OKSIDATIVNI STRES SLUZNICE ŽELUCA U KRONIČNOM GASTRITISU

Terzić, Velimir

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:050198

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Velimir Terzić

OKSIDATIVNI STRES SLUZNICE ŽELUCA U KRONIČNOM GASTRITISU

Doktorski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Velimir Terzić

OKSIDATIVNI STRES SLUZNICE ŽELUCA U KRONIČNOM GASTRITISU

Doktorski rad

Osijek, 2017.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Dražen Švagelj, dr. med.

Rad je izrađen u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci.

Rad ima 52 lista.

ZAHVALA

Najiskrenije zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Draženu Švagelju, dr. med. na prenesenom znanju, iskrenoj podršci, razumijevanju i nesebičnoj pomoći. Bez vrijednih sugestija moga mentora, odabir teme, istraživanje i izrada ovoga doktorskoga rada bili bi mi neizmjerno teži.

Zahvalnost upućujem Hrvoju Jurkoviću, dipl. ing. med. lab. dijagn. i djelatnicima Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci na pomoći koju su mi pružili pri obradi materijala te Kristini Kralik, prof. na pomoći i savjetima prilikom statističke analize podataka.

Zahvalnost dugujem i doc. dr. sc. Jasni Dovhanj, koja na žalost više nije s nama, zbog uvođenja u problematiku kojom se bavi ovaj doktorski rad.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA III

POPIS SLIKA IV

POPIS TABLICA V

1. UVOD 1

2. HIPOTEZA 8

3. CILJ ISTRAŽIVANJA 9

4. MATERIJAL I METODE 10

4.1. USTROJ STUDIJE 10

4.2. ISPITANICI (MATERIJAL) 11

4.3. METODE ISTRAŽIVANJA 12

4.3.1. Histopatologija 12

4.3.2. Imunohistokemija 12

4.3.3. Protokol istraživanja 13

4.3.4. Statističke metode 14

5. REZULTATI 16

6. RASPRAVA 32

6.1. UVOD U RASPRAVU 32

6.2. TIJEK RASPRAVE I KOMENTAR 33

7. ZAKLJUČCI 37

8. SAŽETAK 39

9. SUMMARY 41

10. LITERATURA 43

11. ŽIVOTOPIS 51

POPIS KRATICA

ATP	adenosine triphosphate	adenozin trifosfat
CAT	catalase	katalaza
Cu, Zn-SOD	copper, zinc superoxide dismutase	bakar, cink superoksid dizmutaza
DNA	deoxyribonucleid acid	deoksiribonukleinska kiselina
ECSOD	extracellular SOD	izvanstanična SOD
GPX	glutathione peroxidase	glutation peroksidaza
GRED	glutathione reductase	glutation reduktaza
GSH	glutation	glutation
GSSG	glutathione disulfide	glutation disulfid
GST	glutathione S-transferase	glutation S-transferaza
HP	Helicobacter pylori	Helicobacter pylori
Mn-SOD	manganese superoxide dismutase	mangan superoksid dizmutaza
ROS	reactive oxygen species	reaktivni radikali kisika
SOD	superoxide dismutase	superoksid dizmutaza
SOD1	superoxide dismutase one	superoksid dizmutaza jedan
SOD2	superoxide dismutase two	superoksid dizmutaza dva
SOD3	superoxide dismutase three	superoksid dizmutaza tri
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine	8-hidroksi-2-deoksigvanozin
8-OHGua	8-hydroxyguanine	8-hidroksigvanin

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Shematski prikaz sastavnica oksidativnog stresa i posljedica 3

Slika 5.1. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (kontrola vs. pozitivni (++/+++)) 25

Slika 5.2. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (kontrola vs. pozitivni (++)) 27

Slika 5.3. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (kontrola vs. pozitivni (+++)) 29

Slika 5.4. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (pozitivni (++) vs. pozitivni (+++)) 31

POPIS TABLICA

Tablica 5.1. Pacijenti prema spolu i dobi.....16

Tablica 5.2. Raspodjela pacijenata prema imunoreaktivnosti Mn-SOD i biomarkera 8-OHdG u antrumu prema skupinama pacijenata.....17

Tablica 5.3. Raspodjela pacijenata prema imunoreaktivnosti Mn-SOD i biomarkera 8-OHdG u korpusu prema skupinama pacijenata.....18

Tablica 5.4. Raspodjela pacijenata prema podjeli imunoreaktivnosti Mn-SOD u antrumu i korpusu prema skupinama ispitanika.....20

Tablica 5.5. Raspodjela pacijenata (umjereni kronični gastritis ili teški kronični gastritis) prema podjeli imunoreaktivnosti Mn-SOD u antrumu i korpusu.....21

Tablica 5.6. Raspodjela pacijenata (s umjerenim kroničnim gastritisom ili teškim kroničnim gastritisom) prema podjeli imunoreaktivnosti biomarkera 8-OHdG u antrumu i korpusu.....22

Tablica 5.7. Raspodjela pacijenata (umjereni kronični gastritis ili teški kronični gastritis) prema podjeli imunoreaktivnosti biomarkera 8-OHdG u antrumu i korpusu.....23

Tablica 5.8. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između kontrolne skupine i ispitanika s kroničnim gastritisom (++/+++).....24

Tablica 5.9. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između kontrolne skupine i pacijenata s umjerenim kroničnim gastritisom (++).....26

Tablica 5.10. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između kontrolne skupine i pacijenata s teškim kroničnim gastritisom (+++).....28

Tablica 5.11. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između pacijenata s umjerenim kroničnim gastritisom (++) i pacijenata s teškim kroničnim gastritisom (+++).....30

1. UVOD

Oksidativni stres je stanje u kojem oksidativni procesi prevladaju antioksidativne sposobnosti stanice. U osnovi su uzroci nastanka oksidativnog stresa povećano stvaranje reaktivnih toksičnih spojeva, slobodnih radikala ili gubitak, smanjenje razine antioksidanasa. Pod pojmom slobodnih radikala najvećim dijelom smatramo reaktivne spojeve kiska (ROS, eng. Reactive oxygen species) i reaktivne spojeve dušika. Obilježje svih slobodnih radikala je nesparen elektron ili više njih u vanjskoj ljusci (1) te nestabilnost, što ima za posljedicu sklonost ulaska u različite reakcije. Njihovi nespareni elektroni uzrok su davanja ili uzimanja elektrona drugim molekulama, čineći ih izrazito nestabilnim i visoko reaktivnim, pri čemu reagiraju s organskim ili anorganskim spojevima (2). Štetni učinci citotoksičnih reaktivnih molekula kisika, slobodnih radikala kisika, reaktvnih intermedijera kisika i oksiradikala određuju potencijalnu toksičnost samoga kisika. Izrazitu važnost u oksidativnom stresu imaju rezultati redukcije molekularnog kisika u formama superoksidnog aniona, vodikovog peroksida i hidroksi radikala. Navedene forme imaju svojstvo izuzetno reaktivnih oksidanasa te mogu reagirati sa ugljikohidratima, lipidima, molekulama proteina, DNA.

Posljedično, javljaju se poremećaji u smislu inaktivacije membranskih enzima, ubrzane proteolize, smetnje u prijenosu signala u stanicama, maligna transformacija te u konačnici i smrt same stanice (3, 4). U slučaju pojave disbalansa između nastajanja i uklanjanja reaktivnih spojeva kisika, suvišak istih može izazvati oštećenja staničnih lipida, proteina ili DNA, što dovodi do poremećaja njihove normalne funkcije (5). Reaktivni spojevi kisika mogu djelovati na membranske proteine i na propusnost stanične membrane. Jasno je da povećanje koncentracije slobodnih radikala u stanicama ima štetne posljedice, no može djelovati i pogubno ukoliko njihova visoka koncentracija perzistira dulje vremena ili ako se povećanje koncentracije ponavlja. Nasuprot tome, bolja proliferacija limfocita i pojačana sinteza imunoglobulina javlja se nakon pada koncentacije reaktivnih spojeva kisika, što ukazuje da niže vrijednosti reaktivnih spojeva kisika djeluju pozitivno na imunost.

Oksidativni stres nastaje kao rezultat poremećaja ravnoteže oksidacijsko – redukcijskih procesa prekomjernim stvaranjem slobodnih radikala kisika koje stanični homeostatski mehanizmi nisu u mogućnosti neutralizirati (6-8). Tri su čimbenika koja rezultiraju pojavom

oksidativnoga stresa u stanicama. Prvo je povećano nastajanje reaktivnih spojeva kisika. Drugo je smanjenje antioksidativne zaštite, bilo da se radi o nemogućnosti neutralizacije utjecaja reaktivnih spojeva kisika ili njihovog uklanjanja. Treće je nemogućnost popravka oksidativnog oštećenja. Reaktivni spojevi kisika mogu biti reaktivni anioni koji sadrže kisikove atome, slobodni radikali, molekule koje sadrže kisikove atome koji mogu stvarati slobodne radikale ili se pomoću njih kemijski aktivirati. Alkoksil i peroksil radikali, molekule vodikovog peroksida i hipoklorne kiseline također se ubrajaju u reaktivne spojeve kisika. Aerobna respiracija je glavni izvor reaktivnih spojeva kisika in vivo. Osim toga, reaktivni spojevi kisika mogu nastajati i peroksisomalnom B-oksidacijom masnih kiselina, mikrosomalnim citokrom P450 metabolizmom ksenobiotika, stimulacijom fagocita patogenima ili lipopolisaharidima, metabolizmom arginina i tkivno specifičnih enzima.

Kemijske reakcije unutar svake stanice uključuju oksidaciju i redukciju molekula. Korištenjem kisika, od strane stanica, za proizvodnju energije kao posljedica proizvodnje ATP u mitohondrijima nastaju slobodni radikali.

Nivo reaktivnih spojeva kisika usko je vezan uz samu potrošnju kisika i u proporcionalnom je odnosu sa količinom mitohondrija u tkivu. Pri fiziološkim vijednostima koncentracije kisika, u jetri štakora, do 4% utrošenog kisika prijeđe u superoksid (O2-) i vodikov peroksid (H2O2) na razini mitohondrija, a kao posljedica gubitka elektrona (5). Dugo zadržavanje vodikovog peroksida i superoksida u tkivima, kao i činjenica da iz njih nastaje izrazito reaktivni hidroksi radikal (.OH) čini ih važnim elementima samoga oksidativnog stresa. Visoko reaktivni hidroksi radikal sudjeluje u brojnim oblicima oštećenja staničnih makromolekula.

