Aktivnost paraoksonaze 1 u premalignim promjenama vrata maternice

Butorac, Dražan

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:571822

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Dražan Butorac

AKTIVNOST PARAOKSONAZE 1 U PREMALIGNIM PROMJENAMA VRATA MATERNICE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Dražan Butorac

ACTIVITY OF PARAOXONASE 1 IN PREMALIGNANT LESIONS OF THE CERVIX

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015

Ovaj je doktorski rad izrađen u Klinici za ženske bolesti i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice i na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Marije Grdić Rajković i doc. dr. sc. Krunoslava Kune, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem: spec. med. biok. Ivani Ćelap, dr. sc. Sanji Kačkov, dr. sc. Tomislavu Miletiću, Veri Robić, mag. med. bioch., med. sestri Ivi Bekić, Veri Divjak bacc. med. techn., prof. dr. sc. Damiru Eljugi. dipl. ing. stroj. Tihomiru Rajkoviću, prof. dr. sc. Tihani Žanić Grubišić, prof. dr. sc. Nadi Vrkić, te akademkinji Vidi Demarin na pruženoj pomoći pri izradi ovoga doktorskog rada.

Neskromno umišljam da nastavljam djelo pionira hrvatske kolposkopije prof. dr. sc. Gorana Grubišića, kojemu učenički zahvaljujem.

Zahvaljujem prof. hrvatskog jezika Tomislavu Salopeku za lekturu doktorskog rada.

Za podršku i savjete, u privatnom i profesionalnom životu, zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Krunoslavu Kuni.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorici dr. sc. Mariji Grdić Rajković koja je iz mene okorjelog kliničara izvlačila zrnca znanstvenika i teškom ih mukom oblikovala i slagala.

Mojoj supruzi …

… uspjesi su zajednički, kao i naš život i sve što u njemu dijelimo.

Dražan Butorac

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

AKTIVNOST PARAOKSONAZE 1 U PREMALIGNIM PROMJENAMA VRATA MATERNICE

DRAŽAN BUTORAC
Klinika za ženske bolesti i porodništvo, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Paraoksonaza 1 (PON1) je enzim koji sudjeluje u uklanjanju karcinogenih radikala lipidne peroksidacije. Cilj istraživanja je odrediti paraoksonaznu i arilesterazu aktivnost PON1, razdiobu fenotipova PON1, učestalost polimorfizama gena *pon1* koji utječu na enzimsku aktivnost i koncentraciju te parametre lipidnog statusa i oksidacijskoga stresa u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice. Bazalna i NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1, kao i ove aktivnosti standardizirane na koncentraciju HDL-a i apoAI, ne razlikuju se znatno između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom (CIN). Arilesterazna aktivnost PON1 te aktivnost standardizirana na koncentraciju HDL-a i apoAI znatno su niže u ispitanica s CIN-om i u ispitanica podijeljenih u podskupine s CIN-om niskog rizika i s CIN-om visokog rizika. Razdioba fenotipova PON1 ne razlikuje se značajno između ispitivanih skupina kao ni razdioba genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1*. Koncentracija se tiolnih skupina ne razlikuje, dok je koncentracija malondialdehida mnogo niža, a koncentracija glutationa značajno viša u skupini ispitanica s CIN-om. Dobiveni rezultati upućuju na oksidacijsko-antioksidacijsku neravnotežu u žena s CIN-om. Uočeno sniženje arilesterazne aktivnosti PON1 ukazuje na sniženu koncentraciju ovog enzima u serumu žena s CIN-om što može biti posljedica smanjene genske ekspresije uslijed poremećaja redoks homeostaze.

(121 stranica, 35 slika, 28 tablica, 137 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski).

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6 i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici.

Ključne riječi: paraoksonaza 1, polimorfizam, cervikalna intraepitelna neoplazija, oksidacijski stres

Mentori: dr. sc. Marija Grdić Rajković
doc. Dr. sc. Krunoslav Kuna

Ocjenjivači: dr. sc. Maja Matulić, izv. Prof.
dr. sc. Lada Rumora, red. Prof.
dr. sc. Damir Eljuga, izv. Prof.

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

ACTIVITY OF PARAOXONASE 1 IN PREMALIGNANT LESION OF THE CERVIX

DRAŽAN BUTORAC

Clinic of Gynecology and Obstetrics, Clinical Hospital Center „Sestre milosrdnice“
Department of Medical Biochemistry and Hematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
University of Zagreb

Paraoxonase 1 (PON1) is the enzyme that removes carcinogenic radicals of lipid peroxidation. The aim of this study was to determine the paraoxonase and arylesterase activity of PON1, phenotype distribution and polymorphisms of *pon1* gene, and parameters of lipid status as well as oxidation stress in patients with premalignant lesion of the cervix. Basal and NaCl-stimulated paraoxonase activity of PON1 as well as those activities standardized on the concentration of HDL and apoAI did not differ significantly between control group and group of patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). On the other hand, arylesterase activity of PON1 as well as activity standardized on the concentration of HDL and apoAI was significantly reduced in CIN group, and in the subgroups with low grade and high grade changes. Distribution of PON1 phenotypes was similar in the study groups. In addition distribution of genotypes and alleles of Q192R, L55M and -108C>T polymorphisms of *pon1* gene did not differ between the study groups. Concentration of thiol groups was similar, of malondialdehide was lower and of glutathione was significantly higher in the CIN groups. Observed results indicated an oxidation-antioxidation disbalance in women with CIN. Decreased arilesterase PON1 activity might reflect reduced enzyme concentration which could be the consequence of down-regulated gene expression due to redox homeostasis disturbances.

(121 pages, 35 figures, 28 tables, 137 references, original in Croatian)

Thesis is doposited in The Central Biological Library, Rooseveltov trg 6, and National and University Library.

Keywords: paraoxonase 1, polymorphism, cervical intraepithelial neoplasia, oxidative stress.

