

Parametri oksidativnog stresa u svetloćelijskom karcinomu bubrega

Nastanak svetloćelijskog karcinoma bubrega povezan je sa spoljašnjim faktorima, kao što su pušenje, gojaznost, izloženost različitim agensima iz okoline poput kadmijuma, azbesta i slično. Ovakvi faktori utiču na narušavanje ravnoteže u ćelijama, odnosno mogu dovesti do pojave oksidativnog stresa. Stanje narušene ravnoteže može indukovati nagomilavanje mutacija u mitohondrijskoj i jedarnoj DNK i na taj način uticati na progresiju tumora i stvaranje metastaza, kao i rezistenciju na hemioterapiju. Cilj ovog rada je komparativna analiza parametara oksidativnog stresa u uzorcima zdravog i tumorskog tkiva bubrega pacijenata obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija. Analize su vršene na homogenizovanim uzorcima tkiva bubrega 10 pacijenata. Određivana je aktivnost enzima koji su pokazatelji primarne antioksidativne zaštite: superoksid-dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i hem-peroksidaze (hem-POD), enzima sekundarne antioksidativne zaštite, glutation S-transferaze (GST) i koncentracija malondialdehida (MDA), kao pokazatelja stepena lipidne peroksidacije u zdravom i tumorskom tkivu. Sve analize vršene su spektrofotometrijski. Pokazano je da je koncentracija MDA povećana u tumorskom tkivu i da koncentracija raste sa gradusom tumora. Aktivnost enzima SOD je povećana u tumorskom tkivu, što zajedno ukazuje na povećano stvaranje slobodnih radikala u tumorskim ćelijama. Pokazano je da su aktivnosti enzima CAT, i GST niže u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo bubrega, što pokazuje da je antioksidativna sposobnost tumorskih ćelija smanjena. Povišena količina slobodnih radikala i smanjena antioksidativna sposobnost tumorskog u poređenju sa zdravim tkivom pacijenata, ukazuju da se tumorsko tkivo nalazi pod dugotrajnim oksidativnim stresom koji može biti jedan od značajnih faktora pri nastanku i razvoju svetloćelijskog karcinoma bubrega.

Uvod

Uloga bubrega u eliminaciji štetnih produkata metabolizma svrstava ih, pored jetre, u organe sa najvećim rizikom da budu izloženi potencijalnim karcinogenima. Karcinom bubrega predstavlja heterogenu grupu oboljenja nastalih kao posledica poremećenog ćelijskog rasta epitelnog tkiva bub-

Jelena Ljubičić (1997), Trstenik, Leke Zdravkovića 17, učenica 4. razreda Gimnazije „Vuk Karadžić” u Trsteniku

Milica Mihailović (1997), Gornji Milanovac, Rudnička 7, učenica 4. razreda Gimnazije „Takovski ustanak” u Gornjem Milanovcu

MENTOR: Anđelka Isaković, dr. med., Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

rega. Preko 90% svih maligniteta bubrega koji se javljaju kod odraslih u oba pola, pripada karcinomu bubrežnih ćelija (eng. Renal cell carcinoma, RCC; Eble *et al.* 2004). Različiti oblici RCC-a su identifikovani i klasifikovani na osnovu histoloških karakteristika, lokacije i patofizioloških osobina, gde se kao dominantan oblik ove bolesti javlja svetloćelijski ili konvencionalni karcinom bubrežnih ćelija (eng. Clear cell RCC, CCRCC), koji je identifikovan u 75% slučajeva (Dutcher 2013). Uticaj naslednih faktora je mali i iznosi svega 2-3% (Coleman *et al.* 2008), što potvrđuje da je ovo oboljenje povezano pre svega sa uticajem spoljašnjih faktora na organizam, kao i sa samom ulogom bubrega zbog koje je epitel bubrežnih kanalića izložen povećanoj koncentraciji karcinogena prisutnih u telu. Važna odlika ovog oboljenja je odsustvo značajnijih simptoma, tako da je u momentu otkrivanja bolest često već uznapredovala. Zbog toga se preporučuje uvođenje redovnih kontrola za osobe sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija.

Oksidativni stres predstavlja stanje organizma u kom je narušena ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala (proooksidanasa) i njihovog neutralisanja od strane sistema antioksidativne zaštite organizma. Oksidativni stres je jedan od faktora koji utiču na nastanak velikog broja akutnih i hroničnih bolesti, uključujući i maligne (Sen 2001). Štetno delovanje slobodnih radikala se zasniva na interakciji ovih izuzetno reaktivnih hemijskih vrsta sa susednim stabilnim molekulom, pri čemu započinje lančana reakcija koja dovodi do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih promena biomolekula (Rimbach *et al.* 1999). Prekomerno stvaranje slobodnih radikala u organizmu dovodi do povećane aktivnosti antioksidativnih mehanizama odbrane, kako bi se organizam zaštitio od štetnog dejstva i nekontrolisanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta u metaboličkim procesima.