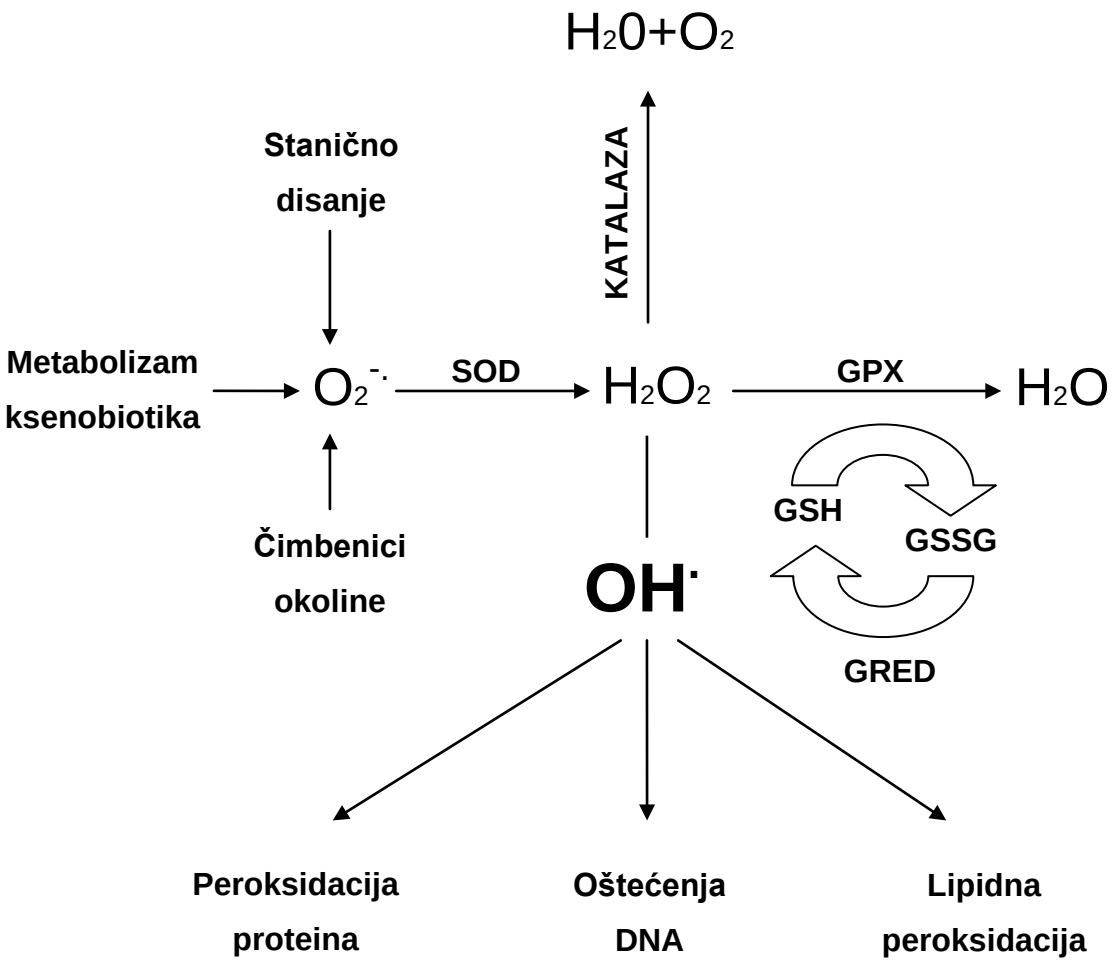
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ superoksid

$O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ vodik peroksid

$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + {}^{\cdot}OH$ hidroksi radikal

Kako je već navedeno, reaktivni spojevi kisika mogu se akumulirati kao posljedica brojnih fizioloških i nefizioloških procesa, između ostaloga i kao nusprodukt normalnog staničnog metabolizma prvenstveno u mitohondrijima. Imaju sposobnost oštećenja svih vrsta

biomolekula bilo da se radi o membranskim lipidima i nezasićenim masnim kiselinama, proteinima ili DNA.



Slika 1.1. Shematski prikaz sastavnica oksidativnog stresa i posljedica

U smislu neutralizacije toksičnih učinaka reaktivnih spojeva kisika postoji učinkovit sustav antioksidativne obrane (9). Sustav obuhvaća antioksidativne enzime kao što su: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation proksidaza (GPX), glutation S-transferaza (GST) i glutation reduktaza, koji su nužni u procesu prevođenja radikala do nereaktivnih molekula. Osim antioksidativnih enzima, u sustavu antioksidativne obrane su i nisko-molekularni antioksidansi kao glutatioβ-karoten (vitamin A), askorbinska kiselina (vitamin C), α-tokoferol (vitamin E), koji isto sudjeluju u procesu uklanjanja oksiradikala (10). Stanični antioksidativni enzimi glutation peroksidaza i superoksid dizmutaza imaju glavnu ulogu u kontroli nivoa reaktivnih spojeva kisika (11) te su zbog toga enzimski pokazatelji oksidativnog stresa.

Detekcija prisustva slobodnih radikala u organizmu može se izvesti i preko krajnjih produkata lančane reakcije, obzirom da im je vrijeme poluživota znatno dulje nego kod slobodnih radikala, pa su samim time dostupniji kvantifikaciji. Iz toga razloga jedan od važnih biljega oksidativnog stresa je lipidna peroksidacija ili oksidacija nezasićenih masnih kiselina. Kao neenzimatski pokazatelj oksidativnog stresa može se smatrati i oksidacija proteina i nastajanje karbonil proteina (12, 13). Prednost određivanja količine karbonilnih skupina proteina kao biljega oksidativnog stresa, u usporedbi s mjerenjem drugih oksidacijskih produkata, je u njihovoj relativno ranoj pojavnosti i stabilnosti (14).

U istraživanju, predmetom interesa bile su upalne promjene želučane sluznice u smislu kroničnoga gastritisa. Kronična infekcija i upalni odgovor tkiva smatraju se čimbenicima rizika za razvoj neoplazmi. Najznačajnija karakteristika upalnoga odgovora tkiva koji je potaknut kroničnom infekcijom je obimna mobilizacija fagocita, posebno neutrofila na mjesto upale. Pristigli fagociti prožimaju tkivo, stvaraju različite slobodne radikale kisika i slobodne radikale dušika putem kojih ubijaju ciljne stanice, ali i oštećuju važne stanične biomolekule. Opće je poznato sudjelovanje slobodnih radikala kisika u destrukciji tkiva tijekom upalnoga procesa (15). Temeljni mehanizam destrukcije tkiva uzrokovanog upalom je oksidativni stres putem slobodnih radikala. Nastajanje samoga slobodnog radikala kisika uvjetovano je prihvatom elektrona od strane molekularnoga kisika. Ključnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala kisika imaju upravo enzimi superoksid dizmutaze (SOD) kroz proces dizmutacije superoksida u kisik i vodikov peroksid (16, 17).

$2O2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow (SOD)\ \ H2O2 + O2$

Vodikov peroksid se nakon toga detoksificira pomoću katalaze i glutation peroksidaze.

Superoksid dizmutaze su jedne od najefikasnijih intracelularnih enzimatskih anioksidanata. Poznato je pet različitih izoformi SOD enzima, no u sisavaca su prisutna u tri oblika.

Cu, Zn-SOD (bakar, cink superoksid dizmutaza) nalazimo u citosolu (18), intermembranskom prostoru mitohondrija (19) i u jezgri (20). Ova izoforma se još označava i kao SOD1.

Mn-SOD (mangan superoksid dizmutaza) nalazimo u matriksu mitohondrija (19, 21) a označava se još i kao SOD2.

ECSOD (extracellular SOD) je lokalizirana u izvanstaničnom prostoru gdje je najveći dio vezan za glikozaminoglikane u tkivnom intersticiju (22, 23). Manji dio je pronađen i u plazmi te drugim izvanstaničnim tekućinama (24). Ova izoforma poznata je još i kao SOD3.

Mn-SOD je protein (metaloenzim) čiji je gen kod ljudi smješten na petom kromosomu. Mn-SOD je homotetramer koji sadrži dva do četiri atoma mangana u aktivnim mjestima enzimskih podjedinica i nalazimo ga kod svih aerobnih organizama. Pod utjecajem poglavito oksidativnoga stresa te još nekoliko čimbenika kao što su upalni citokini, proteini bakterija i faktori rasta dolazi do indukcije mangan superoksid dizmutaze (Mn-SOD) (25, 26). Nepotpunom redukcijom molekule kisika u vodu dolazi do nastanka slobodnih radikala kisika, koji su prepoznati kao medijatori staničnoga oštećenja u raznim patofiziološkim stanjima uključujući i malignu transformaciju (27, 28).

Poznato je da slobodni radikali koji nastaju u upalno promijenjenom tkivu mogu uzrokovati oštećenja stanice, oštećenja DNA, koja mogu u znatnoj mjeri pridonijeti razvoju tumora (29-32). Upalne stanice na mjestu upalnoga procesa oslobađaju slobodne radikale kisika (33). Molekule kisika koje prime elektron postaju slobodni radikali koji prelaze u vodikov peroksid spontanom dizmutacijom ili enzimskom konverzijom superoksid dizmutazom (34). Upalne stanice u akutnome i kroničnome upalnome procesu oslobađaju medijatore upale kao što su slobodni radikali kisika, dušični monoksid i citokine upale, koji svi zajedno pridonose oštećenju tkiva želuca (35, 36). Kronična upalna reakcija je značajni mutageni čimbenik (37,

38) djelujući putem oslobađanja radikala dušikovog oksida, a preko aktiviranih stanica upale (39).

Povišena razina mangan superoksid dizmutaze (Mn-SOD) djeluje protektivno na zdravo tkivo u smislu zaštite od posljedica oksidativnog stresa (40).

Noguchi i sur. (41) su opisali postojanje imunoreaktivnosti u CD68 pozitivnim makrofagima u blizini vrata foveolarnih žlijezda, a nivo ekspresije Mn-SOD-a je pokazao značajnu korelaciju sa stupnjem upalnoga procesa u želučanoj sluznici. U bolestima želuca uočene su značajne promijene u aktivnosti i ekspresiji superoksid dizmutaze. Poznata je značajno promijenjena intracelularna vrijednost Mn-SOD-a kod neoplazmi u usporedbi sa zdravim tkivom (42-46). Dok je točan razlog odnosa između dinamike rasta tumora i razine aktivnosti intracelularnoga Mn-SOD-a još uvijek nejasan, navedeno bi ukazivalo da smanjena ekspresija superoksid dizmutaze može biti promotor tumorskoga rasta. Štoviše, u tom slučaju Mn-SOD bi se mogao smatrati i tumor supresorom (47).

Većina istraživanja dovodi u korelaciju ekspresiju Mn-SOD-a i zlućudne novotvorine želuca (42, 44, 48-51), no malo je poznata promjena ekspresije kod pacijenata s kroničnim gastritisom. Procjena mogućih promjena aktivnosti Mn-SOD-a tijekom kronične upale sluznice želuca, a u korelaciji sa patohistološkom slikom, mogla bi biti važna zbog pravilnog razvrstavanja pacijenata u smislu povišenoga rizika od nastanka karcinoma želuca, kao jedne od posljedica kroničnoga upalnoga procesa.

Kako je već ranije navedeno, slobodni radikali kisika, ali i dušika mogu imati značajnu ulogu u inicijaciji i promociji karcinogeneze uzrokovanjem specifičnih oksidativnih oštećenja DNA.

Godine 1984. Kasai i Nashimura otkrili su biomarker 8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine). Interakcijom hidroksilnog radikala (HO·) s bazom DNA gvaninom dolazi do stvaranja 8-OHGua (C8-hydroxyguanina) ili njegove nukleozidne forme 8-OHdG. Iako i druge DNA baze ulaze u reakciju s hidroksilnim radikalima na sličan način, sinteza 8-OHdG je najzastupljenija iz razloga razmjerno lake provedivosti (52).

Od svoga otkrića, kroz brojna istraživanja 8-OHdG se etablirao kao osjetljiv i učestalo korišten biomarker koji ukazuje na endogeno oksidativno oštećenje DNA (baze gvanina ili nukleozida gvanozina) hidroksilnim radikalima (53).

2. HIPOTEZA

Na temelju preliminarnog istraživanja pod nazivom Differential mucosal activity of two superoxide dismutase isoforms in chronic gastritis, u kojem se pokazalo da je ekspresija Mn-SOD-a različita kod bolesnika s istom patohistološkom slikom kronične upale želučane sluznice (54), postavljena je hipoteza za doktorat:

- ekspresija Mn-SOD-a, kao i 8-OHdG-a u tkivu sluznice želuca povezana je sa stupnjem upale želučane sluznice
- pri patohistološki određenom, istom intenzitetu upale želučane sluznice moguća je različita ekspresija Mn-SOD-a, kao i 8-OHdG-a.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja je pokazati ekspresiju Mn-SOD-a i 8-OHdG-a imunohistokemijskom metodom u tkivu sluznice želuca kod kroničnog gastritisa, a bez drugih patohistoloških promjena te utvrditi moguću povezanost s patohistološkom dijagnozom.

U slučaju potvrde hipoteza ovoga istraživanja, Mn-SOD i 8-OHdG mogli bi se smatrati važnim biomarkerima, koji bi ukazivali na povećanu mogućnost maligne alteracije, dok ona još nije vidljiva patohistološki. Takva spoznaja bi također pridonijela boljem razumijevanju patofizioloških procesa pri nastanku novotvorina.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Studija je ustrojena kao presječna retrospektivna.

Za potrebe ovog istraživanja izvršen je uvid u arhivske protokole biopsija Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci.