Supervisors: Marija Grdić Rajković, PhD
Krunoslav Kuna, PhD, Assistant Professor

Reviewers: Maja Matulić, PhD, Associate Professor
Lada Rumora, PhD, Full Professor
Damir Eljuga, PhD, Associate Professor

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD 8
1.1. Definicija problema 1
1.2. Ciljevi rada 2
1.3. Radne hipoteze 3
1.4. Zadatci rada i metodologija istraživanja 3
2. LITERATURNI PREGLED 5
2.1. PREMALIGNE PROMJENE VRATA MATERNICE 6
2.1.1. Premaligne promjene vrata maternice 6
2.1.2. Premaligne promjene vrata maternice i humani papiloma virus 9
2.1.3. Oksidacijski stres i premaligne promjene vrata maternice 13
2.2. PARAOKSONAZA 15
2.2.1. Paraoksonaza 1 15
2.2.2. Uloga paraoksonaze 1 16
2.2.3. Varijacije u aktivnosti paraoksonaze 1 19
2.2.4. Fenotip paraoksonaze 1 22
2.2.5. Paraoksonaza 1 i oksidacijski stres 23
3. ISPITANICE I METODE 25
3.1. ISPITANICE 26
3.1.1. Ispitanice s premalignim promjenama vrata maternice 26
3.1.2. Kontrolna skupina ispitanica 30
3.1.3. Uzorci 30
3.2. METODE 31
3.2.1. Instrumenti i uređaji 31
3.2.2. Kemikalije i reagensi 31
3.2.3. Izolacija DNA 33
3.2.4. Provjera čistoće i koncentracije DNA 33
3.2.5. Lančana reakcija polimerazom 34
3.2.6. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata 37
3.2.7. Određivanje paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 u serumu 39
3.2.8. Određivanje fenotipa paraoksonaze 1 41
3.2.9. Određivanje koncentracije parametara lipidnoga statusa u serumu 41
3.2.10. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina u serumu 41
3.2.11. Određivanje koncentracije malondialdehida u serumu 43
3.2.12. Određivanje koncentracije reduciranog glutationa u serumu 43
3.2.13. Statistička obrada podataka 44
4. REZULTATI 45
4.1. AKTIVNOST PARAOKSONAZE 1 I LIPIDNI STATUS U ISPITANICA S REDOVITIM MENSTRUALNIM CIKLUSOM I U ISPITANICA U POSTMENOPAUZI. 46
4.1.1. Koncentracije parametara lipidnoga statusa 46
4.1.2. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 47
4.2. ISPITIVANI PARAMETRI U SKUPINI ZDRAVIH ISPITANICA I U SKUPINI ISPITANICA S PREMALIGNIM PROMJENAMA VRATA MATERNICE 49
4.2.1. Demografska obilježja ispitivanih skupina 49
4.2.2. Koncentracije parametara lipidnoga statusa 50
4.2.3. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa 51

4.2.4. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 52
4.2.5. Dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije parametara lipidnoga statusa, oksidacijskoga stresa i arilesterazne aktivnosti paraoksonaze 1 57
4.2.7. Polimorfizmi Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* 61
4.2.7.1. Umnažanje dijela DNA koji sadržava polimorfno mjesto lančanom reakcijom polimeraze 61
4.2.7.2. Određivanje genotipova polimorfizama gena *pon1* 63
4.2.7.3. Razdioba genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* 65
4.2.7.4. Utjecaj polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* na aktivnost PON1 67
4.3. ISPITIVANI PARAMETRI U ZDRAVIH ISPITANICA I U ISPITANICA S PREMALIGNIM PROMJENAMA VRATA MATERNICE NISKOG I VISOKOG RIZIKA 71
4.3.1. Koncentracije parametara lipidnoga statusa 71
4.3.2. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa 73
4.3.3. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 74
4.3.4. Dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije parametara lipidnoga statusa, oksidacijskoga stresa i arilesterazne aktivnosti PON1 76
4.3.5. Fenotip paraoksonaze 1 80
4.3.6. Polimorfizmi Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* 81
5. RASPRAVA 83
5.1. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 u ispitanica s redovitim menstrualnim ciklusom i u ispitanica u postmenopauzi 85
5.2. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice 86
5.3. Parametri lipidnog statusa u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice 88
5.4. Polimorfizmi Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice 89
5.5. Fenotip paraoksonaze 1 u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice ... 93
5.6. Biljezi oksidacijskog stresa u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice 94
5.7. Mogući prediktori premalignih promjena vrata maternice 96
6. ZAKLJUČCI 98
7. LITERATURA 101
8. POPIS KRATICA 113
9. ŽIVOTOPIS 116

1. UVOD

U bolesnica s premalignim promjenama vrata maternice prisutne su povećana lipidna peroksidacija te promjene u antioksidacijskom sustavu, što upućuje na važnost oksidacijskoga stresa već u ranoj fazi karcinogeneze. Kako bismo rasvijetlili ulogu oksidacijskoga stresa u razvoju premalignih promjena vrata maternice ispitat ćemo paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost paraoksonaze 1 (PON1), enzima koji sudjeluje u uklanjanju karcinogenih radikala lipidne peroksidacije te razdiobu fenotipova PON1 i učestalost polimorfizmama gena *pon1* koji utječu na enzimsku aktivnost i koncentraciju.