Superoksidni anjon radikal (O_2^-) je jedna od reaktivnih vrsta kiseonika čiji se fiziološki nivo održava aktivnošću enzima superoksid dizmutaze (SOD), koja ga prevodi u vodonik-peroksid. Neutralizaciju vodonik-peroksida u ćeliji vrše katalaza (CAT) i enzimi iz familije peroksidaza, poput glutation- i hem-peroksidaze (GSH-Px i hem-POD). Glutation S-transferaze (GST) predstavljaju veliku grupu enzima, koji pripadaju drugoj liniji antioksidativne odbrane i imaju ulogu u konjugaciji ksenobiotika sa glutationom (GSH). Ovi mehanizmi odbrane u stanju oksidativnog stresa nisu dovoljno efikasni, što može dovesti do narušavanja membranskih struktura, enzimske aktivnosti, signalne transdukcije i ćelijske adhezije. U prilog tome govori i veliki broj istraživanja u kojima je ispitivana i potvrđena uloga reaktivnih kiseoničnih vrsta u procesima karcinogeneze, mutacija i transformacija ćelije (Cooke *et al.* 2003; Balasubramaniyan *et al.* 1994; Chung-man *et al.* 2001). Malondialdehid (MDA), nusproizvod oksidativnog oštećenja lipida, jedan je od molekula koji mogu reagovati sa nukleinskim kiselinama, stvarajući pri tome štetne MDA-DNK adukte koji indukuju mutacije u onkogenima i tumor-supresor genima, takođe doprinoseći karcinogenezi (Stone *et al.* 1990). Ovaj proooksidans predstavlja jedan od najčešće korišćenih biomarkera nivoa oksidativnog stresa.

Uzimajući u obzir uticaj oksidativnog stresa na oštećenje ćelija i tkiva, kao i na sam proces karcinogeneze, ovaj rad je za cilj imao komparativnu analizu parametara oksidativnog stresa u zdravom i tumorskom tkivu bubrega pacijenata obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija.

Definisani su sledeći pojedinačni ciljevi:

1. Određivanje koncentracije malondialdehida u uzorcima tumorskog i zdravog tkiva;
2. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, CAT, hem-
-POD i GST u uzorcima tumorskog i zdravog tkiva;
3. Upoređivanje dobijenih parametara u zdravom i tumorskom tkivu.

Materijal i metode

Pacijenti i uzorci. Uzorci koji su korišćeni u istraživanju predstavljaju delove tkiva bubrega pacijenata obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija, koji su lečeni na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije. Uzorci tkiva bubrega dobijeni su radikalnom nefrektomijom, u skladu sa propisanim procedurama medicinske prakse. Histopatološkom analizom utvrđeno je da tumorsko tkivo pacijenata po tipu pripada svetloćelijskom karcinomu bubrežnih ćelija, I, II, III ili IV gradusa po Fuhrmanovom sistemu (Fuhrman *et al.* 1982). Uzorci zdravog tkiva, koji predstavljaju kontrolu, uzeti su sa udaljenog dela istog organa. Kompletna obrada i priprema za skladištenje uzoraka vršena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča” u Beogradu, u skladu sa pravilima i dozvolama Etičkog komiteta.

Uzorci su grupisani u deset parova tumorskog i zdravog tkiva, od kojih svaki par predstavlja uzorke tkiva jednog pacijenta. Za svakog pacijenta, poznati su pol, starost i gradus tumora. Istraživanje je obuhvatilo 7 pacijenata muškog i 3 pacijenta ženskog pola.

Homogenizacija tkiva bubrega. Tkivo je isprano u fiziološkom rastvoru, a potom je 100 mg tkiva homogenizovano u 800 μ L fosfatnog pufera (0.05 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.4). Dobijeni homogenati tkiva ostavljeni su na -80°C tokom 20 h kako bi membranske strukture ćelija popucale i ćelijski sadržaj bio oslobođen u tečni deo homogenata. Nakon toga je odvojeno 2 puta po 100 μ L homogenata za određivanje koncentracije MDA, dok je ostatak homogenata bio centrifugiran na 8600 g 15 minuta na temperaturi od 4°C . Dobijeni supernatant je alikvotiran i korišćen za dalje analize.

Određivanje koncentracije proteina. Određivanje ukupne koncentracije proteina, radi izračunavanja specifične aktivnosti enzima, vršeno je metodom po Bradfordu (Bradford 1976), na talasnoj dužini od 595 nm.

Određivanje koncentracije MDA. Reagensi koji su bili korišćeni za određivanje koncentracije MDA su: 2.44 M trihlorsirćetna kiselina (TCA) i 55 mM tiobarbiturna kiselina (TBA), rastvorena u 0.1 M rastvoru NaOH. Pre dodavanja reagenasa svi homogenati su inkubirani tokom 10 minuta na 37°C . Reakcionu smešu je činilo 100 μ L homogenata tkiva, 400 μ L

fosfatnog pufera (pH = 7.4), 125 μL rastvora TCA i 125 μL rastvora TBA. Nakon dodavanja reagenasa, smeša je inkubirana na 100°C tokom 10 minuta. Tube su ohlađene pod mlazom vode i potom centrifugirane na 3000 rpm 10 minuta. Na visokoj temperaturi u kiseloj sredini MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat crvene boje, koji ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 532 nm (Bojanić *et al.* 2010). Kao slepa proba je korišćen fosfatni pufer. Apsorbanca konjugata je očitavana na talasnoj dužini od 540 nm. Koncentracija je računata po sledećoj formuli:

$$C_{\text{MDA}} = \frac{A_{\text{sr}}}{\varepsilon} \cdot \frac{V_{\text{T}}}{V_{\text{p}}} R$$

gde je: A_{sr} – srednja vrednost apsorbance, ε – molarni apsorpcioni koeficijent koji za MDA-TBA konjugat iznosi 0.156 $\text{nm}^{-1}\text{cm}^{-1}$, V_{T} – ukupna zapremina reakcione smeše, V_{p} – zapremina uzorka i R – razblaženje homogenata. Koncentracija MDA izražena je u nmol/g tkiva.

