specificity has SOD 100%. MDA sensitivity in brain tumor children in plasma is 80% and in CSF 70%. It's specificity for plasma is 85.19% and in CSF 78.57%. SOD in plasma resulted in AUC 0,51 and in CSF 0,91; GPx in plasma 0,85 in CSF 0,93; CAT in plasma 0,69 and in CSF 0,90; MDA in plasma 0,89 in CSF 0,78.

#### Conclusion

PChE CSF/serum ratio and SOD, CAT and GPx in CSF resulted in AUC from 0,80 to 0,93 and may be used as a biomarkers with good sensitivity and good or excellent tests for solid CNS tumors in children.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Kim SJ, Lim HK, Lee HY. i sur. Dual energy CT in the evaluation of intracerebral hemorrhage of unknown origin: differentiation between tumor bleeding and pure hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:865-72. Medline:22241388 doi:10.3174/ajnr.A2890
2. Gupta N, Banerjee A, Haas-Kogan D. *Pediatric CNS tumors*. 2nd ed. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer; 2010.
3. Mishra A, Verma M. Cancer biomarkers: Are we ready for the prime time? *Cancers* 2010; 2:190-208. doi:10.3390/cancers2010190
4. Waymire JT. Acetylcholine Neurotransmission. Cellular and molecular neurobiology. Neuroscience online. University of Texas Medical School. <http://neuroscience.uth.tmc.edu/index.htm>
5. Bosak A, Katalinić M, Kovarik Z. Kolinesteraze, struktura, uloga, inhibicija. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011;62:175-190.
6. Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, i sur. The cloned butyrylcholinesterase gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics* 1991; 11(2), 452-4.
7. Gaffney D, Campbell RA. A PCR based method to determine the Kalow allele of the cholinesterase gene: the E1k allele frequency and its significance in the normal population . *J Med Genet* 1994;31:248-50.
8. Primo-Parmo SL, Bartels CF, Wiersema B i sur. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BCHE) gene. *Am J Hum Genet* 1996 Jan; 58(1):52-64.
9. Falugi C, Raineri M. Acetylcholinesterase (AChE) and pseudo-cholinesterase (BuChE) activity distribution pattern in early developing chick limbs . *Embryol. exp. Morph.* 1985; 86, 89-108.10.
10. Cavanagh JB, Thompson RH, Webster GR. The localization of pseudo-cholinesterase activity in nervous tissue. *Exp Physiol.* 1954;39:185-97.
11. Burgen ASV, Chipman LM. Cholinesterase and succinic dehydrogenase in the central nervous system of the dog. *J.Physiol.* 1951;114,296-305.



12. Abrahams GB, Koelle GB, Smart P. Histochemical demonstration of cholinesterases in the hypothalamus of the dog. *Physiol.* 1957;139 (1),137-144-2.
13. Koelle GB, Han MS. Effects of glycyl-L-glutamine and methylprednisolone on maintenance of acetylcholinesterase of transected rat sciatic nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;(87),9495-7.
14. Ord MG, Thompson RHS. Pseudochoolinesterase activity in the central nervous system. *Biochem J.* 1952; 51:245-51. Medline:14944581.
15. Tornel PL, Saez Valero J, Vidal CJ. Ricinus communis agglutinin I reacting and nonreacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett.* 1992;145:59-62. Medline:1461569 doi:10.1016/0304-3940(92)90203-J
16. Popović Lj, Mikecin L, Fattorini I, Župančić B, Peklić M. Pseudochoolinesterase activity in children with viral meningitis [in Croatian]. *Pediatr Croat.* 2005;49:311.
17. Kambam JR, Horton B, Parris WC, Hyman S, Lawrence Berman M, Sastry BV. Pseudochoolinesterase activity in human cerebrospinal fluid. *Anesth Analg.* 1989;68:486-8. Medline:2929981 doi:10.1213/00000539-198904000-00011
18. Abdallah B, Udomtecha D. Pseudochoolinesterase activity: determination and interpretation in pediatric anesthesia. *M.E.J. Anesth.* 2007;19:423-8.
19. Soreq H, Lapindot Lifson Y, Zakut H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? *Cancer Cells.* 1991;3:511-6. Medline:1820094
20. Stephenson J, Czepulkowski B, Hirst W, Mufti GJ. Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia

(AML). *Leuk Res.* 1996; 20:235-41. Medline:8637218  
doi:10.1016/0145-2126(95)00146-8

21. Zovko A, Sepcic K, Turk T, Garaventa F, Faimali M, Cheossi E, et al. New aspects of the relationship between acetylcholinesterase activity and cancer I: poly APS experiments. *Wseas Transact Biol Biomed.* 2009;6:58-69.
22. Chougule A, Hussain S, Agarwal DP. Prognostic and diagnostic value of serum pseudocholinesterase, serum aspartate transaminase, and serum alinine transaminase in malignancies treated by radiotherapy. *J Cancer Res Ther.* 2008;4:21-5. Medline:18417898 doi:10.4103/0973-1482.39601
23. Searles Nielsen S, McKean Cowdin R, Farin MF, Holly EA, Preston Martin S, Mueller BA. Childhood brain tumors, Residential insecticide exposure and Pesticide metabolism genes. *Environ Health Perspect.* 2010;118:144-9. Medline:20056567
24. Prody CA, Gnatt A, Zevin Sonkin D, Goldberg O, Soreq H. Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. 1987. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA* 84,3555-9.
25. Soreq H, Zamir R, Zevin Sonkin D, Zakut H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Hum.Gen.*1987; 77, 325-8.
26. Bernstein R, Pinto MR, Behr A, Mendelow R. Chromosome 3 abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) with abnormal thrombopoiesis: report of three patients with a "new" inversion anomaly and a further case of homologous translocation. *Blood* 1982;60,613-7.
27. Tuchini MF, Travada P De Laroque A, Gineix A, Perissel B, Malet P. Translocation t(3;20) associated with thrombocythemia in Ph-positive CML. *Cancer Genet. Cytogenet.*1986;20, 1-4.
28. Ruberg M, Villageois A, Bonnet AM, Pillon B, Reiger F, Agid Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase acitivity in the cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative diseases

involving cholinergic systems. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1987;50:538-43.

29. Sridhar GR, Rao AA, Srinvas K, i sur. Butyrylcholinesterase in metabolic syndrome. *Medical hypothesis*, article in press. 2010. Elsevier Ltd. *Med Hypotheses* doi:10.1016/j.mehy.2010.08.008
30. Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. Neural inhibition of inflammation: the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Endotoxin Res* 2003;9:409-13.
31. Andriantsitohaina R, Suprenant A. Acetylcholine released from guinea pig submucosal neurones dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium. *J Physiol* 1992; 453:493-5.
32. Žarković N, Lončarić I, Žarković K, i sur. Patofiziološke značajke sekundarnih glasnika slobodnih radikala i oksidativni stres. U: *Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa*. (Bradamante V., Lacković Z., ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 13-32.
33. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Rad Res* 1996; 25; 52-74.
34. Halliwell B. The biological significance of oxygen derived species. Valentine JS, Foote CS, Greenberg A, Liebman JF. *Active oxygen in biochemistry*, Blackie Academic & Professional, New York 1995; 313-35.
35. Turrens JF: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* 1997;(17):1, 3-8.
36. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH ubiquinone reductase and ubiquinol cytochrome c reductase from beef heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180:248-57.
37. Turrens JF, Alexandre A, Lehinger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985; 237:408-14.

38. Williams RW, Herrup K. The control of neuron number. *Ann. Review Neuroscience* 1988; 11:423-53.
39. Ellenbogen RG, Abdulrauf SI. Principles of Neurosurgery. In: Rengachary SS, Ellenbogen RG (Ur). *Principals of neurological surgery*. Philadelphia ,PA:Saunders Elsevier,2012 (eBook2012)[WorlCat.org]
40. Kandel E, Schwartz J, Jessell Thomas. *Principals of Neural Science*. 4ed. New York: McGraw Hill Companies, 2000. ISBN 0-8385-7701-6.
41. Chugani HT. Neuroimaging of developmental nonlinearity and developmental pathologies. U: R.W.Tatcher, GR Lyon, J Rumsey, N. Krasnegor (Ur). *Developmental neuroimaging. Mapping the development of brain and behaviour*. San Diego CA, Academic Press 1996, str 187-95.
42. Esterbauer H, Schaur FJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*1991;11:81-128.
43. Svingen BA, O'Neal FO i Aust SD. The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochem Photobiol* 1978;28:803-9.
44. Smith WL, Marnet LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta* 1991;1083:1-17.
45. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:117-31.
46. Kolenc D.(2010) Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga.Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu ;2010,str.5. <http://medlib.mef.hr/866>
47. Sies H. *Oxidative Stress: an introduction in oxidative stress oxidants and antioxidants*. Academic Press, London 1991;319-36.
48. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studis on

malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular diseases* 2005;15, 316-28.