1.1.Definicija problema

Cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) označuje intraepitelni predstadij raka vrata maternice (Kumar i sur., 2007.). Koja će premaligna lezija vrata maternice napredovati prema malignoj, a koja krenuti prema regresiji, pitanje je na koje za sada znanost nije dala jasno određen odgovor. Uz prisutnost infekcije humanim papiloma virusom (HPV) i drugi kofaktori pridonose malignoj progresiji kao primjerice povećani oksidacijski stres (Di Domenici i sur., 2012.). Oksidacijski stres i reaktivni kisikovi spojevi (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) uključeni su u patogenezu razvoja raznih karcinoma. U bolesnica s rakom vrata maternice utvrđena je povećana lipidna peroksidacija te promjene u enzimskim i neenzimskim antioksidacijskim sustavima (Arioz i sur., 2009.; Ahmed i sur., 1999.; Balci i sur., 2012.; Beevi i sur., 2007.; Camuzcuoglu i sur., 2009.; Delimaris i sur. 2007.; Manju i sur., 2002a.; Manju i sur., 2002b.). Povećana lipidna peroksidacija dokazana je i u bolesnica s CIN-om, što upućuje na to da je oksidacijski stres važan faktor u ranoj fazi karcinogeneze (Kim i sur., 2003.; Looi i sur., 2008.). Povećana lipidna peroksidacija ima važnu ulogu u razvoju raka, a oksidirani LDL smatra se glavnim oblikom lipidnih hidroperoksida koji je odgovoran za karcinogenezu povezanu s oksidacijskim stresom (Camuzcuoglu i sur., 2009.). Unatrag nekoliko godina sve više se istražuju mehanizmi koji sprječavaju oksidaciju LDL-a, a jedan je od njih i enzim PON1 (Sozmen i sur., 2008.).

PON1 je u cirkulaciji najvećim dijelom vezan za lipoprotein velike gustoće (HDL), a povezanost PON1 s HDL-om nužna je za održavanje normalne serumske aktivnosti ovog enzima. PON1 posjeduje organofosfataznu, paraoksonaznu i laktonaznu aktivnost te hidrolizira niz supstrata. Nadalje, PON1 djeluje antiaterogeno i antioksidacijski; štiti HDL i lipoprotein male gustoće (LDL) od oksidacije i uništava biološki aktivne oksidirane lipide na

lipoproteinima i u arterijskim stanicama (Grdić Rajković i sur., 2011.). PON1 sudjeluje u uklanjanju karcinogenih radikala lipidne peroksidacije koji su topljivi u lipidima te se taj enzim smatra jednim od endogenih sakupljača slobodnih radikala u ljudskom tijelu (Elkirani sur., 2007.). Utvrđeno je da je aktivnost PON1 snižena kod raznih vrsta raka, primjerice kod raka dojke, prostate, pluća i jajnika (Balci i sur, 2012.; Camuzcuoglu i sur., 2009.; Elkiran i sur., 2007.; Samra i sur., 2011.). Prema našim spoznajama samo jedno istraživanje provedeno je u svrhu određivanja aktivnosti PON1 u bolesnica s rakom vrata maternice te je i ovdje pokazano sniženje enzimske aktivnosti (Samra i sur., 2011.).

Na aktivnost i koncentraciju PON1 djeluje niz negenskih čimbenika koji uključuju okolišne čimbenike (pušenje, alkohol, prehrana, kemikalije iz okoliša, lijekove, dob) i razna fiziološka i patološka stanja. Uz negenske čimbenike na koncentraciju i aktivnost PON1 djeluju i genski čimbenici koji obuhvaćaju polimorfizme u promotorskoj, intronskim i kodirajućim regijama gena *pon1*. Poznato je više od 160 polimorfizama ovog gena od kojih su detaljno istraženi polimorfizmi kodirajuće regije Q192R i L55M. U promotorskoj regiji gena postoji barem pet polimorfizama od kojih je -108C>T također detaljno ispitan. Iz literaturnih je podataka poznat utjecaj polimorfizama kodirajuće (Q192R i L55M) i promotorske (-108C>T) regije gena *pon1* na aktivnost i koncentraciju PON1 (Grdić Rajković i sur., 2011.). Budući da ti polimorfizmi gena *pon1* utječu na koncentraciju i aktivnost PON1, smatra se da bi određeni genotip mogao biti rizični čimbenik za razvoj i napredovanje CIN-a. Koliko znamo, u literaturi nema dostupnih podataka o razdiobi genotipova Q192R, L55M i -108C>T polimorfizmima gena *pon1* u bolesnica s premalignim promjenama vrata maternice ni u bolesnica s rakom vrata maternice.

1.2.Ciljevi rada

Specifični ciljevi rada su u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanica s CIN-om:

1. odrediti paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 u serumu,
2. odrediti fenotip PON1 u serumu,
3. odrediti razdiobu genotipova i alela polimorfizma Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1*,
4. ispitati utjecaj polimorfizma Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* na paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1,
5. odrediti koncentracije parametara oksidacijskoga stresa: malondialdehida (MDA), reduciranog glutationa (GSH) i slobodnih tiolnih skupina u serumu,

6. odrediti koncentracije parametara lipidnoga statusa: triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL kolesterola, LDL kolesterola, apolipoproteina AI (apoAI) i apolipoproteina B (apoB) u serumu,
7. ispitati jesu li paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1, lipidni parametari i biljezi oksidacijskoga stresa potencijalni biomarkeri u dijagnostici CIN-a.

1.3.Radne hipoteze

Snižena aktivnost PON1, antioksidacijskog enzima koji sudjeluje u uklanjanju karcinogenih radikala lipidne peroksidacije, te veća učestalost alela gena *pon1* koji su povezani s nižom enzimskom koncentracijom i aktivnošću mogući su čimbenici koji, uz ostale rizične čimbenike, dovode do nastanka i napredovanja premaligne promjene vrata maternice, što u konačnici može rezultirati razvojem raka vrata maternice. Pregledom literature utvrdili smo da je ovo prvo istraživanje kojim se određuje aktivnost PON1 i razdioba genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* u ispitanica s CIN-om.

1.4.Zadatci rada i metodologija istraživanja

Ispitanice ćemo podjeliti u dvije skupine. Ispitivanu skupinu činit će žene kojima je redovitim citološkim probirom (Papa-testom) dijagnosticiran CIN, a on će biti potvrđen kolposkopskim pregledom, odnosno patohistološkom analizom tkiva vrata maternice. Kontrolnu skupinu činit će ispitanice koje redovitim citološkim probirom unatrag dvije godine nisu imale citoloških abnormalnosti u Papa-testu. Kontrolna će skupina biti izabrana prema kriterijima što veće podudarnosti s ispitanicama s CIN-om po dobi, načinu života i utjecaju okoliša. Kriterij za isključivanje iz istraživanja bit će prisutnost bubrežne bolesti, jetrene bolesti, hipertenzije, srčanog udara, moždanog udara, angine pektoris, šećerne bolesti, policističnih jajnika, endometrioze te druge maligne bolesti. Nadalje, isključit će se ispitanice koje uzimaju lijekove koje remete metabolizam masti i ugljikohidrata te trudnice.