Nakon pregleda svih protokola za pojedinu godinu, kriterij za izdvajanje arhivskog materijala bio je: osobe muškoga i ženskoga spola iznad osamnaest godina starosti kod kojih je utvrđena kronična upala želučane sluznice u antrumu i korpusu, bez drugih promjena. Pacijenti s pozitivnom Helicobacter pylori (HP) infekcijom nisu bili uključeni u ovo istraživanje. S obzirom da je istraživanje izvedeno retrospektivno, a korišten je bioptički materijal dobiven prvenstveno ambulantnim putem, nije bilo moguće ostvariti uvid u podatke o ostalim dijagnozama pacijenata u vrijeme uzorkovanja bioptičkoga materijala, kao niti navikama.

Pacijenti su bili isključeni iz istraživanja u slučaju kada je njihov bioptički materijal bio nedostatan za kvalitetnu imunohistokemijsku analizu.

S obzirom da se u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci prosječno godišnje učini oko 1500 endoskopskih pretraga želuca sa uzimanjem bioptičkih uzoraka tkiva, a od toga je u prosjeku pet do šest onih kod kojih se uočava teška i srednje teška kronična upala bez drugih patohistoloških promjena, smatrali smo opravdanim da u ovom istraživanju uzorak bude 35 pacijenata s teškom i 35 pacijenata sa srednje teškom kroničnom upalom, a bez drugih patohistoloških promjena.

Ovim istraživanjem nisu obuhvaćeni pacijenti koji su imali samo kronični gastritis (mononuklearne stanice, rijetko = +) iz razloga što pri blagoj kroničnoj upali želučane sluznice nije za očekivati znatnije kompromitiranje obrane od oksidativnoga stresa. Isto ne bi rezultiralo promjenama koje bi se mogle jasno imunohistokemijski prikazati.

Iz istih arhivskih protokola izdvojeni su i oni pacijenti kod kojih nisu nađene promjene na želučanoj sluznici te su se ti materijali koristili u svrhu kontrolne skupine, koja je brojala 38 pacijenata.

Arhivski materijal obuhvatio je uzorke tkiva koji su dobiveni endoskopskim pregledom, kojemu su pacijenti bili podvrgnuti zbog simptoma vezanih za gornji gastrointestinalni trakt.

Svi uzorci tkiva obrađeni su imunohistokemijski i nakon toga analizirani od dva neovisna patologa. Nalazi obaju patologa upisani su u bazu podataka, a nakon toga učinjena je obrada podataka i statistička analiza.

4.2. ISPITANICI (MATERIJAL)

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 108 pacijenata. Za opažanje većih razlika uz razinu značajnosti 0,05 i snagu testa od 80% minimalno je potrebno 96 ispitanika. Od ukupnoga broja, 70 su bili pacijenti koji imaju samo kroničnu upalu želučane sluznice, dok je preostalih 38 pacijenata, kod kojih nisu nađene patohistološke promjene u želučanoj sluznici, činilo kontrolnu skupinu.

Pacijenti su bili klasificirani temeljem njihovih histopatoloških nalaza i podijeljeni u tri skupine:

Skupina I: 35 pacijenata koji su imali samo umjereni kronični gastritis (mononuklearne stanice, umjereno = ++).

Skupina II: 35 pacijenata koji su imali samo teški kronični gastritis (mononuklearne stanice, izraženo = +++).

Skupina III: 38 pacijenata koji su imali normalnu histološku sliku.

4.3. METODE ISTRAŽIVANJA

4.3.1. Histopatologija

Izraženost kroničnog gastritisa stupnjevana je patohistološki prema Sydney sustavu. Primarna Sydney klasifikacija iz 1990. godine revidirana je u Houstonu 1994. godine. Revizija je pridonijela boljem razlikovanju tipova gastritisa (neatrofični, atrofični) te detaljnijem stupnjevanju promjena u samoj morfologiji (55-57).

Prema revidiranoj Sydney klasifikaciji gastritisi se dijele na akutne, kronične i one s posebnim obilježjima.

Patohistološki se analizira: etiologija (HP i ostalo), topografija (korpusni gastritis, antralni gastritis, pangastritis), morfologija (HP prisutan ili odsutan, vrsta i količina upalnog infiltrata te atrofija, metaplazija i displazija sluznice).

Svaki uzorak želučane sluznice za pojedine morfološke kriterije (Helicobacter pylori, akutna i kronična upala, intestinalna metaplazija i atrofija) se semikvantitativno klasificira u četiri stupnja (odsutno, rijetko, umjereno, izraženo).

4.3.2. Imunohistokemija

Za procjenu rezultata bojanja upotrijebljena je klasifikacija rezultata imunohistopatološkoga bojanja za Mn-SOD (41):

- \- bez pozitivne imunoreaktivnosti
- \+ žarišno pozitivna imunoreaktivnost
- ++ žarišno pozitivna do na širokom području pozitivna imunoreaktivnost
- +++ na širokom području pozitivna imunoreaktivnost

Za procjenu rezultata bojanja upotrijebljena je klasifikacija rezultata imunohistopatološkoga bojanja za 8-OHdG (58):

- bez pozitivne imunoreaktivnosti
+ slabo pozitivna imunoreaktivnost
++ umjereno pozitivna imunoreaktivnost
+++ intenzivno pozitivna imunoreaktivnost

4.3.3. Protokol istraživanja

Bioptički materijal je fiksiran u 4% puferiranom formaldehidu, pro analysi, Claro-prom d.o.o.. Obrada bioptičkog materijala je provedena u Sakura Tissue-Tek VIP 6 vakumskom uređaju za obradu biološkog materijala. Nakon biološke obrade materijal je uklopljen u Histosec pastile, Merck KGaA i izrezan u rezove debljine ~3 mikrona za standardno hemalaun eozin bojanje i za imunohistokemijsko bojanje.

Izrezani preparati borave u termostatu 30 minuta na temperaturi od 60 ^{0}C.

Preparati izrezani za standardno hemalaun eozin bojanje, bojaju se u Sakura Tissue-Tek Prisma uređaju za automatsko bojanje preparata i pokrivaju filmom tvrtke Sakura Tissue-Tek u uređaju za automatsko pokrivanje stakala Sakura Tissue-Tek Film. Postupak bojanja hemalaun eozin se sastoji od dva urona po 5 minuta u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek, jednog urona od 5 minuta u 2-propanol, Ph. Eur.,Gram-Mol d.o.o., jednog urona od 5 minuta u 96% etanol, Ph. Eur., Claro-Prom d.o.o., jednog urona od 5 minuta u 70% etanol, ispiranja u vodovodnoj vodi od 2 minute, bojanja u Mayers hemalaun solution, Merck KGaA 5 minuta, ispiranja u vodovodnoj vodi od 2 minute, jednog urona od 5 sekundi u limunsku kiselinu, kratkog ispiranja u vodovodnoj vodi, jednog urona od 5 sekundi u borax, kratkog ispiranja u vodovodnoj vodi, bojanju u Eosinu G, Merck KGaA od 4 minute, ispiranja u vodovodnoj vodi od 3 minute, dva urona po 2 minute u 96% etanol, Ph. Eur., Claro-Prom

d.o.o., dva urona po 5 minuta u 2-propanol, Ph. Eur.,Gram-Mol d.o.o., i dva urona po 5 minuta u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek.

Preparati za imunohistokemijsko bojanje, nakon boravka u termostatu, prolaze alkoholni niz do vode u Sakura Tissue-Tek Prisma uređaju za automatsko bojanje preparata. Taj postupak se sastoji od dva urona po 5 minuta u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek, jednog urona od 5 minuta u 2-propanol, Ph. Eur.,Gram-Mol d.o.o., jednog urona od 5 minuta u 96% etanol, Ph. Eur., Claro-Prom d.o.o., jednog urona od 5 minuta u 70% etanol i završava u vodovodnoj vodi. Nakon toga slijedi tretman u Dako PT Linku. U Dako PT Linku preparati su postupno zagrijani u Dako Target Retrieval Solution, visokog pH sa 65 ^{0}C na 95 ^{0}C, gdje su zadržani 20 minuta, nakon čega se postupno hlade do 65 ^{0}C.

Uzorci se izvade iz Dako Target Retrieval Solution, visokog pH i drže u EnVision FLEX wash buffer-u do bojanja u Dako Autostainer Link 48. Preparati se bojaju s Dako EnVison FLEX kitom. Postupak se sastoji od tretitanja uzoraka sa Peroxidasa-Blocking Reagent 5 minuta, ispiranja EnVision FLEX wash buffer, tretiranja primarnim antitijelom Anti-Superoxide Desmutasom (Mn-SOD) Sigma-Aldrich, Co., odnosno 8-OHdG (15A3): sc-66036 Santa Cruz Biotehnology, Inc. 20 minuta, ispiranja EnVision FLEX wash buffer, tretiranja Labelled Polymerom EnVision FLEX/HRP 20 minuta, ispiranja EnVision FLEX wash buffer, tretiranja DAB+ Chromogenoma, ispiranja EnVision FLEX wash buffer i bojanjem EnVision FLEX Hematoxylinom. Preparati se pokrivaju filmom tvrtke Sakura Tissue-Tek u uređaju za automatsko pokrivanje stakala Sakura Tissue-Tek Film.

Uzorke su pregledali i dali procjenu rezultata dva neovisna patologa.

4.3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike među kategorijskim varijablama testirale su se Hi-kvadrat testom. Numerički podatci su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između tri nezavisne

skupine testirane su zbog odstupanja od normalne raspodjele Kruskal Wallisovim testom. ROC (engl. Receiver Operating Characteristic) analiza primijenjena je za određivanje optimalne granične vrijednosti, površine ispod ROC krivulje (engl. area under the curve, AUC), specifičnosti i osjetljivosti ispitivanih parametara, s obzirom na izraženost mononuklearnih stanica. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na Alpha = 0,05.

Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc (inačica 16.2.0, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 108 pacijenata, od kojih je 38 (35,2 %) muškaraca i 70 (64,8 %) žena. Središnja dob (medijan) pacijenata je 54 godine s pripadnim interkvartilnim rasponom od 36 do 65 godina. Značajno su stariji pacijenti s kroničnim gastritisom (mononuklearne stanice izraženo) središnje dobi 64 godina, s pripadnim interkvartilnim raspon od 43 do 74 godine (Kruskal Wallis test, P = 0,03) (Tablica 5.1.).

Tablica 5.1. Pacijenti prema spolu i dobi

	Kontrolna skupina	++ kronični gastritis (mononuklearne stanice umjereno)	+++ kronični gastritis (mononuklearne stanice izraženo)	Ukupno	P
Spol [N (%)]					
Muškarci	11 (28,9)	11 (31,4)	16 (45,7)	38 (35,2)	0,28*
Žene	27 (71,1)	24 (68,6)	19 (54,3)	70 (64,8)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	
Dob pacijenata [Medijan (interkvartilni raspon)]	47 (27 - 60)	54 (39 - 62)	64 (43 - 74)	54 (36 - 65)	**0,03**†

*Hi kvadrat test; †Kruskal Wallis test

Korišteni su uzorci tkiva sluznice želuca 108 pacijenata, od kojih je 38 (35,2%) onih koji su imali normalnu histološku sliku (kontrolna skupina), 35 (32,4%) pacijenata koji su imali samo umjereni oblik kroničnog gastritisa (mononukleari ++) i 35 (32,4%) pacijenata koji su imali samo teški oblik kroničnog gastritisa (mononukleari +++).

Pozitivna imunoreaktivnost Mn-SOD u antrumu je kod 54 (50%) pacijenata, značajno najčešće kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom (Hi-kvadrat test, P < 0,001).

Od 18 (16,7%) pacijenata kojima je pozitivna imunoreaktivnost na biomarker 8-OHdG u antrumu značajno je više onih koji imaju teški kronični gastritis (Hi-kvadrat test, P < 0,001) (Tablica 5.2.).