49. J.W. Spelding. Toxicology and carcinogenesis studies of malondialdehyde sodium salt ( 3-hydroxy-2propenal,sodium salt ) in F344/ N rats and B6C3F mice, NTP Technical Report 1988; 331: 5-13.
50. Pryor WA, Stanley JP. A suggested mechanism for the production of MDA during the autooxidation of PUFA. Nonenzymatic production of prostaglandine endoperoxides during autooxidation. *Letter. J Org Chem* 1975; 40:3615-7.
51. Frankel EN, Neff WE. Formation of the malondialdehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta* 1983; 754:264-70.
52. Wlodawer, P., and Samuelsson, B. On the organization and mechanism of prostaglandin synthetase, *J. Biol. Chem.* 1973; 248:5673–8.
53. Farmer EE, Davoine C. Reactive electrophile species. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10 (4): 380- 6. doi:10.1016/j.pbi.2007.04.019. PMID 17646124.
54. Marnett LJ (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde". *Mutat. Res.* 424 (1–2): 83- 95. doi:10.1016/S0027-5107(99)00010-X. PMID 10064852.)
55. Gonenc A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *J Clin Pharm Ther* 2001;26:141-4.
56. Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem* 1991;28: 504-8.
57. Yoneyama Y, Sawa R, Suzuki S, Doi D, Yoneyama K, Otsubo Y, et al. Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine deaminase activities in preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2002;322:169e73.

58. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049-55.
59. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 1974. 44, 147-59.
60. Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB et al. Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2008; 283 (23): 16169-77. doi: 10.1074/jbc.M801522200.
61. Antonyuk SV, Strange RW, Marklund SV, Hasnain SS. The structure of human extracellular copper zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution insights into heparin and collagen binding. *J Mol Biol*, May 2009; 388(2):310-26.
62. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA et al. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry* 1996; 35(14):4287-97.
63. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988, 34. 497-500.
64. Takahashi MA, Asada K. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. 1983; 226: 558-66.
65. Alcher RG, Erturk N, Lenwood SH. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 2002;53, 372: 1331-41.
66. McDowall J. Catalase.  
[www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004\\_9/Page1.htm](http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_9/Page1.htm)
67. Goodsell D. Catalase. doi:10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2004\_9 ;  
[URL:http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=57&print=1](http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=57&print=1)
68. Pun PB, Lu J, Mochala S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res*. 2009;43: 348-69.

69. Freeman LR, Keller JN. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: regulation of the blood brain barrier and antioxidant based interventions. *Biochim.Biophys.Acta* 2012; 1822:822-29.
70. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001;18:685-716.
71. Fischer S, Wiesnet M, Renz D, Schaper W. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces paracellular permeability of porcine brain derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *European Journal of Cell Biology* 2005;84:687-9.
72. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *CMLS Cell.Mol.Life.Sci.*2000;57:1825- 35.
73. Lubos E, Loscalzo J, Handy JE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease:From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxydans and redox signaling.* 2011;15-7,1957-97.
74. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1988;937:205-10.
75. Chu F. F., Doroshow J. H. and Esworthy R. S. Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.*1993; 268: 2571–6.
76. Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto Y, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biochem.* 1990; 108: 145–8.
77. Maiorino M, Thomas JP, Girotti AW, Ursini F. Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathioneperoxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides.*Free Rad. Res. Comm.*1991; 12: 131–5.
78. Maiorino M, Aumann K D, Brigeliusflohe R i sur. Probing the

presumed catalytic triad of a selenium-containing peroxidase by mutational analysis. *Z. Ernährungswiss.* 1998; 37: 118–21.