Za određivanje biokemijskih parametara iskoristit će se uzorak seruma, a za utvrđivanje prisutnosti polimorfizama gena *pon1* uzorak pune krvi uzet na antikoagulans EDTA.

DNA će se izolirati iz pune krvi uzete na EDTA pomoću kompleta Flexi Gene DNA. Određivanje polimorfizama Q192R, L55M, -108C>T provodit će se metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) nakon koje će slijediti metoda polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP, od engl. *restriction fragment length polymorphism*).

Paraoksonazna aktivnost PON1 određivat će se upotrebom supstrata paraoksona, a arilesterazna aktivnost PON1 odredit će se upotrebom substrata fenilacetata.

Fenotip PON1 odredit će se računski metodom dvostrukog supstrata (paraokson i fenilacetat) iz omjera NaCl-stimulirane paraoksonazne aktivnosti i arilesterazne aktivnosti PON1.

Za određivanje koncentracije triglicerida, kolesterola, HDL kolesterola, LDL kolesterola, apoAI i apoB primjenjivat će se komercijalni testni paketi, a mjerenja će se obavljati na automatskom biokemijskom analizatoru.

Koncentracije MDA određivat će se metodom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC, od eng. *high performance liquid chromatography*). Koncentracije GSH-a i slobodnih tiolnih skupina određivat će se spektofotometrijskom metodom s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB).

2. LITERATURNI PREGLED

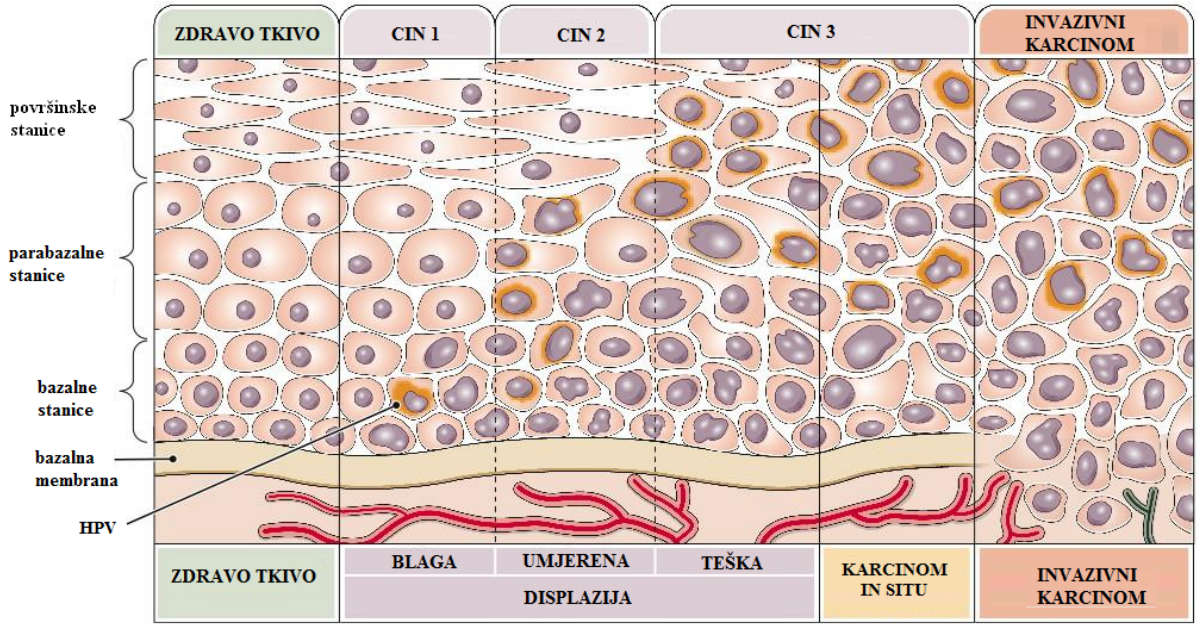
2.1.PREMALIGNE PROMJENE VRATA MATERNICE

2.1.1. Premaligne promjene vrata maternice

U Hrvatskoj je rak vrata maternice na osmom mjestu po učestalosti svih malignoma u žena. Unatoč golemom napretku u otkrivanju tog raka, čak u 1 – 2 % žena u Hrvatskoj starijih od 40 godina razvit će se rak vrata maternice. Oko 400 žena godišnje će oboljeti, a oko 100 umrijeti (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2011.; Jukić, 1999.).

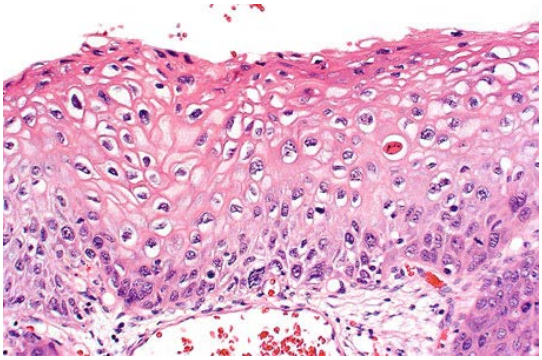
Rak vrata maternice nastaje zbog napredovanja premalignih promjena na vratu maternice koje se nazivaju cervikalnom intraepitelnom neoplazijom (CIN) ili displazijom (Solomon i sur., 2002.). Intraepitelni stadij označuje pojavu diskariotičnih i atipičnih stanica unutar epitela vrata maternice. Pri tome postoje smetnje u razvoju i sazrijevanju epitela vrata maternice s različitim stupnjem stanične atipije, koja podrazumijeva nepravilan izgled jezgre, nepravilnu veličinu jezgre, nepravilan odnos jezgre i citoplazme te promjene u kromatinu (Kumar i sur., 2007.).