Tablica 5.2. Raspodjela pacijenata prema imunoreaktivnosti Mn-SOD i biomarkera 8-OHdG u antrumu prema skupinama pacijenata

Antrum	Broj (%) pacijenata				P*
	Kontrolna skupina	++ umjereni kronični gastritis	+++ teški kronični gastritis	Ukupno	
Mangan superoksid dizmutaza u antrumu (Mn-SOD)					
Bez pozitivne imunoreaktivnosti	33 (86,8)	14 (40)	7 (20)	54 (50)	**<0,001**
Pozitivna imunorekativnost	5 (13,2)	21 (60)	28 (80)	54 (50)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	
Biomarker 8-OHdG u antrumu					
Bez pozitivne imunoreaktivnosti	38 (100)	32 (91,4)	20 (57,1)	90 (83,3)	**<0,001**
Pozitivna imunorekativnost	0	3 (8,6)	15 (42,9)	18 (16,7)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	

*Hi kvadrat test

Pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD u korpusu je kod 29 (26,9%) pacijenata, značajno najčešće kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom, njih 19 (54,3%) (Hi-kvadrat test, P < 0,001). Od 10 (9,3%) pacijenata kojima je pozitivna imunoreaktivnost na biomarker 8-OHdG u korpusu značajno je više onih koji imaju teški kronični gastritis (Hi-kvadrat test, P < 0,001), njih 9 (25,7%) (Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Raspodjela pacijenata prema imunoreaktivnosti Mn-SOD i biomarkera 8-OHdG u korpusu prema skupinama pacijenata

Korpus	Broj (%) pacijenata				P*
	Kontrolna skupina	++ umjereni kronični gastritis	+++ teški kronični gastritis	Ukupno	
Mangan superoksid dizmutaza u korpusu (Mn-SOD)					
bez pozitivne imunoreaktivnosti	38 (100)	25 (71,4)	16 (45,7)	79 (73,1)	**<0,001**
pozitivna imunorekativnost	0	10 (28,6)	19 (54,3)	29 (26,9)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	
Biomarker 8-OHdG u korpusu					
bez pozitivne imunoreaktivnosti	38 (100)	34 (97,1)	26 (74,3)	98 (90,7)	**<0,001**
pozitivna imunorekativnost	0 (0)	1 (2,9)	9 (25,7)	10 (9,3)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	

*Hi kvadrat test

Pacijenti s teškim kroničnim gastritisom značajnije češće imaju žarišno pozitivnu imunoreaktivnost Mn-SOD u antrumu (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) ili u korpusu (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) do na širokom ili na širokom području, dok je kontrolna skupina većinom bez pozitivne imunoreaktivnosti (Tablica 5.4.).

Tablica 5.4. Raspodjela pacijenata prema podjeli imunoreaktivnosti Mn-SOD u antrumu i korpusu prema skupinama ispitanika

	Broj (%) pacijenata				P*
	Kontrolna skupina	++ umjereni kronični gastritis	+++ teški kronični gastritis	Ukupno	
Mangan superoksid dizmutaza u antrumu					
bez pozitivne imunoreaktivnosti	33 (86,8)	14 (40)	7 (20)	54 (50)	
žarišno pozitivna imunoreaktivnost	5 (13,2)	14 (40)	10 (28,6)	29 (26,9)	
žarišno pozitivna imunoreaktivnost do na širokom području	0	5 (14,3)	6 (17,1)	11 (10,2)	**<0,001**
na širokom području pozitivna imunoreaktivnost	0	2 (5,7)	12 (34,3)	14 (13)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	
Mangan superoksid dizmutaza u korpusu					
bez pozitivne imunoreaktivnosti	38 (100)	25 (71,4)	16 (45,7)	79 (73,1)	
žarišno pozitivna imunoreaktivnost	0	7 (20)	6 (17,1)	13 (12)	
žarišno pozitivna imunoreaktivnost do na širokom području	0	3 (8,6)	8 (22,9)	11 (10,2)	**<0,001**
na širokom području pozitivna imunoreaktivnost	0	0	5 (14,3)	5 (4,6)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	

*Hi kvadrat test

Kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom značajno je više na širokom području pozitivna imunoreaktivnost Mn-SOD u antrumu (Hi-kvadrat test, P = 0,02) i korpusu (Hi-kvadrat test, P = 0,03) (Tablica 5.5.).

Tablica 5.5. Raspodjela pacijenata (umjereni kronični gastritis ili teški kronični gastritis) prema podjeli imunoreaktivnosti Mn-SOD u antrumu i korpusu

	Broj (%) pacijenata			P*
	++ umjereni kronični gastritis	+++ teški kronični gastritis	Ukupno	
Mangan superoksid dizmutaza u antrumu				
Bez pozitivne imunoreaktivnosti	14 (40)	7 (20)	21 (30)	
Žarišno pozitivna imunoreaktivnost	14 (40)	10 (28,6)	24 (34,3)	
Žarišno pozitivna imunoreaktivnost do na širokom području	5 (14,3)	6 (17,1)	11 (15,7)	**0,02**
Na širokom području pozitivna imunoreaktivnost	2 (5,7)	12 (34,3)	14 (20)	
Ukupno	35 (100)	35 (100)	70 (100)	
Mangan superoksid dizmutaza u korpusu				
Bez pozitivne imunoreaktivnosti	25 (71,4)	16 (45,7)	41 (58,6)	
Žarišno pozitivna imunoreaktivnost	7 (20)	6 (17,1)	13 (18,6)	
Žarišno pozitivna imunoreaktivnost do na širokom području	3 (8,6)	8 (22,9)	11 (15,7)	**0,03**
Na širokom području pozitivna imunoreaktivnost	0	5 (14,3)	5 (7,1)	
Ukupno	35 (100)	35 (100)	70 (100)	

*Hi kvadrat test

Pacijenti s teškim kroničnim gastritisom značajnije češće imaju intenzivno pozitivnu imunoreaktivnost biomarkera 8-OHdG u antrumu (Hi-kvadrat test, P < 0,001) ili u korpusu (Hi-kvadrat test, P = 0,002), dok je kontrolna skupina većinom bez pozitivne imunoreaktivnosti (Tablica 5.6.).

Tablica 5.6. Raspodjela pacijenata (s umjerenim kroničnim gastritisom ili teškim kroničnim gastritisom) prema podjeli imunoreaktivnosti biomarkera 8-OHdG u antrumu i korpusu

	Broj (%) pacijenata				P*
	kontrolna skupina	++ umjereni kronični gastritis	+++ teški kronični gastritis	Ukupno	
Biomarker (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) u antrumu					
bez pozitivne imunoreaktivnosti	38 (100)	32 (91,4)	20 (57,1)	90 (83,3)	
slabo pozitivna imunorekativnost	0 (0)	3 (8,6)	7 (20)	10 (9,3)	
umjereno pozitivna imunoreaktivnost	0 (0)	0 (0)	5 (14,3)	5 (4,6)	**<0,001**
intenzivno pozitivna imunoreaktivnost	0 (0)	0 (0)	3 (8,6)	3 (2,8)	
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	
Biomarker (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) u korpusu					
bez pozitivne imunoreaktivnosti	38 (100)	34 (97,1)	26 (74,3)	98 (90,7)	
slabo pozitivna imunorekativnost	0 (0)	1 (2,9)	5 (14,3)	6 (5,6)	
umjereno pozitivna imunoreaktivnost	0 (0)	0 (0)	4 (11,4)	4 (3,7)	**0,002**
Ukupno	38 (100)	35 (100)	35 (100)	108 (100)	

*Hi kvadrat test

Kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom značajno je više intenzivno pozitivna imunoreaktivnost biomarkera 8-OHdG u antrumu (Hi-kvadrat test, P = 0,006) i korpusu (Hi-kvadrat test, P = 0,02) (Tablica 5.7.).

Tablica 5.7. Raspodjela pacijenata (umjereni kronični gastritis ili teški kronični gastritis) prema podjeli imunoreaktivnosti biomarkera 8-OHdG u antrumu i korpusu

	Broj (%) pacijenata			P*
	++ umjereni kronični gastritis	+++ teški kronični gastritis	Ukupno	
Biomarker (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) u antrumu				
bez pozitivne imunoreaktivnosti	32 (91,4)	20 (57,1)	52 (74,3)	
slabo pozitivna imunorekativnost	3 (8,6)	7 (20)	10 (14,3)	
umjereno pozitivna imunoreaktivnost	0	5 (14,3)	5 (7,1)	**0,006**
intenzivno pozitivna imunoreaktivnost	0	3 (8,6)	3 (4,3)	
Ukupno	35 (100)	35 (100)	70 (100)	
Biomarker (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) u korpusu				
bez pozitivne imunoreaktivnosti	34 (97,1)	26 (74,3)	60 (85,7)	
slabo pozitivna imunorekativnost	1 (2,9)	5 (14,3)	6 (8,6)	
umjereno pozitivna imunoreaktivnost	0	4 (11,4)	4 (5,7)	**0,02**
Ukupno	35 (100)	35 (100)	70 (100)	

*Hi kvadrat test

Nadalje, prikazuje se uloga ispitivanih parametara u dijagnozi teže kliničke slike (ROC analiza). Metoda ROC krivulje odabrana je kao jednostavan način procjene razlike pojedinog pokazatelja između skupine pacijenata s obzirom na jačinu kroničnog gastritisa, a određuje se temeljem specifičnosti i senzitivnosti.

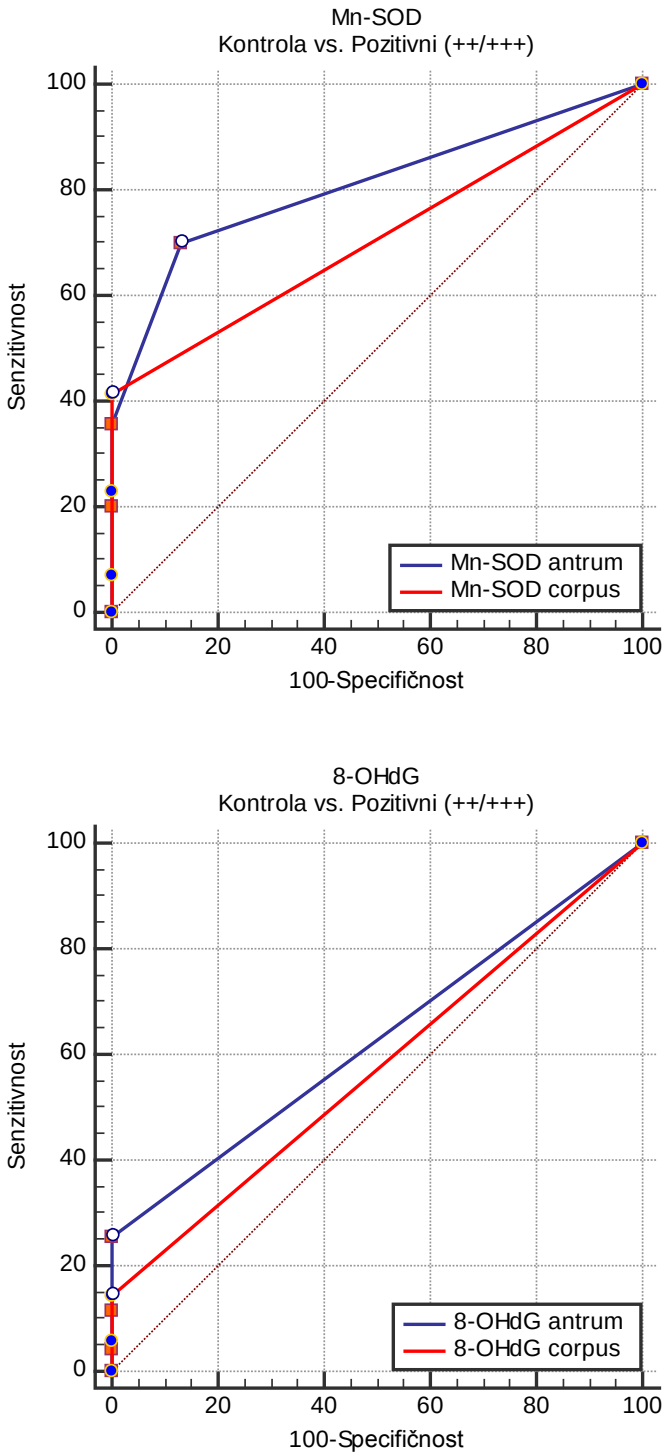
Kako bi se procijenila vrijednost pojedinih parametara, upotrijebljena je metoda izračuna ROC krivulje kojom se stupnjevito mijenjaju vrijednosti koje razlučuju normalne od promijenjenih nalaza kroničnog gastritisa s obzirom na jačinu kroničnog gastritisa. Za pojedinu skupinu je mijenjana točka razlučivanja (engl. cut-off point), kako bi se stvaranjem ROC krivulje moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje uspoređene skupine.