79. Hoekstra WG. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed. Proc.* 1975; 34: 2083–9.
80. Taylor SD, Davenport LD, Speranza MJ, Mullenbach GT, Lynch RE. Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 305: 600–5.
81. Kelner MJ, Bagnell RD, Uglich SF, Montoya MA, Mullenbach GT. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 323: 40–6.
82. Kretz Remy C, Mehlen P, Mirault ME, Arrigo AP. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase over-expression. *J. Cell Biol.* 1996; 133: 1083–93.
83. Crosby AJ, Wahle KWJ, Duthie GG. Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1b. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1303: 187–92.
84. Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS, Magnenat JL, Rousou JA i sur. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischaemia reperfusion injury. *Circulation* 1997;96: 216–20.
85. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2007;2(2): 219-36.
86. Robbins D, Zhao Y. Manganese Superoxide dismutase in Cancer Prevention. *Antioxidants&Redox Signal.* 2014;20(19): 1628-45. doi: 10.1089/ars.2013.5297
87. Morel Y, Barouki R. *Biochemical Journal* 1999; 342 (3) 481-96;doi: 10.1042/bj3420481



88. Schlag G, Zarkovic K, Redl H, Zarkovic N, Waeg G: Brain damage secondary to hemorrhagic shock in baboons. U: Shock, Sepsis and Organ Failure, Schlag G, Redl H, Traber DL (Ur). 5th Wiggers Bernard Conference 1996, Springer-Verlag, Heidelberg, 1997; str. 3-17.
89. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. Apo E deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. *Atherosclerosis and Thrombosis*. 1994;14( 4): 605-16. <http://atvb.ahajournals.org/>
90. Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43:550- 7.
91. Gonenc A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26(2):141-4.
92. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood pasma. *Biochemical Medicine* 1976; 15: 212-6.
93. Akbulut KG, Gonul B, Akbulut H. Differential effects of pharmacological doses of melatonin and malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats. *Gerontology* 1999;45:67- 71.
94. Zhang Y, Chen SY, Hsu T, Santella RM. Immunohistochemical detection of malondialdehyde DNA adducts in human oral mucosa cells. *Carcinogenesis*. 2002; 23(1), 207-11.
95. Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Rad Biol Med* 2012; 52(1): 7-18.
96. Forsberg K, Wuttke A, Chumakov PM, Wizenmann A, Di Giovanni S. The tumor suppressor p53 fine-tunes ROS levels and neurogenesis via PI3K signaling. *J. Neurosci*. 2013;33(36):14318 –30.
97. Negre- Salvayre A, Auge N, Ayala V, i sur. Pathological aspects of

- lipid peroxidation. Free Radical Research, 2010; 44(10): 1125-71.
98. Szent – Gyorgy A, Isenberg I, Baird SL. On the electron donating properties of carcinogens. Proc Natl Acad Sci USA 1960; 46 :1444-9.
  99. Singhal SS, Awasthi JC, Awasthi S. Regression of melanoma in a murine model by RLIP76 depletion. Cancer Res 2006; 66:2354-60.
  100. Singhal SS, Singhal J, Yadav S i sur. Regression of lung and colon cancer xenografts by depleting or inhibiting RLIP76(Ral binding protein1). Cancer Res 2007, 67:4382-9.
  101. uret JL, Delabar JM, Marlhens F i sur. Down syndrome with duplication of a region of chromosome 21 containing the CuZn superoxide dismutase gene without detectable karyotypic abnormality. Hum Genet 1987; 75(3):251-7.
  102. Peters TJ. Investigation of tissue organelles by a combination of analytical subcellular fractionation and enzymic microanalysis: a new approach to pathology. J Clin Pathol 1981; 34:1-12.
  103. Hussain SP, HofsethLJ, Haris CC. Radical causes of cancer 2003;3: 276-85.
  104. von Sonntag C. New aspects in the free radical chemistry of pyrimidine nucleobases. Free Radic res Common 1987; 2:217-24.
  105. Bartsch H, Nair J. Accumulation of lipid peroxidation derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation driven malignancies. Mutat Res 2005; 591:34-44.
  106. Žarković N, Žarković K, Schaur RJ i sur. 4 HNE as a second messenger of free radicals and growth modifying factor. Life Sci 1999; 65:1901-4.
  107. Papacocea T, Papacocea R, Badarau A, Ion AD, Buraga I i sur. Oxidative stress and antioxydants in brain tumors. Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology. 2011; 153: 234-9.
  108. Chourmouzi D, Papadopoulou E, Kontopoulos A, Drevelegas A.