Histološka prosudba CIN–a zasniva se na kvalitativnim i kvantitativnim promjenama cijele debljine zahvaćenog epitela. Pri tome su ključni elementi: diferencijacija (sazrijevanje, stratifikacija), nuklearne abnormalnosti te mitotska aktivnost stanica (slika 1.) (Cosette, 2007.).

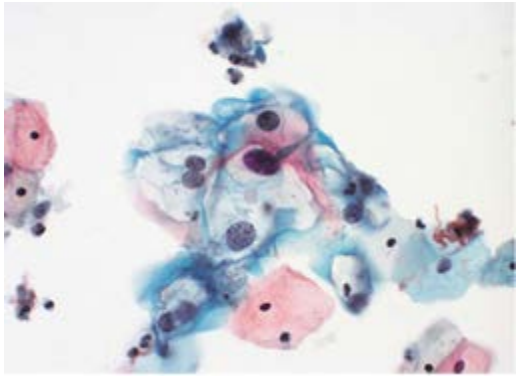


Slika 1. Shematski prikaz razvoja CIN-a (slika preuzeta iz literaturnog navoda Cosette, 2007.).

CIN 1 najblaži je oblik cervikalne intraepitelne neoplazije. Mjereći od bazalne membrane, promjene na stanicama ne zahvaćaju više od 1/3 debljine epitela. U bazalnome sloju nalazi se mali broj mitoza, a atipične stanice s atipičnim jezgrama su rijetke. Citomorfološki, u ovom se stadiju nalazi diskarioza površinskih stanica, citoplazma je intaktna i izdiferencirana, a jezgra je blago povećana, nepravilna oblika s hiperkromazijom ili grudičastim kromatinom (slike 2. i 3.) (Kurman i sur., 2011.).

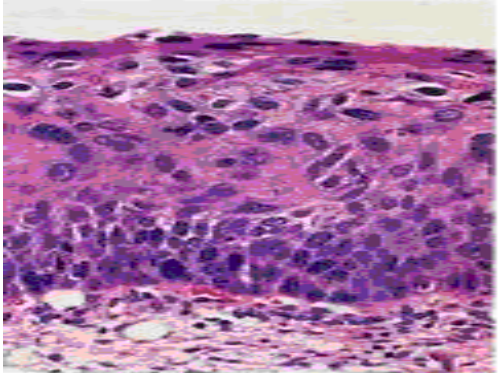


Slika 2. Histološki izgled CIN 1 (slika preuzeta iz literaturnog navoda Kurman i sur., 2011.).

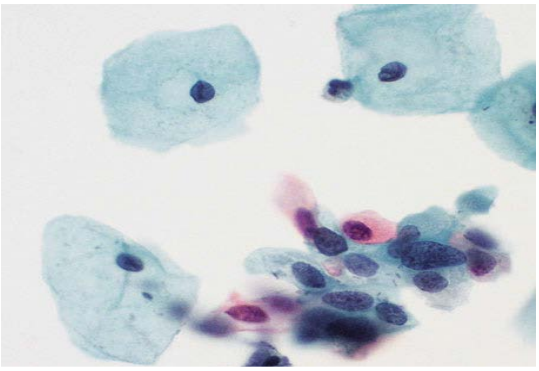


Slika 3. Citološki izgled stanica vrata maternice kod CIN 1 (slika preuzeta iz literaturnog navoda Kurman i sur., 2011.).

CIN 2 srednje je teški poremećaj pri kojemu su promjene na stanicama nešto izraženije i prisutne su u donje 2/3 epitela sluznice mjereći od bazalne membrane. Osim toga, postoji poremećaj u rasporedu i sazrijevanju stanica, uz vidljivu prisutnost nezrelih stanica s povećanim sadržajem kromatina. Sloj bazalnih stanica je proširen i sadržava veći broj mitoza te veći broj stanica atipična izgleda. Citomorfološki, nalazi se diskarioza na površinskim i intermedijarnim stanicama (slike 4. i 5.) (Kurman i sur., 2011.).

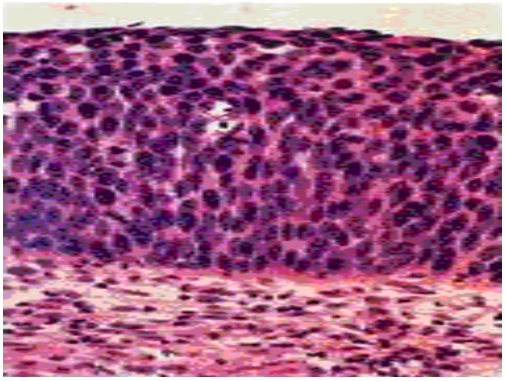


Slika 4. Histološki izgled CIN 2 (slika preuzeta iz literaturnog navoda Kurman i sur., 2011.).

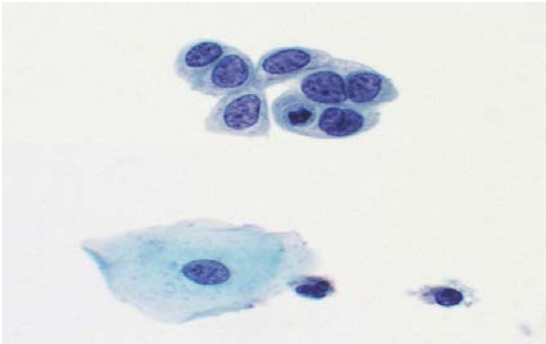


Slika 5. Citološki izgled stanica vrata maternice kod CIN 2 (slika preuzeta iz literaturnog navoda Kurman i sur., 2011.).