Određivanje enzimske aktivnosti. Enzimska aktivnost SOD, CAT, hem-POD i GST određivana je spektrofotometrijski, na osnovu promene apsorbance supstrata ili nastalog proizvoda na karakterističnim talasnim dužinama tokom 3 minuta, uz očitavanje vrednosti na svakih 30 sekundi. Za određivanje aktivnosti enzima korišćena je srednja vrednost promena apsorbance u toku jednog minuta. Specifična aktivnost E izražena je kao broj jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina (U/mg), a sračunavana po univerzalnoj formuli:

$$E = \frac{A_{\text{sr}}}{\varepsilon} \cdot \frac{V_{\text{T}}}{V_{\text{p}}}$$

gde je: A_{sr} – srednja vrednost promene apsorbance, ε – molarni apsorpcioni koeficijent, V_{T} – ukupna zapremina reakcione smeše, V_{p} – zapremina uzorka.

Određivanje aktivnosti SOD. Reakciona smeša za određivanje aktivnosti enzima SOD sastojala se od 270 μL 50 mM pufera TRIS-HCl, pH = 8.2, 10 μL supernatanta homogenata tkiva i 20 μL 0.4 mM pirogalola rastvorenog u 0.01 M HCl. Pirogalol, koji je u ovom eseju predstavljao supstrat za enzim SOD, dodavan je neposredno pre merenja. Autooksidacija pirogalola praćena je na talasnoj dužini od 405 nm (Marklund i Marklund 1974). Molarni apsorpcioni koeficijent za SOD iznosi 0.5 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Određivanje aktivnosti CAT. Aktivnost katalaze u homogenatima tkiva određivana je po metodi Beutlera iz 1984. godine. Reagensi korišćeni za određivanje aktivnosti CAT su 10 mM H_2O_2 i 1M Tris-HCl sa 5 mM EDTA, pH 8. Reakciona smeša sadržala je 225 μL rastvora H_2O_2 , 7.5 μL destilovane vode, 12.5 μL pufera i 5 μL uzorka. Vodonik peroksid predstavljao je supstrat za katalazu, pa je dodavan neposredno pre merenja apsorbance. Promena apsorbance praćena je na talasnoj dužini od 230 nm, pri temperaturi od 37°C. Molarni apsorpcioni koeficijent za CAT iznosi 0.071 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Određivanje aktivnosti hem-POD. Aktivnost enzima hem-POD u uzorcima homogenata tkiva bila je određivana po metodi Shindlera i saradnika iz 1976. godine. Korišćeni su 1 mM rastvor ABTS-a (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) 0.05 mM rastvor H₂O₂ i fosfatni pufer pH 7.4. Reakciona smeša sadržala je 10 µL rastvora ABTS-a, 10 µL rastvora H₂O₂, 70 µL fosfatnog pufera i 20 µL supernatanta homogenata tkiva. Rastvor vodonik peroksida, koji je supstrat hem-POD, dodavan je u smešu neposredno pre merenja apsorbance. Promena apsorbance praćena je na talasnoj dužini od 405 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent za hem-POD iznosi 31.1 M⁻¹cm⁻¹.

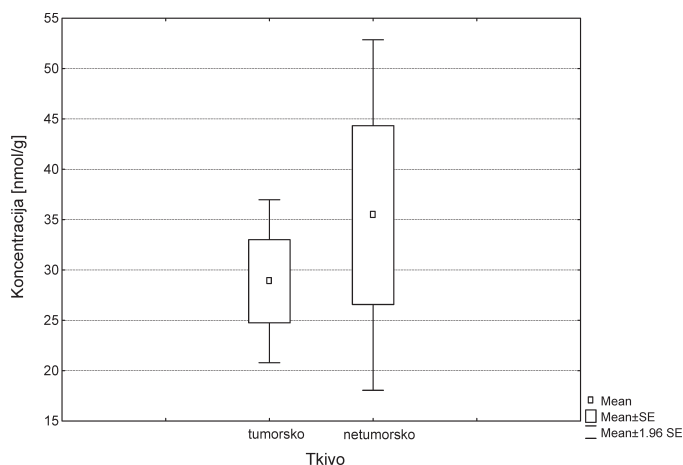
Određivanje aktivnosti GST. Aktivnost enzima GST određivana je prema metodi Habiga i saradnika iz 1974. godine. Korišćeni su 1 M fosfatni pufer pH 6.5, 1 mM rastvor redukovanog glutationa i 1 mM rastvor CDNB-a (1-hloro-2,4-dinitrobenzen), rastvoren u 96% etanolu. Reakciona smeša je sadržala 820 µL fosfatnog pufera, 30 µL rastvora redukovanog glutationa, 30 µL rastvora CDNB-a i 40 µL supernatanta homogenata tkiva bubrega. Esej se zasniva na sposobnosti enzima GST da stvori konjugat GSH-CDNB. Promena apsorbance praćena je na talasnoj dužini od 340 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent za GST iznosi 9.6 M⁻¹cm⁻¹.

Rezultati i diskusija

Koncentracija lipidnih peroksida. Koncentracija MDA, kao pokazatelja lipidne peroksidacije, povećana je u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo (slika 1), međutim na našem uzorku nije dobijena statistička značajnost. Povišena koncentracija MDA, kao parametra lipidne peroksidacije, zabeležena je u ranijim istraživanjima RCC (Aldemir *et al.* 2015; Ganesamoni *et al.* 2012) i to posebno CCRCC.