Radiation-induced intracranial meningioma and multiple cavernomas. *BMJ Case Rep* 2013. doi:10.1136/bcr-2013-010041

109. Klaunig EM, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology*. 2010; 38:96-109.
110. Rao GM, Rao AV, Raja A, Rao S, Rao A. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. *Clin Chim Acta* 2000; 296(1-2):203-12.
111. Ezer R, Alonso M, Pereira E i sur. Identification of GST polymorphisms in brain tumors and association with susceptibility to pediatric astrocytomas. *J Neurooncol* 2002 ; 59(2):123-34.
112. Forsberg L, Lyrenas L, de Faire U, Morgenstern R. A common substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med* 2001;30:500-5.
113. Marklund S. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984;74:1398-403.
114. Kavanagh RJ, Kam PC. Lazaroids: efficacy and mechanism of action of the 21 aminosteroids in neuroprotection. *Br J Anesth*. 2001; 86: 110-9.
115. Wagemakers M, van der Wal GE, Cuberes R i sur. COX2 inhibition combined with radiation reduces orthotopic glioma outgrowth by targeting the tumor vasculature. *Trans Oncol* 2009; 2:1-7.
116. Toyokuni S. Iron as a target of chemoprevention for longevity in humans. *Free Radic Res* 2011; 45(8):906-17.
117. Kang YH, Lee E , Choi MK i sur. Role of reactive oxygen species in the induction of apoptosis by alpha tocopheryl succinate. *Int J Cancer* 2004; 112:385-92.
118. Wion D, Berger F, Wion Barbot N. Glioma, melatonin and

radiotherapy. *Cancer Res.* 2006; 15:66(12):6457.

119. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. *Patofiziologija*. 7. izdanje. ISBN: 978-953-176-492-6; Izdavač: Medicinska naklada Zagreb; 2011;
120. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD i sur. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007;114:97–109. DOI 10.1007/s00401-007-0243-4
121. Gilles FH, Sobel EL, Tavaré CJ, Leviton A, Hedley-Whyte ET. Age-related changes in diagnoses, histological features, and survival in children with brain tumors: 1930–1979. The Childhood Brain Tumor Consortium. *Neurosurgery* 1995; 37:1056–68.
122. Dasgupta B, Yi Y, Chen D, Weber J, Gutmann D. Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated and mouse brain tumors. *Cancer Research* 2005; 65:2755–60.
123. Packer RJ, Sutton LN, Bilaniuk LT, Radcliffe J, Rosenstock JG, Siegel KR, Bunin GR, Savino PJ, Bruce DA, Schut L (1988) Treatment of chiasmatic/hypothalamic gliomas of childhood with chemotherapy: an update. *Annals of Neurology* 23:79–85
124. Packer RJ, Lange B, Ater J, Nicholson HS, Allen J, Walker R, Prados M, Jakacki R, Reaman G, Needles MN et al (1993) Carboplatin and vincristine for recurrent and newly diagnosed low-grade gliomas of childhood. *Journal of Clinical Oncology* 11:850–856
125. Packer RJ, Ater J, Allen J i sur. Carboplatin and vincristine chemotherapy for children with newly diagnosed progressive low grade gliomas. *Journal of Neurosurgery* 1997;86:747–54.
126. Packer R, Vezina G, Nicholson H, Chadduck W. Childhood and adolescent gliomas. U: Albright L, Pollack I, Adelson D (Ur.). *Principles and practice of pediatric neurosurgery*. Thieme, New York, 1999; str 689–701.

127. Barbosa M, Rios O, Velasquez M, Villalobos J, EhrmannsJ. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors. *Surgical Neurology* 2001;55:106–112.
128. Hölsken A, Kreutzer J, Hofmann BM i sur. Target gene activation of the Wnt signaling pathway in nuclear beta-catenin accumulating cells of adamantinomatous craniopharyngiomas. *Brain Pathol.* 2009 Jul;19(3):357-64. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00180.x. Epub 2008 May 29.
129. Brinster RL, Chen HY, Messing A, van Dyke T, Levine AJ, Palmiter RD. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* 1984; 37: 367–79.
130. Mellon CD, Carter JE, Owen DB. Ollier's disease and Maffucci's syndrome: distinct entities or a continuum. Case report: enchondromatosis complicated by an intracranial glioma. *Journal of Neurology* 1988; 235:376–8.
131. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
132. Shugart HH. A theory of forest dynamics. The ecological implications of forest succession models. New York: Springer Verlag 1984.
133. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010; 5(6):463-6.
134. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of cholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7:88-95. Medline:13726518 doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9.
135. Woolliams J, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *res Vet Sci.* 1983; 34: 253–6.