CIN 3 skupina promjena obuhvaća najteži oblik displazije i karcinom *in situ* (CIS). U ovome stadiju displastične se stanice nalaze u više od 2/3 debljine epitela. Prisutne su mnogobrojne mitoze te brojne stanice s izrazitim promjenama na jezgrama. Znakovi sazrijevanja i diferencijacije epitela nalaze se tek u gornjoj trećini epitela. Citomorfološki diskarioza stanica nalazi se u cijeloj debljini sluznice, tj. u slojevima površinskih, intermedijarnih i parabazalnih stanica (slika 6. i 7.). I kod CIS-a su prisutne ove promjene s dodatno maksimalno izraženim citomorfološkim i histološkim znakovima atipije (Ćorušić i sur., 2005.; Kumar i sur., 2007.). Brojna su istraživanja potvrdila da je CIN ujedno i preteča invazivne maligne bolesti (Richart i sur., 1969.). Razlika između CIS-a i invazivnog raka vrata maternice histološke je naravi. Kod CIS-a tanka bazalna membrana koja dijeli epitel od subepitelnoga vezivnoga tkiva u kojemu se nalaze limfne i krvne žile (stroma) još uvijek je intaktna. Pri invazivnom raku dolazi do prodora atipičnih (malignih) stanica kroz bazalnu membranu (Broders, 1932.).



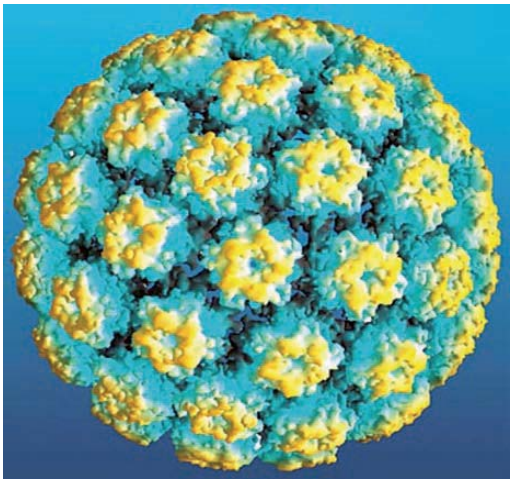
Slika 6. Histološki izgled CIN 3 (slika preuzeta iz literaturnog navoda Kurman i sur., 2011.).



Slika 7. Citološki izgled stanica vrata maternice kod CIN 3 (slika preuzeta iz literaturnog navoda navoda Ćorušić i sur., 2005.).

2.1.2. Premaligne promjene vrata maternice i humani papiloma virus

Model nastanka CIN-a vezan je za infekciju epitela vrata maternice HPV-om. HPV je ikozaedarski virus promjera 52 do 55 nm, građen od DNA genoma uklopljenog u ovojnicu sastavljenu od dviju proteinskih molekule. Virusnu kapsidu čini 12 pentavalentnih i 60 heksavalentnih kapsomera. Genom virusa čini kružno postavljena dvolančana molekula DNA veličine oko 7,9 kilobaza i molekulske mase 5,2 x 10^6 Daltona. HPV inficira epitel kože i sluznica, gdje može izazvati benigne, premaligne i maligne promjene (Zekan i sur., 2011.).

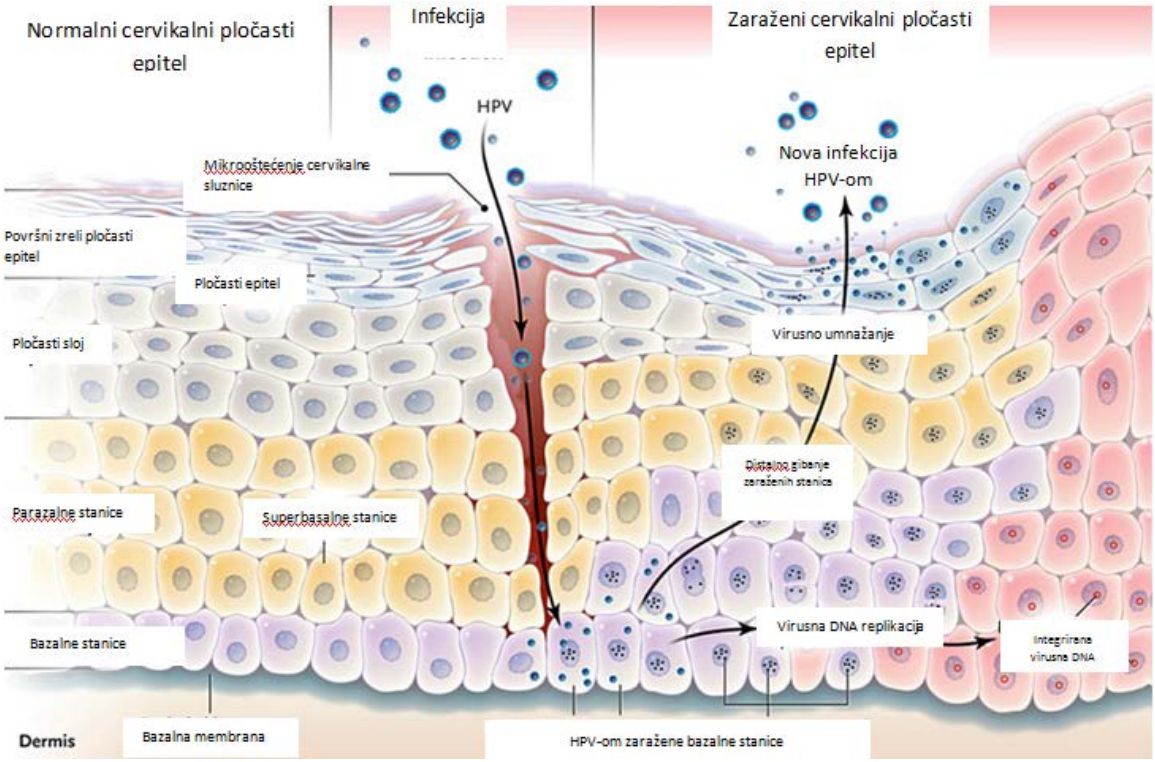


Slika 8. HPV (slika preuzeta iz literaturnog navoda Zekan i sur., 2009.).