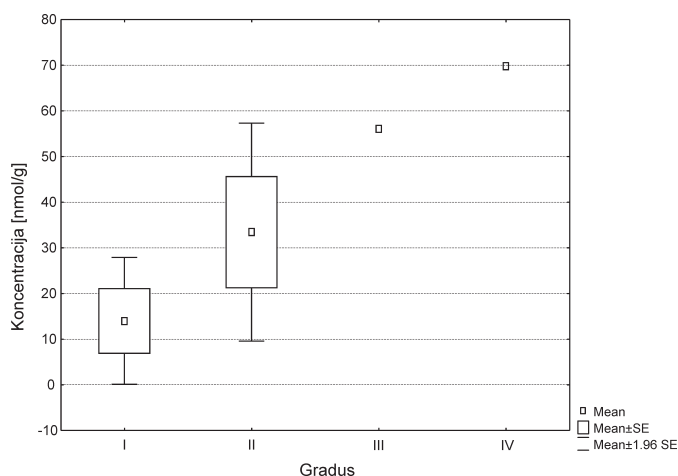
Povišen nivo lipidne peroksidacije može izazvati apoptozu prekarci-nomskih i karcinomskih ćelija i na taj način sprečiti dalje širenje karcinoma (Salganik 2001). Međutim, ova tvrdnja važi isključivo za vrlo aktivna proliferativna tkiva (kostna srž, limfa, koža), dok kod tkiva bubrega i jetre dolazi do smrti ili oštećenja neizmenjenih ćelija, što može dovesti do stvaranja tumora kroz DNK oštećenja i mutacije, tačnije aktivaciju proto-onkogeni i inaktivaciju tumor-supresornih gena. Posebno je pokazano da apoptoza, indukovana lipidnom peroksidacijom, može dovesti do inaktivacije tumor-supresornog gena VHL (Von Hippel Lindau), čija je disfunkcija inače zabeležena kod velikog broja obolelih od svetloćelijskog RCC (Gago-Dominguez i Castela 2006).

Naslućuje se i trend povećanja koncentracije MDA sa povećanjem gradusa tumora (slika 2), što je u skladu sa podacima iz literature (Ganesamoni *et al.* 2012). Međutim, kako je istraživanje obuhvatilo samo po jednog pacijenta sa III i IV gradusom tumora, potrebno je ovaj rezultat proveriti u proširenoj studiji. Povećanje koncentracije MDA, koje korelira sa gradusom tumora, ukazuje na ulogu oksidativnog stresa u progresiji bolesti.



Slika 1. Koncentracija MDA u tumorskom i zdravom tkivu. Na grafiku su prikazane srednja vrednost ($n = 10$), standardna greška i 95% intervala poverenja.

Figure 1. MDA concentration in tumor (left) and normal (right) tissue sample. Graph shows mean ($n = 10$), standard error and 95% of confidence interval.

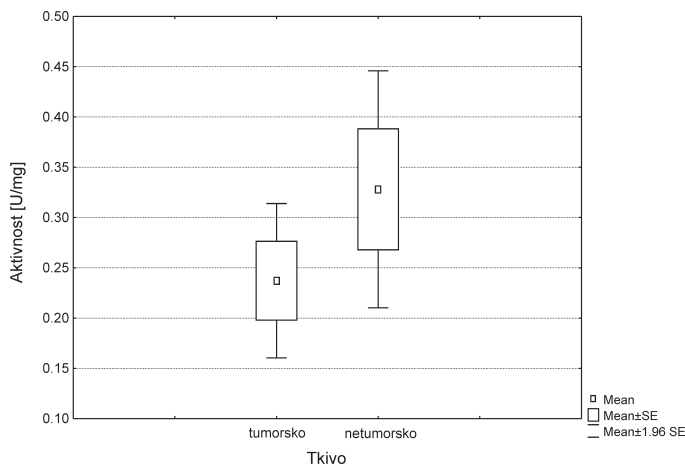


Slika 2. Koncentracija MDA u tumorskom tkivu različitih gradusa

Figure 2. MDA concentration in tumor tissue samples of different grade

Takođe, uočena je nešto niža produkcija lipidnih peroksida kod pacijenta ženskog pola. Manja koncentracija MDA kod obolelih ženskog pola, može se objasniti poznatim inhibitornim dejstvom estrogena na lipidnu peroksidaciju (Yagi 1997).

Aktivnost superoksid-dizmutaze. Zabeležena je povećana aktivnost superoksid-dizmutaze u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo (slika 3). Povišena aktivnost SOD zabeležena je i u prethodnim istraživanjima RCC (Ganesamoni *et al.* 2012; Shi *et al.* 2004), karcinoma dojke (Gibananada *et al.* 2000; Portakal *et al.* 2000) i kolorektalnog karcinoma (Skrzydłewska *et al.* 2005). Skrzydłewska sa saradnicima, u svom istraživanju iz 2005. godine navodi da pojačana aktivnost SOD dovodi do stvaranja veće količine vodonik-peroksida iz superoksidnog anjona, koji kasnije dovodi do izmena u ćelijskoj proliferaciji i apoptozi. Takođe, u istraživanju Strassburgera i saradnika iz 1995. pokazano je da je aktivnost NFκB, regulatora ekspresije gena koji preko inhibicije apoptoze pospešuje preživljavanje ćelije, povišena u ćelijama koje prekomerno ekspimiraju SOD.



Slika 3. Aktivnost SOD u tumorskom i zdravom tkivu. Na grafiku su prikazane srednja vrednost ($n = 10$), standardna greška i 95% intervala poverenja.