136. Paglia DE, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158–69.
137. Goth I. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim acta* 1991; 196: 143–52.
138. Russell MD, Young AMH, Karri SK. Biomarkers of pediatric brain tumors. *Frontiers in pediatrics/Pediatric Oncology*, 2013; (1), 7: 1-7
139. American Association of Neurological Surgeons (AANS). Identification of protein biomarkers offers promise for children with deadly brainstem gliomas. available from: <http://www.newswise.com/articles/>. accessed: october 15, 2013.
140. Massoulie J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann.Rev.Neurosci.*1982; 5, 57-106.
141. Zakut H, Matzkel A, Schejter E, Avni A, Soreq H. *J Neurochem* 1985; 45, 382-9.
142. Razon N, Soreq H, Roth E, Bartal AD, Silman I. *Exp. Neurol.*1984; 84, 681-95.
143. Zakut H, Even L, Birkenfeld S, Malinger G, Zisling R, Soreq H. *Cancer* 1988; 61, 727-39.
144. V. Bradamante i sur.: Plasma Cholinesterase Activity, *Coll. Antropol.* 2000;24, 2: 373– 80.
145. Puche E, Garcia Morillas M, Garcia de la Serrana H, Mota C. Probably pseudocholinesterase induction by valproic acid, carbamazepine and phenytoin leading to increased serum aspirin esterase activity in epileptics. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1989;9:309- 11. Medline:2516508

146. Woodworth GE, Sears DH, Grove TM, Ruff RH, Kosek PS, Katz RL. The effect of cimetidine and ranitidine on the duration of action of succinylcholine. *Anesth Analg.* 1989;68:295-7.  
Medline:2919769
147. Verjee ZH, Behal R, Ayim EM. Effect of glucocorticoids on liver and blood cholinesterases. *Clin Chim Acta.* 1977;81:41-6.  
Medline:923092 doi:10.1016/0009-8981(77)90411-9
148. Aono M, Moriga M, Mizuta H, Narusawa H. Cholinergic effects of histamine-h2 receptor antagonists partly through inhibition of acetylcholinesterase. *Gastroenterol Jpn.* 1986;21:213-9.  
Medline:2874096
149. Kim DH, Mohapatka G, Bollen A, Waldman FM, Feurestein BG. Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. DOI: 10.1002/ijc.2910600615
150. Hu J, Jiang C, Nq HK, Pang JC, Tong CY. Chromosome 14q may harbour multiple tumor suppressor genes associated with primary glioblastoma multiforme. *Chinese Journal of Cancer Research* 2002;115(8):1201-4.
151. Kawakami Y, Monobe M, Kuwabara K i sur. A comparative study of nitric oxide, glutathione and glutathione peroxidase activities in cerebrospinal fluid from children with convulsive diseases/children with aseptic meningitis. *Brain & Development* 2006;28; 243-6.
152. Dwyer DJ, Kohansky MA, Collins JJ. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2009;12:428-89.
153. Albesa I, Becerra MC, Battan P, Paez PL. Oxidative stress involved in the bacterial action of different antibiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;317:605-9.
154. Marin A, Martin M, Linan O i sur. Bystander effects and radiotherapy. *Reports of practical oncology and radiotherapy* 2015;20:12-21.