Do danas je potpuno genotipizirano više od 100 tipova HPV-a. Svi humani papiloma virusi pokazuju izraženu sklonost inficiranju epitela te varijabilnost s obzirom na mjesta epitela u kojemu se nalaze i na vrstu oštećenja koje uzrokuju. U genitalnoj regiji otkriveno je oko 40 genotipova HPV-a, od kojih najviše 15 može uzrokovati zloćudne promjene vrata maternice (Division of STD Prevention, 1999.).

HPV je glavni etiološki čimbenik zloćudne preobrazbe epitela vrata maternice. U tkivu raka vrata maternice u više od 99,7 % slučajeva može se izolirati DNA visokorizičnoga genotipa HPV-a (Smith i sur., 2007.). HPV 16 je dominantno onkogeni genotip (51 %) u skvamoznim lezijama, dok je HPV 18 najčešći (56 %) uzročnik glandularnog karcinoma. Ta dva genotipa uzrokuju 74 % svih malignih promjena (Bohmer i sur., 2003.). Onkogeni tipovi HPV-a imaju sposobnost ugradnje vlastita genoma u genom stanice domaćina (Zekan i sur., 2005.). Brojna epidemiološka istraživanja upućuju na činjenicu da je genitalna infekcija HPV-om najčešća virusna spolno prenosiva bolest (Bosch i sur., 1995.). Rizik od infekcije tijekom

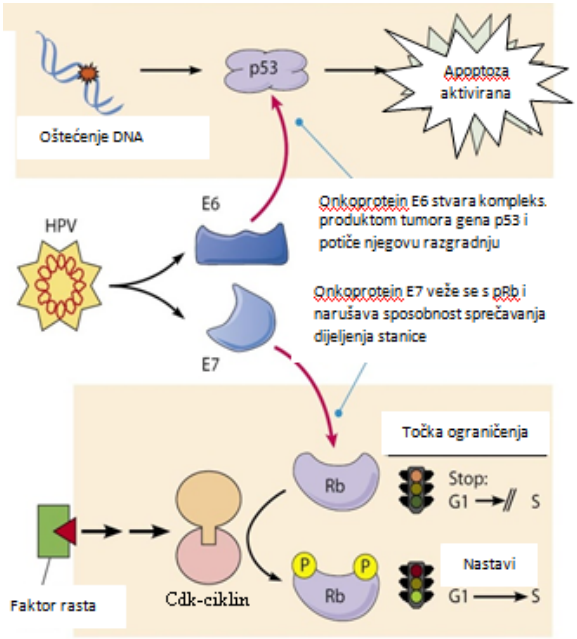
života najmanje je 50 %. Vrh je pojavnosti infekcije HPV-om između 19. i 22. godine života. U većini slučajeva riječ je o latentnoj infekciji s prosječnim trajanjem oko 12 mjeseci. U više od 90 % inficiranih žena opaža se spontana eliminacija HPV-a (izlječenje) tijekom sljedeće 2 godine. Perzistencija infekcije nakon prve godine jest 25 – 30 %, a nakon druge godine oko 9 %. Nužan preduvjet zloćudne promjene stanice jest trajna infekcija onkogenim genotipom HPV-a (Munoz i sur., 2003.; Walboomers i sur., 1999.).



Slika 9. Infekcija HPV-om (slika preuzeta iz literaturnog navoda Kahn, 2009.).

U prvom koraku dolazi do mikrotraume i infekcije bazalnoga sloja višeslojnog pločastog epitela genitalnoga trakta (slika 9.) (Kahn, 2009.). Virus se veže za staničnu membranu, ulazi u stanicu i razmnožava se u jezgri. Najčešće nastaje latentna virusna infekcija (stvaranje stabilnoga neintegriranog episoma, tzv. episomsko razmnožavanje). Latentno, minimalno umnažanje prati i ne remeti diobu bazalnih stanica. U maloga broja zaraženih dolazi do proliferacije pločastog epitela uz stvaranje bradavica i šiljastih kondiloma tzv. vegetativna replikacija (Schiffman i sur., 2007.). Ključnu ulogu u replikaciji virusa imaju virusni proteini E6 i E7 (slika 10.; Zekan i sur., 2011.). Vezanje onkoproteina E7 za protein Rb aktivira transkripcijski faktor E2F, koji je odgovoran za ekspresiju proteina potrebnih za replikaciju DNA. Nepravilnosti u tijeku S-faze staničnog ciklusa u fiziološkim uvjetima

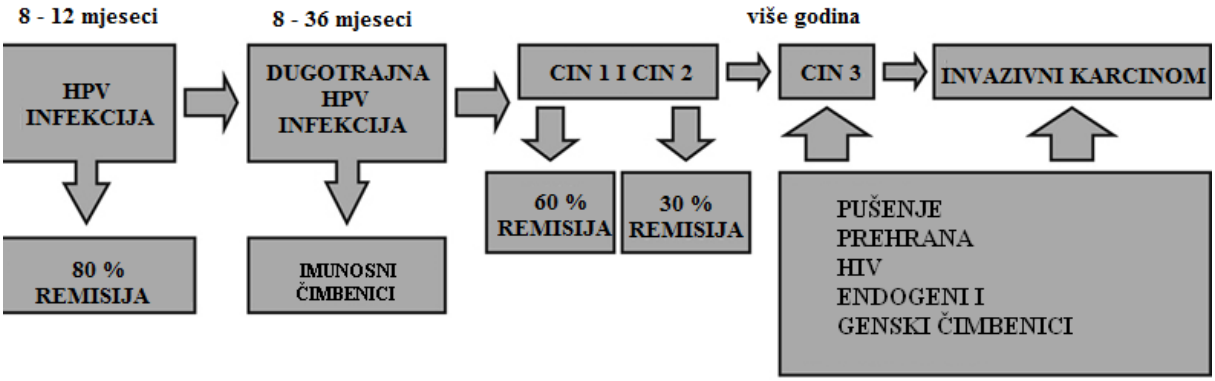
dovode do apoptoze posredovane proteinom p53. Međutim, u stanicama inficiranim HPV-om taj je proces onemogućen djelovanjem proteina E6, koji dovodi do proteolitičke razgradnje p53. Stalna aktivnost virusnih proteina E6 i E7 dovodi do nestabilnosti genoma, nakupljanja mutacija, gubitka kontrole staničnog rasta i na kraju do razvoja karcinoma. Putem prirođenog i stečenog imunosnog odgovora organizam prepoznaje i suzbija strane agense, ali, u slučaju infekcije HPV-om, taj je odgovor pokatkad nedovoljan. Infekcija HPV-om dovodi do gubitka ekspresije citokina djelovanjem E6 i E7 onkoproteina, posebice potiskivanjem ekspresije gena za interferon (Zekan i sur., 2011.).