Figure 3. Specific activity of SOD in tumor (left) and normal (right) tissue sample. Graph shows mean ($n = 10$), standard error and 95% of confidence interval.

U istraživanju Bizea i saradnika iz 1980. godine utvrđeno je da maligno izmenjene ćelije u većoj meri produkuju superoksidni anjon, čime se objašnjava povišena aktivnost ovog enzima u uzorcima tumorskog tkiva.

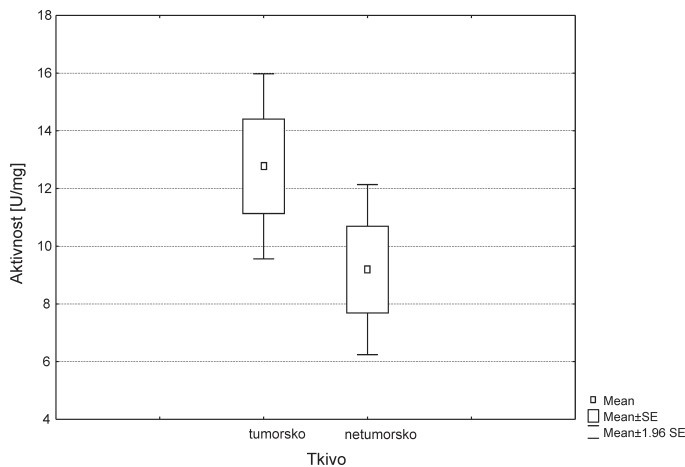
Aktivnost enzima SOD i GST dovodi se u direktnu vezu sa otpornošću tumorskih ćelija na hemio- i radioterapiju. Naime, u radu Hirose i saradnika iz 1993. navodi se da su ćelije humanog melanoma koje u većoj meri produkuju MnSOD, otporne na testirane hemioterapijske agense.

Aktivnost katalaze. Aktivnost katalaze (slika 4) u homogenatima tumorskog tkiva pacijenata je značajno snižena ($p = 0.006$) u odnosu na zdravo tkivo bubrega.

Smanjena aktivnost CAT u tumorskom tkivu u skladu je sa prethodnim istraživanjima RCC-a (Yang *et al.* 1987; Ganesamoni *et al.* 2012). Iako je kod nekih vrsta hepatocelularnih karcinoma zabeležen porast aktivnosti CAT, kod većine kako malignih, tako i benignih oboljenja dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti CAT (Oberley i Oberley 1997; Klaunig *et al.* 2010).

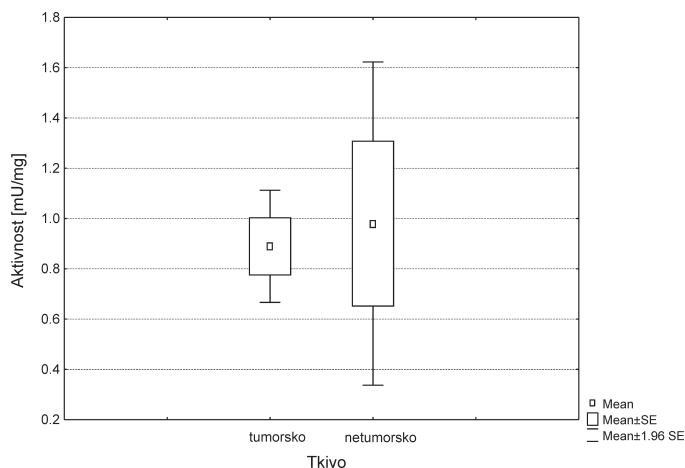
Ranijim istraživanjima utvrđen je nedostatak peroksizoma u svim tipovima karcinoma bubrega (Frederiks *et al.* 2010), hepatocelularnih karcinoma (Litwin *et al.* 1999), karcinoma debelog creva (Baur i Wendel 1980; Lauer *et al.* 1999) i karcinoma dojke (Keller *et al.* 1993). Kako je katalaza enzim koji je uglavnom lokalizovan u peroksizomima jetre i bubrega (Chance *et al.* 1979), nedostatak ovih ćelijskih organela može biti direktno povezan sa smanjenjem aktivnosti katalaze u tumorskom tkivu, zabeleženim u ovom radu.

Nagomilavanje vodonik-peroksida, indukovano smanjenom aktivnošću CAT u tumorskim ćelijama, može izazvati oštećenje DNK ili ćelijsku smrt (Ganesamoni *et al.* 2012). Takođe, u istraživanju Matobe i saradnika iz 2003. godine navodi se da vodonik-peroksid ima važnu ulogu u vazodilataciji, koja može pospešiti angiogenezu i na taj način dovesti do ekspanzije tumora (Fang *et al.* 2009). Smanjena aktivnost CAT i povećana aktivnost SOD u tumorskom tkivu, mogu povećati učestalost mutacija i dovesti do neoplastičnih transformacija (Gago-Dominguez i Castelao 2006).



Slika 4. Aktivnost CAT u tumorskom i zdravom tkivu. Na grafiku su prikazane srednja vrednost ($n = 10$), standardna greška i 95% intervala poverenja. Statistički je značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u tumorskom u odnosu na netumorsko tkivo ($p = 0.006$, zavisni t-test).

Figure 4. Specific activity of CAT in tumor (left) and normal (right) tissue sample. Graph shows mean ($n = 10$), standard error and 95% of confidence interval.