155. Ibarra A, Diaz Ruiz A. Protective effect of cyclosporin-A in spinal cord injury: an overview. *Curr Med Chem* 2006; 13(22); 2703-10.
156. Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 2010; 88, 23-45.
157. Shamberger RJ, Andreone TL, Willis CE. Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53:1771-3.
158. Marnett LJ. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 1999;424: 83-95.
159. Drury JA, Nycyk JA, Cooke RWI. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin Chim Acta* 1997; 263:177-85.
160. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 2006;97:1634-58.
161. Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; (389):1; 84-93.
162. Tanriverdi T, Hanimoglu H, Kacira T i sur. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and protein oxidation in patients with glioblastoma multiforme and transitional meningioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133(9):627-33. Epub 2007 Apr 25.
163. Aggarwal S, Subberwal M, Kumar S, Sharma M. Brain tumor and role of  $\beta$  -carotene,  $\alpha$ -tocopherol, superoide dismutase and glutathione peroxidase. *J Can Res Ther* 2006; 2:24-7.
164. Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV. Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of Mitochondria, *BioMed Research International* 2014. Article ID 238463, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/238463>
165. Rajamaran P, Hutchinson A, Rothman N i sur. Oxidative response gene polymorphisms and risk of adult brain tumors. *Neuro Oncol* 2008; 10(5):709-15.



166. Moscow JA, Schmidt L, Ingram DT, Gnarr J, Johnson B, Cowan KH. Loss of heterozygosity of the human cytosolic GPX1 gene in lung cancer. *Carcinogenesis* 1994;15: 2769-73.
167. Joshi G, Aluise CD, Cole MP i sur. Alterations in brain antioxidant enzymes and redox proteomic identification of oxidized brain proteins induced by anticancer drug Adriamycin: implications for oxidative stress mediated chemobrain. *Neuroscience* 2010; 166(3):796-807.
168. Dokić I, Hartmann C, Herold Mende C, Vigouroux Regnier A. GPx 1 activity dictates the sensitivity of glioblastoma cells to oxidative stress. DOI:10.1002/glia.22397. *Glia* 2012; 60 (11), 1785-1800.
169. Bhatti P, Steart P, Hutchinson A. Lead exposure, polymorphism in genes related to OS, and risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev* 2009; 18:1841-8.
170. Betancourt JR. Determinants of airborne lead exposure during special operations training for US marines. A thesis presented to the Faculty of San Diego State University, 2012. URL <http://hdl.handle.net/10211.10/3454>; 2013.
171. Combs GF Jr. Status of selenium in prostate cancer prevention. *Br J Cancer* 2004; 91:195-9.
172. Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ i sur. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers; the selenium and vitamin E prevention trial (SELECT). *Jama* 2009; 301: 39-51.
173. Chu FF, Esworthy RS, Chu PG i sur. Bacteria induced intestinal cancer in mice with disrupted GPx1 and GPX2 genes. *Cancer Res* 2004;64: 962-8.
174. Hu YJ, Dolan ME, Bae R i sur. Allelic loss at the GPX 1 locus in cancer of the head and neck. *Biol Trace Elem Res*.2004; 101: 97-106.
175. Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AM. Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium containing protein is a common event in cancer. *J Nutr* 2005; 135(12 Suppl):3021S-3024S.

176. Mirault M-E, Tremblay A, Beaudoin N, Tremblay M. Overexpression of seleno-glutathione peroxidase by gene transfer enhances the resistance of T47D human breast cells to clastogenic oxidants. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 20752–60.
177. Kelner MJ, Bagnell RD, Uglich SF, Montoya MA, Mullenbach GT. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase afford cellular resistance to paraquat. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 323: 40–6.
178. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 27812–7.
179. Shijun Li, Tao Yan, Ji-Qin Yang i sur. The Role of Cellular Glutathione Peroxidase Redox Regulation in the Suppression of Tumor Cell Growth by Manganese Superoxide Dismutase1. *Cancer Research* 2000; 60, 3927–39.
180. Abdul Salam A, Al Abrash , Al Quobaili F, Ghada N, Al Akhras. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative strss. *Saudi Medical Journal* 2000; 21(9):826-30.
181. Pastor MC, Sierra C, Dolade M i sur. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin Chem* 1998,44:924-9.
182. King CM, Bristow Craig HE, Gillespie ES, Barnett YA. In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation, and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75 to 80 year old humans. *Mutation Research* 1997; 377:137-48.
183. Casado A, de la Torre R, Lopez Fernandez E, Carrascosa D, Venarucci D. SOD and catalase levels in disease of aged. *GAC Med Mex* 1998; 134: 539-44.
184. Den Besten H M W, Effraimidou S, Abee Tjakko. Catalase activity as a biomarker for mild stress induced robustness in *Bacillus weihenstephanensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(1):57-62.