Prema dobivenim podatcima, najbolji pokazatelj je Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 70, specifičnost = 87, $P < 0,001$), značajna je razlika između površina Mn-SOD u antrumu i korpusu ($P = 0,006$) (Tablica 5.8. i Slika 5.1.).

Tablica 5.8. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između kontrolne skupine i ispitanika s kroničnim gastritisom (++/+++)

	površina ispod krivulje	senzitivnost (95 % interval pouzdanosti)	specifičnost (95 % interval pouzdanosti)	cut off	Youden index	P	P*
Kontrolna skupina vs. kronični gastritis (++/+++)							
Mn-SOD antrum	0,808	70 (57,9 - 80,4)	87 (71,9 - 95)	> 0	0,568	< **0,001**	**0,006**
Mn-SOD korpus	0,707	41 (29,8 - 53,8)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,414	< **0,001**	
8-OHdG antrum	0,629	26 (16 - 37,6)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,257	< **0,001**	**0,02**
8-OHdG korpus	0,571	14 (7,1 - 24,7)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,143	< **0,001**	

*značajnost razlike između površina



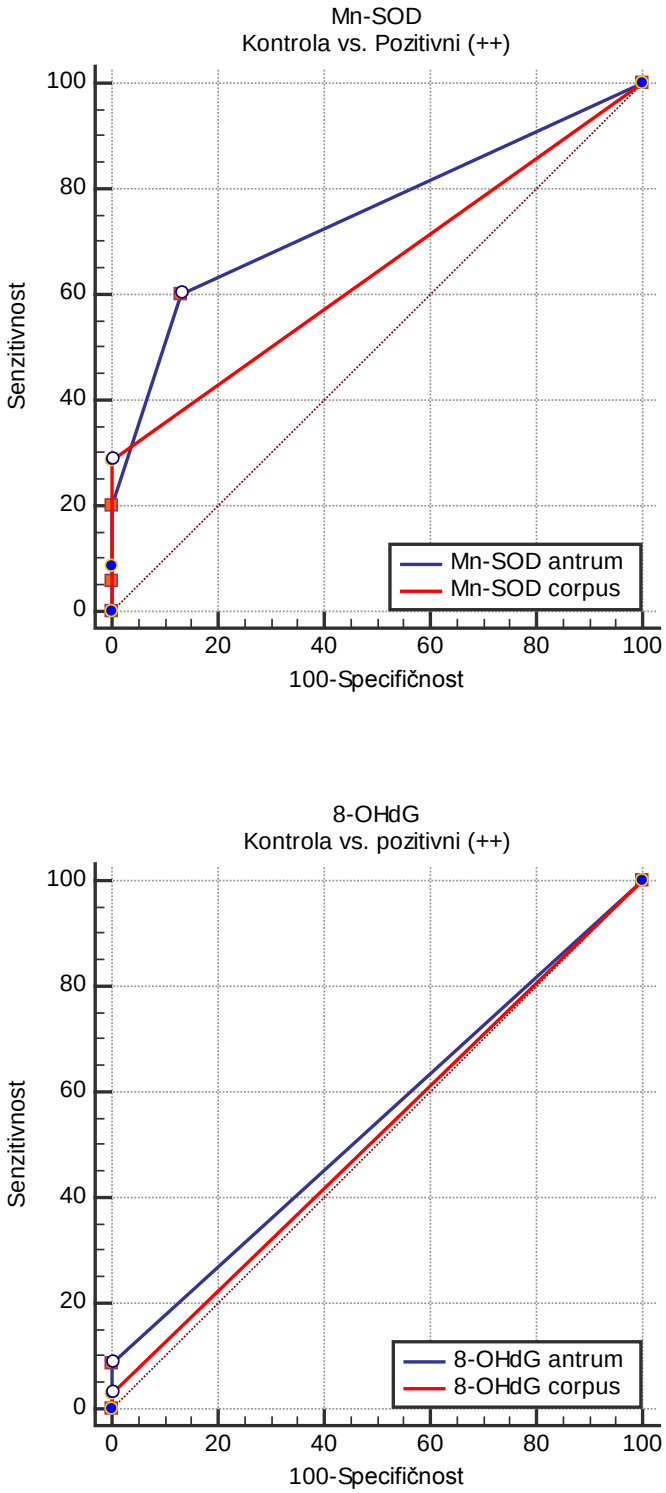
Slika 5.1. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (kontrola vs. pozitivni (++/+++))

Uspoređujući pacijente iz kontrolne skupine i pacijente s umjerenim kroničnim gastritisom, najbolji pokazatelj je Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 60, specifičnost = 87, P < 0,001), značajna je razlika između površina Mn-SOD u antrumu i korpusu (P = 0,03) (Tablica 5.9. i Slika 5.2.).

Tablica 5.9. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između kontrolne skupine i pacijenata s umjerenim kroničnim gastritisom (++)

	površina ispod krivulje	senzitivnost (95 % interval pouzdanosti)	specifičnost (95 % interval pouzdanosti)	cut off	Youden index	P	P*
Kontrolna skupina vs. ++ kronični gastritis							
Mn-SOD antrum	0,747	60 (42,1 - 76,1)	87 (71,9 - 95)	> 0	0,468	< **0,001**	**0,03**
Mn-SOD korpus	0,643	29 (14,6 - 46,3)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,286	< **0,001**	
8-OHdG antrum	0,543	9 (1,8 - 23,1)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,086	0,07	0,15
8-OHdG korpus	0,514	3 (0,07 - 14,9)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,029	0,32	

*značajnost razlike između površina



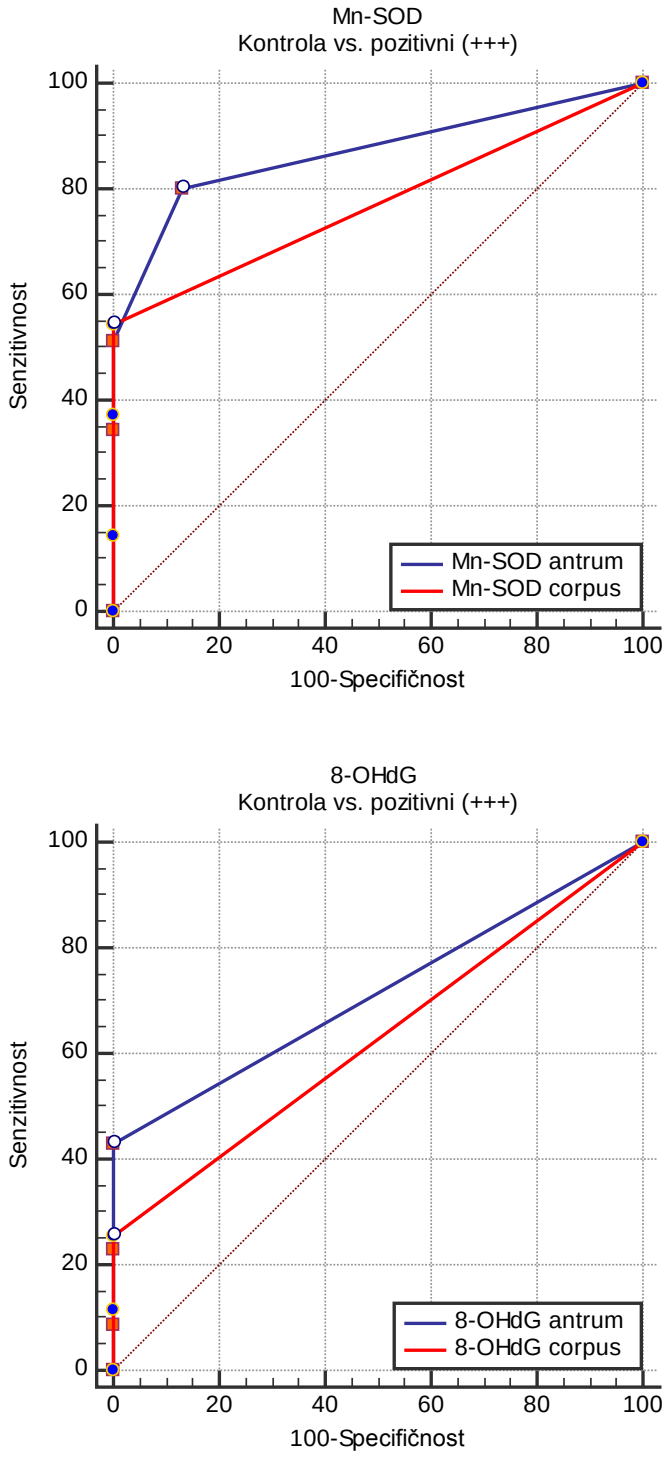
Slika 5.2. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (kontrola vs. pozitivni (++))

Uspoređujući pacijente iz kontrolne skupine i pacijente s teškim kroničnim gastritisom, najbolji pokazatelj je Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 80, specifičnost = 87, P < 0,001), nema značajnih razlika između površina Mn-SOD u antrumu i korpusu, kao niti između biomarkera 8-OHdG (Tablica 5.10. i Slika 5.3.).

Tablica 5.10. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između kontrolne skupine i pacijenata s teškim kroničnim gastritisom (+++)

	površina ispod krivulje	senzitivnost (95 % interval pouzdanosti)	specifičnost (95 % interval pouzdanosti)	cut off	Youden index	P	P*
Kontrolna skupina vs. +++ kronični gastritis							
Mn-SOD antrum	0,868	80 (63,1 - 91,6)	87 (71,9 - 95)	> 0	0,468	< **0,001**	0,06
Mn-SOD korpus	0,771	54 (36,6 - 71,2)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,286	< **0,001**	
8-OHdG antrum	0,714	43 (26,3 - 60,1)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,086	< **0,001**	0,05
8-OHdG korpus	0,629	26 (12,5 - 43,3)	100 (90,7 - 100)	> 0	0,029	< **0,001**	

*značajnost razlike između površina



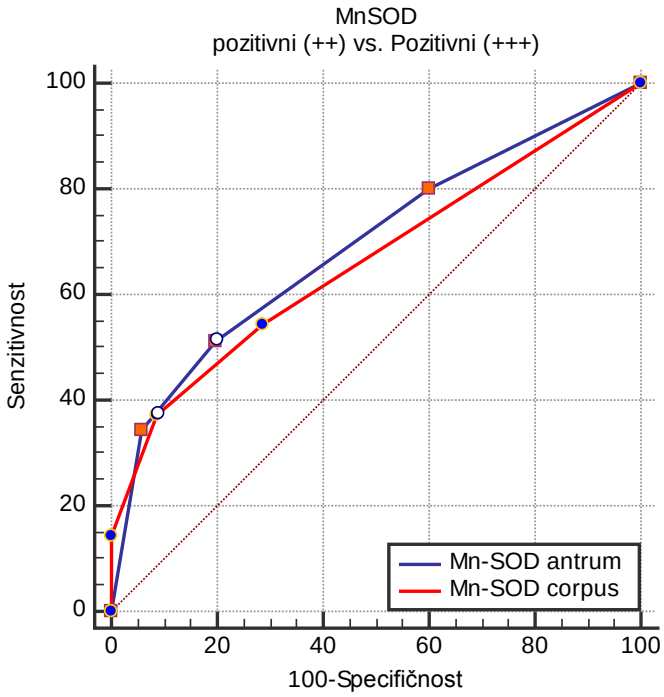
Slika 5.3. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (kontrola vs. pozitivni (+++))

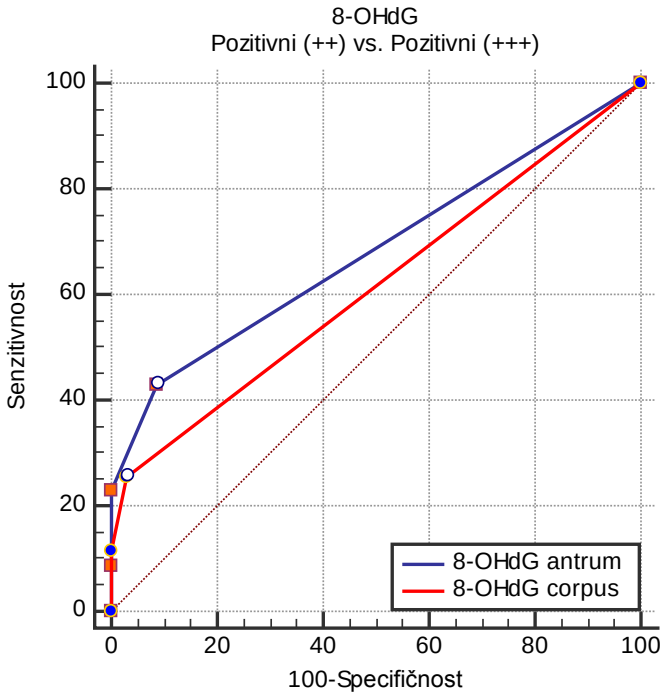
Kao dijagnostički pokazatelj između umjerenog i teškog kroničnog gastritisa, najbolji pokazatelj je Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 51, specifičnost = 87, P = 0,002), nema značajnih razlika između površina Mn-SOD u antrumu i korpusu, kao niti između biomarkera 8-OHdG (Tablica 5.10., Slika 5.3., Tablica 5.11., Slika 5.4.).