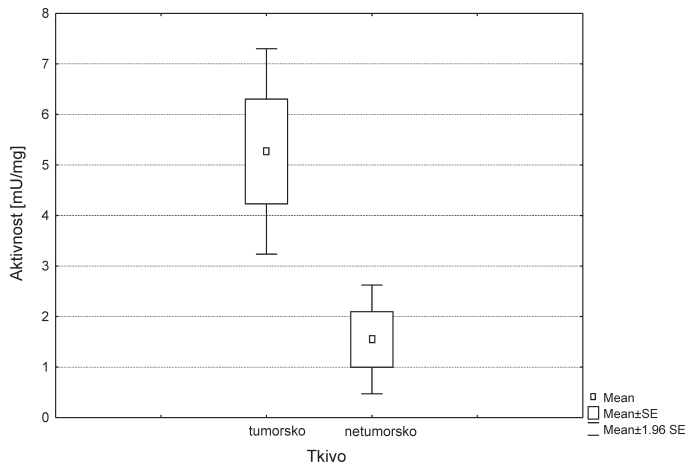
Slika 5. Aktivnost hem-POD u tumorskom i zdravom tkivu. Na grafiku su prikazane srednja vrednost ($n = 10$), standardna greška i 95% intervala poverenja.

Figure 5. Specific activity of hem-POD in tumor (left) and normal (right) tissue sample. Graph shows mean ($n = 10$), standard error and 95% of confidence interval.

Aktivnost hem-peroksidaze. Ovim istraživanjem dobijeno je zamearljivo malo povećanje aktivnosti hemperoksidaze (slika 5). Rezultati ranijih istraživanja nisu usaglašeni po pitanju aktivnosti ovog enzima kod različitih tumora. Utvrđeno je smanjenje aktivnosti hem-peroksidaze kod RCC (Oberley i Oberley 1997; Ganesamoni *et al.* 2012) i karcinoma dojke (Gilbert *et al.* 1986). Međutim, dostupni su i podaci o povećanoj aktivnosti ovog enzima u tumorskom tkivu (Bogdanović *et al.* 2008; Pražić *et al.* 2000). Uzevši u obzir da hem-peroksidaza deli supstrat sa glutation peroksidazom, potrebno je narednim istraživanjima uporediti aktivnosti ova dva enzima, kod većeg broja ispitanika.

Aktivnost glutation S-transferaze. Aktivnost GST (slika 6) u homogenatima tumorskog tkiva pacijenata je značajno snižena ($p = 0.01$) u odnosu na zdravo tkivo bubrega.

U tumorskom tkivu pacijenata zabeležena je značajno snižena aktivnost GST u odnosu na zdravo tkivo bubrega istih osoba, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima RCC (Muse *et al.* 1994; Simić *et al.* 2003,



Slika 6. Aktivnost GST u tumorskom i zdravom tkivu. Na grafiku su prikazane srednja vrednost ($n = 10$), standardna greška i 95% intervala poverenja. Statistički je značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u tumorskom u odnosu na netumorsko tkivo ($p = 0.01$, zavisni t-test).

Figure 6. Specific activity of CAT in tumor (left) and normal (right) tissue sample. Graph shows mean ($n = 10$), standard error and 95% of confidence interval.

2009), karcinoma pluća (Coursin *et al.* 1996) i kolorektalnog karcinoma (Seow *et al.* 2002).

Za razliku od zdravog tkiva, gde GST ima ulogu da spreči razvoj karcinoma, u tumorskom tkivu GST može dovesti do proliferacije i migracija maligno izmenjenih ćelija, učestvujući u inaktivaciji hemioterapijskih lekova (Hayes i Strange 1995). Smatra se da su tumori sa niskom stopom aktivnosti antioksidativnih enzima, uključujući i GST, osetljivi na hemio- i radioterapiju (Carmichael *et al.* 1988; Koberda i Hellman 1991). Međutim, CCRCC predstavlja jedan od najrezistentnijih tumora na dejstvo hemioterapeutika, iako pokazuje nisku aktivnost GST (Medeiros *et al.* 1988). Stoga se može pretpostaviti da se kod ovog tumora, kao i kod adenokarcinoma pluća koji pokazuje iste karakteristike enzimske aktivnosti, razvija neki drugi mehanizam rezistencije (Coursin *et al.* 1996).

Zaključak

Povišena količina slobodnih radikala i smanjena antioksidativna sposobnost tumorskog u poređenju sa zdravim tkivom pacijenata, ukazuju da se tumorsko tkivo nalazi pod dugotrajnim oksidativnim stresom koji može biti jedan od bitnih faktora pri nastanku i razvoju svetloćelijskog karcinoma bubrega.

Rezultati ovog rada upućuju da određivanje parametara oksidativnog stresa može imati važnu ulogu u dijagnostikovanju i lečenju svetloćelijskog karcinoma bubrežnih ćelija. Navedeni parametri su usko povezani sa gradusom ovog karcinoma, što ukazuje na to da bi se otkrivanjem u ranim fazama oboljenja i bogaćenjem antioksidativne odbrane (korekcijom ishrane, prestankom pušenja, farmaceutskim preparatima) mogao sprečiti razvoj i umanjiti posledice oboljenja (Pražić *et al.* 2000). Parametri oksidativnog stresa bi, uz dalja istraživanja, potencijalno mogli poslužiti i kao biomarkeri, što bi imalo direktnu primenu prilikom optimizacije lečenja, kao i određivanja terapijske efikasnosti i antioksidativnog potencijala primenjene terapije. Povećanjem broja uzoraka, kao i demografske

raznolikosti pacijenata (starost, dužina i tip lečenja, životne navike, gojaznost) u daljim istraživanjima, dobijeni rezultati bi mogli biti potvrđeni sa većom pouzdanošću.