185. Wozniak B, Wozniak A, Kasprzak HA i sur. Lipid peroxidation and activity of some antioxidant enzymes in patients with glioblastoma and astrocytoma. *J Neurooncol* 2007; 81(1):21-6.
186. Singhal A, Morris VB, Labhasetwar V, Ghorpade A. Nanoparticle mediated catalase delivery protects human neurons from oxidative stress. *Cell Death and Disease*, 2013; 4. e903;doi:10.1038/cddis.2013.362
187. Elchuri S, Oberley TD, Qi W i sur. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005; 24; 367-80.
188. Beutler, E.: Superoxide dismutase. U: Beutler E. *Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*. 3rd, ed. Grune and Stratton Inc., Philadelphia, PA, 1984, str 83-5.
189. Van Driel BEM, Valet GK, Lyon H, Hansen U, Ying Song J, Van Noorden C. Prognostic Estimation of Survival of Colorectal Cancer Patients With the Quantitative Histochemical Assay of G6PDH Activity and the Multiparameter Classification Program CLASSIF1. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1999; 38:176–83.
190. Campana F, Zervoudis S, Perdereau B i sur. Topical superoxide dismutase reduces post irradiation breast cancer fibrosis. *J Cell Mol Med* 2004; 8(1): 109-16.
191. Kim A, Modulation of MnSOD in Cancer: Epidemiological and Experimental Evidences. *Toxicol. Res.* 2010; Vol. 26, No. 2, pp. 83-93.
192. Park CK, Jung JH, Moon MJ i sur. Tissue expression of manganese superoxide dismutase is a candidate prognostic marker for glioblastoma. *Oncology* 2009;77:178-81.
193. Reddy SP, Britto R, Vinnakota K i sur. Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis. *Clin Cancer Res* 2008;14(10): 2978-87.

194. Yang J, Zhang C, Zhang W, Shi R, Zhang Z. Extracellular superoxide dismutase, a potential extracellular biomarker candidate for prolactinoma. *West Indian Medical Journal*. 2012; 61 (7): 665-9. DOI: DOI:10.7727/wimj.2012.213.
195. Marton LJ, Edwards MS, Levin VA, Lubich WP, Wilson CB. Predictive value of cerebrospinal fluid polyamines in medulloblastoma. *Cancer Res* 1979;39:993-7.

## 11. BIOGRAFIJA

Rođena sam u Zagrebu 1961. godine gdje sam završila osnovnu i srednju školu Obrazovni centar za jezike (Jezična gimnazija) te stekla zvanje stručnog suradnika u nastavi, smjer jezici - engleski i talijanski. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1981. i diplomirala 1986. godine. Volontirala sam šest mjeseci u Općoj bolnici Ivana Zajca u Zagrebu na općoj kirurgiji. U istoj bolnici obavila sam i jednogodišnji liječnički staž. Stručni ispit obavila sam pri Domu zdravlja Medveščak. Uslijedio je posao liječnice u Službi hitne pomoći Doma zdravlja Novi Zagreb gdje sam radila sve do specijalizacije iz pedijatrije koju sam započela 1991. godine na Klinici za dječje bolesti Zagreb. U međuvremenu sam upisala i završila Poslijediplomski studij iz Kliničke pedijatrije na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Specijalistički ispit sam položila 1996. godine. Poslijediplomski studij iz hitne i intenzivne medicine upisujem 2005., a nakon njega nastavljam Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Subspecijalistički ispit iz intenzivne medicine za područje pedijatrije položila sam po dvogodišnjoj subspecijalizaciji 2008. godine. Nakon toga sam bila zaposlena u Jedinici intenzivnog liječenja Klinike za dječje bolesti Zagreb. U tome periodu godinu dana sam radila na Odjelu za solidne tumore djece, Klinike za dječje bolesti Zagreb kako bih se 2010. godine zaposlila u Jedinici intenzivnog liječenja djece u Univerzitetnom kliničkom centru Maribor gdje radim do 2015. godine. Od tada sam pedijatar na Odjelu za pedijatriju Opće bolnice Trbovlje, u Sloveniji gdje od 2016. godine obavljam i dužnost stručne direktorice bolnice. Na Medicinskom fakultetu u Mariboru vodim Biosimulacijski laboratorij i asistent sam na katedri za pedijatriju.