Tablica 5.11. Parametri ROC krivulje promatranih parametara između pacijenata s umjerenim kroničnim gastritisom (++) i pacijenata s teškim kroničnim gastritisom (+++)

	površina ispod krivulje	senzitivnost (95 % interval pouzdanosti)	specifičnost (95 % interval pouzdanosti)	cut off	Youden index	P	P*
Umjereni kronični gastritis (++) vs. teški kronični gastritis (+++)							
Mn-SOD antrum	0,694	51 (34 - 68,6)	80 (63,1 - 91,6)	> 1	0,314	**0,002**	0,60
Mn-SOD korpus	0,664	37 (21,5 - 55,1)	91,4 (76,9 - 98,2)	> 1	0,286	**0,004**	
8-OHdG antrum	0,681	43 (26,3 - 60,6)	91,4 (76,9 - 98,2)	> 0	0,343	**< 0,001**	0,17
8-OHdG korpus	0,616	26 (12,5 - 43,3)	97,1 (85,1 - 99,9)	> 0	0,229	**0,004**	

*značajnost razlike između površina





Slika 5.4. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i graničnih vrijednosti za promatrane parametre (pozitivni (++) vs. pozitivni (+++))

6. RASPRAVA

6.1. UVOD U RASPRAVU

Unatoč svim naporima današnje medicinske znanstvene zajednice, broj oboljelih od malignih bolesti je i dalje u porastu te su po učestalosti drugi uzrok smrti, odmah iza kardiovaskularnih bolesti (59, 60). Ne čudi, stoga, velika zainteresiranost za sve čimbenike koji su uključeni u postanak i razvoj malignih stanica. Jedan od čimbenika koji stanicu vodi na put maligne alteracije je oksidativni stres. To je stanje koje nastaje kao posljedica nadjačavanja antioksidativne obrane od strane oksidativnih procesa koji traju predugo ili su prejakog intenziteta. Brojne nokse uzrokuju stvaranje slobodnih radikala, odnosno povećavaju broj oksidativnih procesa u stanici, koji mogu oštetiti genom i imati za posljedicu zloćudnu preobrazbu pogođene stanice (61-64). Jedna od takvih noksi je i kronična upala želučane sluznice koja je korištena kao materijal u ovome radu (65-67).

Kako je Helicobacter Pylori (68) najčešći uzročnik kroničnog gastritisa, u ovu studiju su uključeni isključivo pacijenti koji su imali samo kronični gastritis, bez drugih patohistoških promjena. Time se mogućnost oksidativnog stresa kao staničnog odgovora na prisutnost navedene bakterije svela na minimum. No, ipak treba spomenuti i ograničenje ovoga rada u vidu nedostatka anamnestičkih podataka o drugim svakodnevnim noksama koje bi mogle dati slične reakcije, npr. pušenje, vrsta prehrane i drugo (69-73).

Za opisivanje oksidativnog stresa u uzorku ove studije korišteni su Mn-SOD i 8-OHdG. Mn-SOD je korišten za procjenu jačine obrane stanice od oksidativnog stresa tj. „kvantificiranje“ snage najjačeg staničnog antioksidativnog mehanizma, a 8-OHdG za procjenu štete nastale reakcijom slobodnih radikala s genomom.

Nakon prikupljanja podataka, provedena je statistička analiza te je najprije provjereno postoji li uopće razlika u ekspresiji navedenih biomarkera s obzirom na postojanje, odnosno intenzitet upale. Ispitan je omjer između broja pacijenata s pozitivnom imunoreaktivnosti, u odnosu na one bez zabilježene pozitivne imunoreaktivnosti, a između tri navedene grupe istraživanja i to zasebno u antrumu i korpusu želuca.

6.2. TIJEK RASPRAVE I KOMENTAR

Prema dobivenim rezultatima, uočena je pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD u antrumu kod 54 (50%) pacijenata i to značajno najčešće kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom (Hi-kvadrat test, P < 0,001). Također, jednaki rezultat zabilježen je i za biomarker 8-OHdG u antrumu. Od 18 (16,7%) pacijenata kojima je zabilježena pozitivna imunoreaktivnost, značajno je više onih koji imaju teški kronični gastritis (Hi-kvadrat test, P < 0,001) (Tablica 5.2.). Rezultat ispitanih razlika u korpusu je slijedeći: pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD zabilježena je kod 29 (26,9%) pacijenata i to značajno najčešće kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom, njih 19 (54,3%) (Hi-kvadrat test, P < 0,001); dok je pozitivna imunoreaktivnost na biomarker 8-OHdG zabilježena kod 10 (9,3%) pacijenata, a značajno je viša kod onih koji imaju teški kronični gastritis. (Hi-kvadrat test, P < 0,001), njih 9 (25,7%) (Tablica 5.3.). Ova grupa rezultata ukazuje na činjenicu, koja je u skladu s studijom Ni J i suradinika, da bi povišena pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD i 8-OHdG u osoba s težom upalom želučane sluznice, koja povećava vjerojatnost maligne alteracije stanice, mogla biti pretkazatelj iste (66).

Nadalje, predmet interesa bila je korelacija intenziteta ekspresije pojedinog biomarkera (bez pozitivne imunoreaktivnosti, žarišno pozitivna imunoreaktivnost, žarišno pozitivna reaktivnost do na širokom području i na širokom području pozitivna imunoreaktivnost) s postojanjem, odnosno intenzitetom upale i to zasebno za područje antruma i korpusa želuca. Rezultati su pokazali kako pacijenti s teškim kroničnim gastritisom češće imaju žarišno pozitivnu imunoreaktivnost na Mn-SOD do na širokom ili na širokom području i u antrumu (Hi-kvadrat test, P < 0,001) i u korpusu (Hi-kvadrat test, P < 0,001). Kontrolna skupina je većinom bez pozitivne imunoreaktivnosti (Tablica 5.4.), što je također u skladu s ranije navedenom studijom (66).

Na temelju gore dobivenih rezultata, u daljnjoj statističkoj analizi potražen je odgovor na pitanje postoji li korelacija intenziteta ekspresije pojedinog biomarkera s intenzitetom kronične upale želučane sluznice (umjereni i teški kronični gastritis) u antrumu ili u korpusu.

Odgovor na postavljeno pitanje je potvrdan za oba biomarkera, a rezultati pokazuju da je kod ispitanika s teškim kroničnim gastritisom značajno više na širokom području pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD i u antrumu (Hi-kvadrat test, P = 0,02) i u korpusu (Hi-kvadrat test, P = 0,03) (Tablica 5.5.).

Jednako kao i za Mn-SOD, učinjena je analiza i za biomarker 8-OHdG. Rezultati pokazuju da pacijenti s teškim kroničnim gastritisom značajnije češće imaju intenzivno pozitivnu imunoreaktivnost biomarkera 8-OHdG u antrumu (Hi-kvadrat test, P < 0,001) i u korpusu (Hi-kvadrat test, P = 0,002), dok je kontrolna skupina većinom bez pozitivne imunoreaktivnosti (Tablica 5.6.). Lin R i suradnici došli su do zaključka da je jačina kronične upale u jednjaku u pozitivnoj korelaciji sa intenzivno pozitivnom imunoreaktivnosti biomarkera 8-OHdG (74).

Daljnjom analizom ekspresije biomarkera 8-OHdG između umjerene i teške kronične upale želuca, zaključeno je kako kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom značajno je više intenzivno pozitivna imunoreaktivnost biomarkera 8-OHdG u antrumu (Hi-kvadrat test, P = 0,006) i korpusu (Hi-kvadrat test, P = 0,02) (Tablica 5.7.).

Dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu ovoga rada kako je ekspresija Mn-SOD-a i 8-OHdG-a u tkivu sluznice želuca zapravo povezana sa stupnjem upale želučane sluznice, ali i da pri patohistološki određenom, istom intenzitetu upale želučane sluznice moguća je različita ekspresija Mn-SOD-a i 8-OHdG-a (74).

Kako bi procijenili razliku u jačini između biomarkera, a s obzirom na jačinu, odnosno prisutnost kronične upale želučane sluznice korištena je metoda ROC krivulje.

Usporedbom senzitivnosti i specifičnosti određenog biomarkera između pacijenata s normalnom histološkom slikom, tj. zdravih (grupa I) i onih s umjerenom i teškom kroničnom upalom želučane sluznice (grupa II i grupa III), dobiveni rezultati pokazuju da je najbolji pokazatelj pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 70, specifičnost = 87, P < 0,001), u usporedbi s pozitivnom imunoreaktivnosti na Mn-SOD u korpusu (senzitivnost = 41, specifičnost = 100, P < 0,001) te na 8-OHdG u antrumu (senzitivnost = 26, specifičnost = 100, P < 0,001) i korpusu (senzitivnost = 14, specifičnost = 100, P < 0,001).

Zabilježena je značajna razlika između površina Mn-SOD u antrumu i korpusu, što znači da je Mn-SOD senzitivniji u području antruma (p*<0,006).

Jednaka analiza napravljena je i za 8-OHdG, koja također pokazuje veću senzitivnost na 8-OHdG u području antruma (p*<0,02). (Tablica 5.8. i Slika 5.1.).

Detaljnijom analizom rezultata htjelo se ustanoviti postoji li razlika u senzitivnosti i specifičnosti između svake pojedine grupe pacijenata s obzirom na intenzitet, odnosno postojanje kronične upale želučane sluznice.

Usporedba pacijenata iz kontrolne skupine i pacijenata s umjerenim kroničnim gastritisom pokazuje da je najbolji pokazatelj pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 60, specifičnost = 87, P < 0,001), u odnosu na korpus (senzitivnost = 29, specifičnost = 100, P < 0,001) te na 8-OHdG u antrumu (senzitivnost = 9, specifičnost = 100, P < 0,07) i korpusu (senzitivnost = 3, specifičnost = 100, P < 0,32). Zanimljivo je postojanje značajne razlike između površina pozitivne imunoreaktivnosti na Mn-SOD u antrumu i korpusu (P = 0,03), dok isto nije slučaj kod imunoreaktivnosti na 8-OHdG (P=0,15) (Tablica 5.9. i Slika 5.2.).