Zahvalnost. Zahvaljujemo se mentoru, Anđelki Isaković, dr. med. sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na neizmernom strpljenju, podršci, stručnim savetima, kao i na svojoj energiji i trudu koje je uložila u realizaciju ovog istraživanja.

Posebnu zahvalnost dugujemo Ivanu Pavloviću i Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke Vinča, koji su nesebično ustupili uzorke kako bi ovo istraživanje bilo realizovano, kao i na svim korisnim savetima i sugestijama tokom izrade ovog rada.

Zahvalnost dugujemo i Milici Aleksić, saradnici sa seminara biologije, koja je svojim angažovanjem doprinela da praktični deo istraživanja bude sproveden na adekvatan način i u predviđenom vremenskom periodu.

Literatura

- Aldemir M., Karaguzel E., Okulu E., Gudeloglu A., Ener K., Ozayar A., Erel O. 2015. Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with renal cell carcinoma. *Central European Journal of Urology*, **68**: 415.
- Balasubramanian N., Subramanian S., Govindasamy S. 1994. Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix. *Cancer Letters*, **87**: 187.
- Baur G., Wendel A. 1980. The activity of peroxide metabolizing system in human colon carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **97** (3): 267.
- Beutler E. 1984. *Catalase: A Manual of Biochemical Methods in Red Cell Metabolism*. New York: Grune and Stratton
- Bize I., Oberley L., Morris H. 1980. Superoxide dismutase and superoxide radical in the Morris hepatomas. *Cancer Research*, **40**: 3686.
- Bogdanović V., Turšijan S., Đorđević M., Nikolić A., Mrđanović J., Jakimov D., Trajković V., Bogdanović G., Ivković-Kapicl T., Dugandžija T. 2008. Activity of lactate dehydrogenase and superoxide dismutase in the circulation of patients with breast carcinoma. *Archive of Oncology*, **16** (3-4): 39.
- Bojanić Z., Vujović J., Bojanić V., Stokanović D., Bojanić N., Dušović D., Đinđić N. 2010. Efekat lečenja metilprednizolonom i vitaminom C na koncentraciju malondialdehida kod bolesnika sa sistemskim Lupus eritematodesom. *Acta Medica Medianae*, **49** (4): 10.

- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248.
- Carmichael J., Crane J. M., Bunn P. A., Glatstein E., Ihde D. C. 1988. Results of therapeutic cranial irradiation in small cell lung cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, **14**: 455.
- Chance B., Sies H., Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Review*, **59** (3): 527.
- Chung-man H. J., Zheng S., Comhair S. A., Farver C., Erzurum S. C. 2001. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lungcancer. *Cancer Research*, **61**: 8578.
- Coleman M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J.M., De Angelis, R., Capocaccia, R., Baili, P., Rachet, B., Gatta, G., Hakulinen, T. and Micheli, A. 2008. Cancer Survival in Five Continents: A Worldwide Population-based Study (CONCORD). *The Lancet Oncology*, **9** (8): 730.
- Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, **17**: 1195.
- Coursin D. B., Cihla H. P., Sempf J., Oberley T. D., Oberley L. W. 1996. An immunochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histology and Histopathology*, **11**: 851.
- Dutcher J. P. 2013. Recent developments in the treatment of renal cell carcinoma. *Therapeutic Advances in Urology*, **5** (6): 338.
- Eble J. N., Sauter G., Epstein G. S., Sesterhenn I. A. (ur.) 2004. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IAR)
- Frederiks W. M., Bosch K. S., Hoehn K. A., Van Marle J., Langbein S. 2010. Renal cell carcinoma and oxidative stress: The lack of peroxisomes. *Acta Histochemica*, **112**: 364.
- Fang J., Seki T., Maeda H. 2009. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**: 290.
- Fuhrman S. A., Lasky L. C., Limas C. 1982. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, **6**: 655.
- Gago-Dominguez M., Castela J. E. 2006. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: Further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radical Biology & Medicine*, **40**: 721.

- Ganesamoni R., Bhattacharyya S., Kumar S., Chauhan A., Mete U., Agarwal M., Mavuduru R., Kaushik G., Mandal A., Singh S. 2012. Status of Oxidative Stress in Patients With Renal Cell Carcinom. *The Journal of Urology*, **187**: 1172.
- Gibananada R., Sanjay B., Nooton K. S., Suryanarayan D., Vinod R., Seetharaman A. 2000. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **59**: 63.
- Gilabert B. P., Zamora V. A., Oriola A. P., Ineba R. A., Martines O. T., Albadalejo V. C. 1986. Peroxidase activity and estradiol receptors in human breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, **155** (3): 201.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**: 7130.
- Hayes J. D., Strange R. C. 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radical Research*, **22** (3): 193.
- Hirose K., Longo D. L., Oppenheim J. J., Matsushima K. 1993. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB Journal*, **7** (2): 361.
- Keller J. M., Cable S., El Bouhtoury F., Heusser S., Scotto C., Armbruster L., Ciolek E. 1993. Peroxisome through cell differentiation and neoplasia. *Biology of the Cell*, **77**: 72.
- Klaunig J. E., Kamendulis L. M., Hocevar B. A. 2010. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, **38**: 96.
- Koberda J., Hellman A. 1991. Glutathione S-transferase activity of leukemic cells as prognostic factor for response to chemotherapy in acute leukemias. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy*, **8**: 35.
- Lauer C., Voekl A., Riedl S., Beier K. 1999. Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma. *Carcinogenesis*, **20** (6): 985.
- Lieshout E. M. M., Peters W. H. M. 1998. Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **19** (10): 1873.
- Litwin J. A., Beier K., Völkl A., Hofmann W. J., Fahimi H. D. 1999. Immunocytochemical investigation of catalase and peroxisomal lipid β -oxidation enzymes in human hepatocellular tumors and liver cirrhosis. *Virchow Archiv, European Journal of Pathology*, **435** (5): 486.