Uspoređujući pacijente iz kontrolne skupine i pacijente s teškim kroničnim gastritisom, najbolji pokazatelj je pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 80, specifičnost = 87, P < 0,001), za razliku od imunoreaktivnosti Mn-SOD u korpusu (senzitivnost = 54, specifičnost = 100, P < 0,001), te od pozitivne imunoreaktivnosti na 8-OHdG u antrumu (senzitivnost = 43, specifičnost = 100, P < 0,001) i korpusu (senzitivnost = 26, specifičnost = 100, P < 0,001). Međutim, ipak nema značajnih razlika između površina pozitivne imunorekativnosti na Mn-SOD u antrumu i korpusu (p*=0,06), niti na 8-OHdG (p*>0,05) (Tablica 5.10., Slika 5.3.).

Posljednja grupa rezultata uspoređuje razliku senzitivnosti i specifičnosti imunoreaktivnosti na Mn-SOD, odnosno na 8-OHdG između pacijenata s umjerenom i teškom kroničnom upalom želučane sluznice. Za razliku od prethodnih grupa rezultata, ovdje je najbolji pokazatelj 8-OHdG u antrumu (senzitivnost = 43, specifičnost = 91,4, P < 0,001) u odnosu na imunoreaktivnost na isti biomarker u korpusu (senzitivnost = 26, specifičnost = 97,1, P < 0,004) te na pozitivnu imunoreaktivnost na Mn-SOD u antrumu (senzitivnost = 51,

specifičnost = 80, P =0,002) i korpusu (senzitivnost = 37, specifičnost = 91,4; P = 0,004). Nije zabilježena značajna razlika između površina imunoreaktivnosti na Mn-SOD u antrumu i korpusu (P=0,6), niti imunoreaktivnosti na 8-OHdG u antrumu i korpusu (P=0,17) (Tablica 5.11. i Slika 5.4.).

Provedeno istraživanje je potvrdilo mogućnost imunohistokemijskog utvrđivanja povezanosti ekspresije Mn-SOD-a i 8-OHdG-a u tkivu sluznice želuca sa upalom i stupnjem upale želučane sluznice, te da je moguća različita ekspresija pri istom intenzitetu upale. S obzirom na izrazito veliki broj pacijenata s upalom želučane sluznice, posebice uzrokovane bakterijom Helicobacter pylori (u populaciji Hrvatske oko 50%), a koja najčešće progredira u kroničnu upalu, istraživanje daje doprinos u mogućem pravilnom razdvajanju onih bolesnika s kroničnom upalom, kod kojih je obrana od oksidativnog stresa znatno kompromitirana (ekspresija Mn-SOD snižena, a 8-OHdG-a visoka), od onih gdje je ona stabilna (ekspresija Mn-SOD visoka, a 8-OHdG-a niska ili je nema). Navedeno omogućuje pravilnije razvrstavanje pacijenata u smislu povišenoga rizika od nastanka karcinoma želuca, kao jedne od posljedica kroničnoga upalnoga procesa. Takva grupa bolesnika trebala bi biti podvrgnuta intenzivnijem nadzoru, te bi na taj način bilo moguće znatno ranije otkriti znakove početne zloćudne transformacije stanica. Navedeno bi u konačnici moglo omogućiti pravovremenu terapijsku intervenciju, uz manje troškove, a pretpostavljamo i znatno bolje rezultate u smislu izlječenja.

Uspoređujući snagu imunopozitivne reaktivnosti na Mn-SOD i 8-OHdG istaknuta je prednost Mn-SOD-a u detekciji određenog stupnja upale želučane sluznice. Također, naglašena je izrazita dominacija u razlici ekspresije u antrumu u odnosu na corpus želuca iste osobe. Upravo ta činjenica mogla bi imati kliničku važnost u budućnosti, radi uzimanja dodatnog uzorka biopsije pri gastroskopiji i to upravo iz antruma, kako bi se dodatnim patohistološkim analizama izdvojila moguća skupina pacijenata sklona povišenom riziku zloćudne preobrazbe stanica gastrične sluznice. Svjesni ograničenja u traženju određene „cut-of“ vrijednosti kod izdvajanja takve skupine pacijenata na ovaj način, postoji širok spektar mogućnosti u pogledu daljnjih istraživanja na osnovi detekcije izravne ekspresije gena suvremenim medicinsko-laboratorijskim metodama.

7. ZAKLJUČCI

1. Pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD, na biopsiji sluznice želuca iz antruma i iz korpusa želuca, češća je kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom u odnosu na pacijente s umjerenim kroničnim gastritisom i onima s fiziološkim stanjem želučane sluznice.

2. Pozitivna imunoreaktivnost na biomarker 8-OHdG, na biopsiji sluznice želuca iz antruma i iz korpusa želuca, značajno je češća kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom u odnosu na pacijente s umjerenim kroničnim gastritisom i onima s fiziološkim stanjem želučane sluznice.

3. Pacijenti s teškim kroničnim gastritisom imaju značajno češće žarišno pozitivnu imunoreaktivnost na Mn-SOD do na širokom ili na širokom području i u antrumu i u korpusu u odnosu na pacijente s umjerenim kroničnim gastritisom i onima s fiziološkim stanjem želučane sluznice.

4. Pacijenti s teškim kroničnim gastritisom imaju značajno češće pozitivnu imunoreaktivnost na Mn-SOD na širokom području u antrumu i korpusu u odnosu na pacijente s umjerenim kroničnim gastritisom.

5. Pacijenti s teškim kroničnim gastritisom imaju značajno češće žarišno pozitivnu imunoreaktivnost na biomarker 8-OHdG do na širokom ili na širokom području i u antrumu i u korpusu u odnosu na pacijente s umjerenim kroničnim gastritisom i onima s fiziološkim stanjem želučane sluznice.

6. Pacijenti s teškim kroničnim gastritisom značajno češće imaju intenzivno pozitivnu imunoreaktivnost na biomarker 8-OHdG na širokom području u antrumu i korpusu u odnosu na pacijente s umjerenim kroničnim gastritisom.

7. Najbolji pokazatelj razlike između pacijenata s teškim ili umjerenim gastritisom i onih s fiziološkim stanjem sluznice želuca je pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD i to u antrumu.

8. Najbolji pokazatelj razlike između pacijenata s umjerenim gastritisom i onih s fiziološkim stanjem sluznice želuca je pozitivna imunoreaktivnost na Mn-SOD i to u antrumu.

9. Najbolji pokazatelj razlike između pacijenata s teškim i umjerenim gastritisom je Mn-SOD, bez značajnih razlika između pozitivne imunoreaktivnsoti antruma i korpusa.

8. SAŽETAK

Enzim mangan superoksid dizmutaza (Mn-SOD) neutralizira slobodne radikale kisika, koji nastaju tijekom upale, a sudjeluju u inicijaciji i promociji karcinogeneze oštećenjem deoksiribonukleinske kiseline (DNA), na što ukazuje 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG) kao osjetljiv biomarker. Cilj istraživanja bio je utvrditi korelaciju ekspresije Mn-SOD-a i 8-OHdG-a sa stupnjem kroničnog gastritisa, te utvrditi moguću povezanost ekspresije s patohistološkom dijagnozom.

Istraživanje uključuje 108 pacijenata podijeljenih u tri skupine: skupina I – 35 pacijenata s umjerenim kroničnim gastritisom, skupina II – 35 pacijenata s teškim kroničnim gastritisom, skupina III – 38 pacijenata s normalnom histološkom slikom. Osim kroničnoga gastritisa, sluznica je bez drugih patohistoloških promjena.

Rezultati pokazuju imunoreaktivnost u antrumu na Mn-SOD i 8-OHdG kod 54 (50%), odnosno 18 (16,7%) pacijenata, a za oba pokazatelja najčešće kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom ($P<0,001$; $P<0,001$). U korpusu, imunoreaktivnost Mn-SOD-a, zabilježena je kod 29 (26,9%), a na 8-OHdG kod 10 (9,3%) pacijenata, također za oba značajno češće kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom ($P<0,001$; $P<0,001$). Pacijenti s teškim kroničnim gastritisom češće imaju žarišnu imunoreaktivnost Mn-SOD-a na širokom ili na do širokom području u antrumu ($P<0,001$) i u korpusu ($P<0,001$). Nadalje, pacijenti s teškim kroničnim gastritisom imaju značajno veću imunoreaktivnost Mn-SOD-a i 8-OHdG-a na širokom području i to i u antrumu ($P=0,02$; $P<0,001$) i u korpusu ($P=0,03$; $P=0,002$). Osim toga, utvrđena je značajno češća intenzivna imunoreaktivnost 8-OHdG-a u antrumu ($P=0,006$) i korpusu ($P=0,02$) kod pacijenata s teškim kroničnim gastritisom, u odnosu na one s umjerenim kroničnim gastritisom. Usporedbom senzitivnosti i specifičnosti biomarkera iščitava se kako je imunoreaktivnost Mn-SOD-a u antrumu najbolji pokazatelj razlike između pacijenata s normalnom histološkom slikom i onih s umjerenim kroničnim gastritisom i teškim kroničnim gastritisom ($P<0,001$), zatim između pacijenata s normalnom histološkom slikom i umjerenim kroničnim gastritisom ($P<0,001$), te između pacijenata s normalnom histološkom slikom i teškim kroničnim gastritisom ($P<0,001$), s značajnom razlikom između površina imunoreaktivnosti Mn-SOD-a u antrumu i korpusu za prve dvije

navedene usporedbe (P<0,006; P=0,03). Nasuprot navedenom, između pacijenata s umjerenim kroničnim gastritisom i teškim kroničnim gastritisom najbolji pokazatelj je 8-OHdG u antrumu (P<0,001).

Zaključno, određivanje Mn-SOD-a u antrumu bi moglo poslužiti za razvrstavanje pacijenata s povišenim rizikom od nastanka karcinoma želuca, te bi na taj način bilo moguće ranije otkriti znakove početne zloćudne transformacije stanica. Navedeno bi u konačnici moglo omogućiti pravovremenu terapijsku intervenciju, uz manje troškove, a pretpostavljeno i bolje terapijske rezultate.

Ključne riječi: Mn-SOD; oksidativni stres; upala; želučana mukoza; 8-OHdG

9. SUMMARY

OXIDATIVE STRESS GASTRIC MUCOSA IN CHRONIC GASTRITIS

Manganese superoxide dismutase enzime (Mn-SOD) neutralizes free oxygen radicals forming during inflammation. These participate in the initiation and promotion of carcinogenesis by damaging the DNA, as indicated by the 8-hidroxy-2-deoxigvanosine (8-OHdG) as a sensitive biomarker. The aim of this study was to determine the correlation of the expression of Mn-SOD and 8-OHdG with chronic gastritis, as well as a possible association between the expression and the histopathological diagnosis.

The study includes 108 patients distributed in three group:s: group I – 35 patients with moderate chronic gastritis, group II - 35 patients with severe chronic gastritis, group III - 38 patients with regular histology. Except for chronic gastritis, the gastric mucosa bears no evidence of other histopathological changes.

The results are Mn-SOD and 8-OHdG-positive in the antrum in 54 (50%) patients and in 18 (16.7%) patients respectively, with both markers most commonly present in patients with severe chronic gastritis ($P < 0.001$; $P < 0.001$). 29 patients (26,9%) were Mn-SOD positive in the corpus, and 10 patients (9,3%) were positive to 8-OHdG, with both markers most commonly indicated in patients with severe chronic gastritis ($P < 0.001$; $P < 0.001$). Also, patients with severe chronic gastritis are often focally positive to Mn-SOD on a wide area in the antrum ($P < 0.001$) and in the corpus ($P < 0.001$). The incidence of patients positive to Mn-SOD and 8-OHdG is substantially higher in cases of severe chronic gastritis, in particular in the antrum ($P=0.02$; $P<0.001$) and in the corpus ($P=0.03$; $P<0.002$). Equally, in patients with severe chronic gastritis the antrum was substantially more often highly 8-OHdG-positive ($P= 0.006$), and so was the corpus ($P=0.02$). By comparing the sensitivity and specificity of the biomarkers it can be concluded that the intensity of antrum-positive Mn-SOD is the best indicator of the difference between patients with regular histologic status and those with moderate and severe chronic gastritis ($P<0.001$), with a significant discrepancy between areas of positive immunoreactivity to Mn-SOD in the antrum and the corpus for the first two mentioned comparisons ($P<0.006$; $P=0.03$). As opposed to this, the best indicator for patients with moderate and severe gastritis is 8-OHdG in the antrum ($P<0.001$).