- Marklund S., Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxid dismutase. *European Journal of Biochemistry*, **47** (3): 469.
- Matoba T., Shimokawa H., Morikawa K., Kubota H., Kunihiro I., Urakami-Harasawa L., Mukai Y., Hirakawa Y., Akaike T., Takeshita A. 2003. Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular biology*, **23** (7): 1224.
- Medeiros L. J., Michie S. A., Johnson D. E., Warnke R. A., Weis L. M. 1988. An immunoperoxidase study of renal cell carcinomas: correlation with nuclear grade, cell type, and histologic pattern. *Human Pathology*, **19** (8): 980.
- Muse K. E., Oberley T. D., Sempf J. M., Oberley J. W., 1994. Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. *Histochemistry Journal*, **26** (9): 734.
- Oberley T. D., Oberley L. W. 1997. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histology and histopathology*, **12** (2): 525.
- Oberley T. D., Sempf J. M., Oberley L. W. 1996. Immunogold analysis of antioxidant enzymes in common renal cancers. *Histology and Histopathology*, **11**: 153.
- Portakal O., Ozkaya O., Erden Inal M., Bozan B., Kosan M., Sayek J. 2000. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clinical Biochemistry*, **33**: 279.
- Pražić B., Cvetković V., Petrović M., Antičić M. 2000. Procena oksidativnog stresa i antioksidativne odbrane kod nekih bolesti pluća. *Pneumon*, **38** (3-4): 127.
- Rimbach, G., Höhler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J. Packer, L. 1999. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr*, **52** (3): 203.
- Salganik R. I. 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *The Journal of American College Nutrition*, **20**: 464S.
- Sen C. K. 2001. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **33** (3): 368.
- Seow A., Yuan J-M., Sun C-L., Van Den Berg D., Lee H-P., Yu M. C. 2002. Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis*, **23** (12): 2055.

- Shi T., Dong F., Liou L. S., Duan C. H., Novick A. C., DiDonato J. A. 2004. Differential protein profiling in renal-cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, **40** (1): 47.
- Shindler J. S., Childs R. E., Bardsley W. G. 1976. Peroxidase from Human Cervical Mucus. The Isolation and Characterisation. *European Journal of Biochemistry*, **65**: 325.
- Simić T., Mimić-Oka J., Ille K., Dragičević D., Savić-Radojević A. 2003. Glutathione S-transferase isoenzyme profile in non-tumor and tumor human kidney tissue. *World Journal of Urology*, **20**: 385.
- Simić T., Savić-Radojević A., Plješa-Ercegovac M., Matić M., Mimić-Oka J. 2009. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nature Reviews Urology*, **6**: 281.
- Skrzydłewska E., Sulkowski S., Koda M., Zalewski B., Kanczuga-Koda L., Sulkowska M. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **11** (3): 403.
- Strassburger M., Bloch W., Sulyok L., Schüller J., Keist A., Schmidt A., Wenk J., Peters T., Wlaschek M., Krieg T., Hafner M., Kümín A., Werner S., Müller W., Scharffetter-Koschaneck K. 2005. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium *in vivo*. *Free Radical biology and Medicine*, **38** (11): 1458.
- Stone K., Ksebati M., Marnett L. J. 1990. Investigation of the adducts formed by reaction of malondialdehyde with adenosine. *Chemical Research in Toxicology*, **3**: 33.
- Yagi K. 1997. Female hormones act as natural antioxidants – a survey of our research. *Acta Biochimica Polonica*, **44** (4): 701.
- Yang A. H., Oberley T. D., Oberley L. W., Schmid S. M., Cummings K. B. 1987. In vitro modulation of antioxidant enzymes in normal and malignant renal epithelium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, **23** (8): 546.

Jelena Ljubičić and Milica Mihailović

Parameters of Oxidative Stress in Renal Cell Carcinoma

Oxidative stress caused by ageing, smoking, obesity and high blood pressure plays an important role in the formation and progress of renal cell carcinoma. This condition of disrupted equilibrium in the cell can lead to the accumulation of mutations in mitochondrial and nuclear DNA, and thus induce the progression of carcinoma and the formation of metastasis, as

well as the resistance to chemotherapy. The aim of this research was to analyse the parameters of oxidative stress in the samples of normal and tumor kidney tissue in patients suffering from renal cell carcinoma. The activities of enzymes that are the indicators of primary antioxidative protection have been measured, namely superoxide-dismutase (SOD), catalase (CAT) and hem-peroxidase (hem-POD), as well as the activity of glutathione S-transferase (GST), the indicator of secondary antioxidative protection. The concentration of malondialdehyde (MDA), that shows the level of lipid peroxidation, has also been measured. It has been shown that the activity of CAT and GST enzymes is reduced in tumor tissue relative to the normal kidney tissue, suggesting that the antioxidative ability of tumor cells is substantially lowered. The increased activity of SOD enzyme and elevated concentration of MDA show that the greater amount of free radicals is formed in tumor tissue. The increase in free radicals production and reduced antioxidative ability of tumor tissue relative to the normal tissue of the patients indicate that tumor tissue is in the long-lasting condition of oxidative stress, possibly a significant contributing factor in renal cell carcinoma pathogenesis.