The determination of antral Mn-SOD, as the best indicator for gastric mucosa inflammation, could be used to single out patients more exposed to the risk of developing stomach cancer, thus enabling an earlier discovery of indicators to initial malignant cell transformation. This, in its turn, might finally enable a timely therapeutic intervention, reduced costs, and presumably better treatment outcomes.

Key words: Mn-SOD; Oxidative stress; Inflammation; Gastric mucosa; 8-OHdG

10. LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2. izd. Oxford: Clarendon Press; 1989., str. 29-32.

2. Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. Mutat Res. 1996 Feb 19;350(1):103-8.

3. Winston GW, Di Giulio RT. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat Toxicol. 1991 Apr;19(2):137–61.

4. Blaha L, Kopp R, Simkova K, Mares J. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (Hypophthalmichthys molitrix Val.) exposed to microcystinproducing cyanobacterial water bloom. Acta Vet Brno. 2004 Dec;73(4):477-82.

5. Storey KB. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz Jour Med Biol Res.1996 Dec 12;29:1715-33.

6. Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, Channa punctatus Bloch. Ecotoxic Envir Safety. 2003 Oct;56(2):295-301.

7. Morales AE, Perez-Jimeney A, Hidalgo MC, Abellan E, Cardenete G. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. Comp Biochem Physiol Part C. 2004 Oct;139(1-3):153-61.

8. Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. Envir Health Persp. 1998 Jul;106(7):375-84.

9. Ahmad I, Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. Anguilla anguilla L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without ß-naphthoflavone pre exposure. Chemosphere. 2005 Oct;61(2):267-75.

10. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Envir Toxicol Pharmacol. 2003 Feb;13(2):57-149.

11. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, i sur. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. N Engl J Med. 2003 Oct 23;349(17):1605-13.

12. Romero F, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno J, Romero B, Marin N, i sur. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. Envir Health Persp. 1998 Oct;106(Suppl 5):1229-34.

13. Floor E, Wetzel M. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. J Neurochem. 1998 Jan;70(1):268-75.

14. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta. 2003 Mar;329(1-2):23-38.

15. Dovhanj J, Svagelj D, Smolic M, Smolic R, Maric I. Mn-SOD and Chronic Inflammation of Gastric Mucosa. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem. 2010 Dec;9(4):347-54.

16. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis andin-tramitochondrial localization. J Biol Chem. 1973 Jul 10;248(13):4793-96.

17. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). Free Radic Biol Med. 1988;5(5-6):363–69.

18. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 1969 Nov 25;244(22):6049–55.

19. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem. 1973 Jul 10;248(13):4793-96.

20. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. J Cell Biol 1988 Dec;107(6):2169-79.

21. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. J Biol Chem. 1973 May 25;248(10):3582-92.

22. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jan;79(24):7634-38.

23. Karlsson K, Sandstrom J, Edlund A, Marklund SL. Turnover of extracellular-superoxide dismutase in tissues. Lab Invest. 1994 May;70(5):705-10.

24. Karlsson K, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. Biochem J. 1988 Oct;255(1):223-28.

25. Gotz JM, van Kan CI, Verspaget HW, Biemond I, Lamers CB, Veenendaal RA. Gastric mucosal superoxide dismutases in Helicobacter pylori infection. Gut. 1996 Apr;38(4):502-6.

26. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezand RA, Lamers CB, i sur. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. J Pathol. 2003 Sep;201(1):7-16.

27. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.

28. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 6;92(12):5258-65.

29. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. Pathol Res Pract. 2008;204(7):511-24.

30. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. Toxicol Pathol. 2010 Jan;38(1):96-109.

31. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. Cancer Res. 2008 Mar 15; 68(6):1777-85.

32. Diakowska D, Lewandowski A, Kopec W, Diakowski W, Chrzanowska T. Oxidative DNA damage and total antioxidant status in serum of patients with esophageal squamous cellcarcinoma. Hepatogastroenterology. 2007 Sep;54(78):1701–4.

33. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat Res. 1994 Mar 1;305(2):253-64.

34. Naito Y, Yoshikawa T. Molecular and cellular mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced inflammation and oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2002 Aug 1;33: 323-36.

35. Hiroshi M. Controlling oxidative stress: therapeutic and delivery strategies. Preface. Adv Drug Deliv Rev. 2009 Apr 28;61(4):285–6.

36. Dovhanj J, Švagelj D. Oxidative stress pathway driven by inflammation in gastric mucosa. [Internet]. U: Tonino P, urednik. Gastritis and Gastric Cancer - New Insights in Gastroprotection, Diagnosis and Treatments. InTech, 2011. Dostupno na adresi: http://www.intechopen.com/books/gastritis-and-gastric-cancer-new-insights-in-gastroprotection-diagnosis-and-treatments/oxidative-stress-pathway-driven-by-inflammation-in-gastric-mucosa. Datum pristupa: 16.09.2016.

37. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. Adv Drug Deliv Rev. 2009 Apr 28;61(4):290-302.

38. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Int J Cancer. 2007 Dec 1;121(11):2381-6.

39. Okada F. Inflammation and free radicals in tumor development and progression. Redox Report. 2002 Feb;7(6): 357-368.

40. Epperly MW, Defilippi S, Sikora C, Gretton J, Greenberger JS. Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene. Mil Med. 2002 Feb;167(2 Suppl):71-3.

41. Noguchi K, Kato K, Moriya T, Suzuki T, Saito M, Kikuchi T, i sur. Analysis of cell damage in Helicobacter pylori-associated gastritis. Pathol Int. 2002 Feb;52(2):110-8.

42. Hwang TS, Choi HK, Han HS. Differential expression of manganese superoxide dismutase, copper/zinc superoxide dismutase, and catalase in gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa. Eur J Surg Oncol. 2007 May;33(4):474-9.

43. Janssen AM, Bosman CB, van Duijn W, Oostendorp-van de Ruit MM, Kubben FJ, Griffioen G, i sur. Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. Clin Cancer Res. 2000 Aug;6(8):3183-92.

44. Hermann B, Li Y, Ray MB, Wo JM, Martin RCG. Association of manganese superoxide dismutase expression with progression of carcinogenesis in Barrett esophagus. Arch Surg. 2005 Dec;140(12):1204-9.

45. Monari M, Foschi J, Calabrese C, Liguori G, Di Febo G, Rizzello F, i sur. Implications of antioxidant enzymes in human gastric neoplasms. Int J Mol Med. 2009 Nov;24(5):693-700.

46. Kekec Y, Paydas S, Tuli A, Zorludemir S, Sakman G, Seydaoglu G. Antioxidant enzyme levels in cases with gastrointesinal cancer. Eur J Intern Med 2009 Jul;20(4):403-6.

47. Hoffmann W. Regeneration of the gastric mucosa and its glands from stem cells. Curr Med Chem. 2008;15(29):3133-44.

48. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. Nature. 2000 Sep 21;407(6802):390-5.

49. Pani G, Colavitti R, Bedogni B, Fusco S, Ferraro D, Borrello S, i sur. Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies. Curr Med Chem. 2004 May;11(10):1299-308. Review.

50. Monari M, Trinchero A, Calabrese C, Cattani O, Serrazanetti GP, Foschi J, i sur. Superoxide dismutase in gastric adenocarcinoma: is it a clinical biomarker in the development of cancer? Biomarkers. 2006 Nov-Dec;11(6):574-84.

51. Wang SH, Wang YZ, Zhang KY, Shen JH, Zhou HQ, Qiu XY. Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma. World J Gastroenterol. 2005 Jul 28;11(28):4305-10.

52. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. Mutation Research. 1997 Dec 387(3):147- 63.

53. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2009 Apr;27(2):120-39.

54. Svagelj D, Svagelj M, Dovhanj J, Smolic M, Maric I, Smolic R. Differential mucosal activity of two superoxide dismutase isoforms in chronic gastritis. Helicobacter. 2009, 14(4):357. XXIInd International Workshop European Helicobacter Study Group. 2009 Sep 17 – 19; Porto, Portugal.

55. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. 1996 Oct;20(10):1161-81.

56. Misiewicz JJ, Tytgat GNJ, Goodwin CS, i sur. The Sydney system: A new classification of gastritis. Working Party Reports. Proceedings of the 9th World Congress of Gastroenterology, Sydney; August 1990; Blackwell;1-10.

57. Correa P, Yardley JH. Grading and classification of chronic gastritis: one American response to the Sydney system. Gastroenterology. 1992 Jan;102(1):355-9.

58. Toyokuni S, Hirao A, Wada T, Nagai R, Date A, Yoshii T, i sur. Age- and sun exposure-dependent differences in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and N-(carboxymethyl)lysine in human epidermis. J Clin Biochem Nutr. 2011 Sep;49(2):121-4.

59. World Health Organization [Internet] . The top 10 causes of death. Dostupno na adresi: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/. Datum pristupa: 19.12.2016.

60. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Leading causes of death. Dostupno na adresi: https://www.cdc.gov/nchs/fastats/leading-causes-of-death.htm. Datum pristupa: 19.12.2016.

61. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 2010 Dec 1;49(11):1603-16.

62. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol. 2011 Jul 15;254(2):86-99.

63. Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. J Clin Biochem Nutr. 2012 Jan;50(1):35-9.

64. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiol Rev. 2014 Apr;94(2):329-54.

65. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. J Carcinog. 2006 May 11;5:14.

66. Ni J, Mei M, Sun L. Oxidative DNA damage and repair in chronic atrophic gastritis and gastric cancer. Hepatogastroenterology. 2012 May;59(115):671-5.

67. Švagelj D, Terzić V, Dovhanj J, Švagelj M, Cvrković M, Švagelj I. Superoxide dismutases in chronic gastritis. APMIS. 2016 Apr;124(4):252-6.

68. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of Helicobacter pylori pathogenesis, diagnosis, and treatment. World J Gastroenterol. 2014 Sep 28;20(36):12781-808.

69. Tu HK, Pan KF, Zhang Y, Li WQ, Zhang L, Ma JL, i sur. Manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of gastric lesions, and its effects on chemoprevention in a Chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Apr;19(4):1089-97.

70. Kneller RW, You WC, Chang YS, Liu WD, Zhang L, Zhao L, i sur. Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. J Natl Cancer Inst. 1992 Aug 19;84:1261–6.

71. Zhang L, Blot WJ, You WC, i sur. Serum micronutrients in relation to pre-cancerous gastric lesions. Int J Cancer. 1994 Mar 1;56(5):650–4.

72. You WC, Blot WJ, Chang YS, Ershow AG, Yang ZT, An Q, i sur. Diet and high risk of stomach cancer in Shandong. China. Cancer Res. 1988 Jun 15;48(12):3518–23.

73. Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology 1998 Jun; 114(6): 1169–79.

74. Lin R, Zhang C, Zheng J, Tian D, Lei Z, Chen D, i sur. Chronic inflammation-associated genomic instability paves the way for human esophageal carcinogenesis. Oncotarget. 2016 Apr 26;7(17):24564-71.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podatci

- Ime i prezime: Velimir Terzić
- Datum i mjesto rođenja: 10. studenoga 1969. godine, Osijek
- Adresa: Andrije Hebranga 40, Osijek
- Obiteljsko stanje: oženjen, troje djece
- E-mail: velter4@gmail.com

Edukacija

- Srednja škola: MIOC V. Popović, Zagreb
- Fakultet: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Studij medicine u Osijeku, diplomirao 1999. godine
- Specijalistički ispit: Urologija, položio 2008. godine
- Uža specijalizacija iz urološke onkologije u tijeku

Radno mjesto

Specijalist urologije u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci

Nastavno iskustvo

Od 2012. godine asistent na Veleučilištu Lavoslav Ružička u Vukovaru, Studij fizioterapije, Medicinska etika

Članstvo u stručnim društvima

- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatska liječnička komora
- Liga protiv raka Vinkovci