Slika 10. Replikacija HPV-a (preuzeto iz literaturnog navoda Zekan i sur., 2011.)

Perzistirajuća infekcija HPV-om visokog rizika zaslužna je za nastanak i napredovanje CIN-a. No kao što je već spomenuto, više od 90 % infekcija HPV-om, neovisno o tome jesu li uzrokovale citološke promjene ili nisu, obično prolaze bez posljedica za nekoliko mjeseci ili u dvije godine (Stanley, 2006.). Stoga ta činjenica nameće dvojbu je li sama infekcija dovoljna za razvoj zloćudne bolesti. Brzi razvoj bolesti u imunosno kompromitiranih bolesnica te skraćeni vremenski interval od početka infekcije do invazivnog raka vrata maternice upućuje na važnost cjelokupnoga imunosnog sustava u liječenju infekcije, ali i zaustavljanja ili usporavanja procesa. U relativno zdrave osobe od infekcije HPV-om do histološki potvrđenog CIN 3 potrebno je u prosjeku od 7 do 15 godina (Bosch i sur., 2003.; Bosch i sur., 2007.). Infekcija HPV-om visokog rizika je nužna, ali tek ako je udružena s drugim čimbenicima

dovodi do nastanka i napredovanja CIN-a (Di Domenico i sur., 2012.). Neki od čimbenika rizika jesu pušenje, infekcije drugim mikroorganizmima, promjene hormonskoga statusa, imunosupresija te oksidacijski stres. Aktivno ili pasivno pušenje cigareta jedan je od mogućih čimbenika procesa karcinogeneze na vratu maternice (Slattery i sur., 1989.). Pušenje potiskuje pravodobnu imunosnu reakciju smanjujući broj Langerhansovih stanica u genitalnom epitelu, što rezultira smanjenom efikasnošću lokalne imunosti na HPV (Hawthorn i sur., 1988.; Viac i sur., 1990.). Jedan od mogućih čimbenika jest i infekcija drugim mikroorganizmima, zbog čega dolazi do narušavanja integriteta cervikalnog epitela i njegove sposobnosti popravka (Castle i sur., 2003.). Hormonska kontracepcija koja se primjenjuje duže od pet godina povećava rizik za razvoj CIN-a za 2–4 puta, a povećane doze estrogena i stanje imunosupresije u trudnoći dovode do jačeg umnažanja HPV-a (Moreno i sur., 2002., Schneider i sur., 1987.). Bolesti koje izazivaju sustavnu imunosnu supresiju kao infekcija HIV-om, Hodgkinova bolest, leukemije, kolagenske vaskularne bolesti te ijatrogeno izazvana imunosupresija u bolesnica s transplantiranim bubregom imaju povećanu učestalost CIN-a u usporedbi s ukupnom populacijom (Clifford i sur., 2006.; Sillman i sur., 1984.). Jedan od čimbenika razvoja CIN-a smatra se i prehrana (Garcia-Closas i sur., 2005.). Nedostatak vitamina A ili beta-karotena te smanjeni unos vitamina C i E povisuju učestalost CIN-a (Patterson i sur., 1997.). Nadalje, istraživanja su pokazala promjene u lipidnoj peroksidaciji i antioksidacijskim sustavima organizma te su potvrdila prisutnost oksidacijskoga stresa u žena s CIN-om i rakom vrata maternice (Di Domenico i sur., 2012.; Looi i sur., 2008.). Povećani oksidacijski stres smatra se mogućim čimbenikom za razvoj i napredovanje CIN-a, ali i jednim od čimbenika razvoja raka vrata maternice.



Slika 11. Model karcinogeneze raka vrata maternice (slika preuzeta iz literaturnog navoda Basta i sur., 2006.)

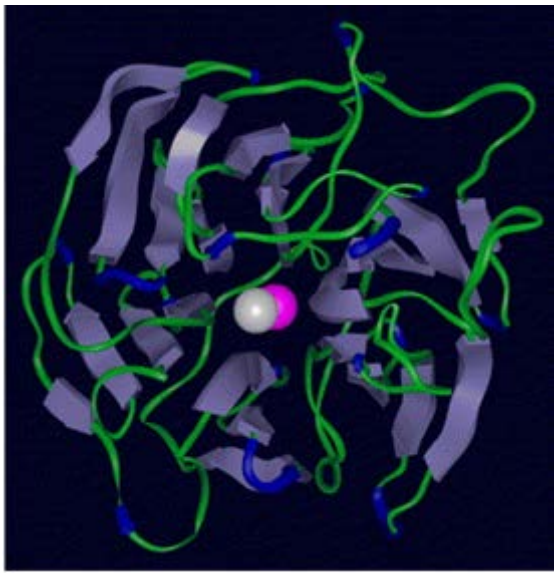
2.1.3. Oksidacijski stres i premaligne promjene vrata maternice

Sluznica vrata maternice inficirana HPV-om izložena je reaktivnim spojevima kisika (ROS) i reaktivnim spojevima dušika (RNS) koje zajednički označujemo nazivom RONS (De Marco, 2013.). U ROS ubrajamo slobodne radikale superoksid, hidroksilni radikal, peroksilni radikal, alkoksilni radikal i hidroperoksilni radikal, a u spojeve koji nisu radikali ubrajamo vodikov peroksid, hipoklorit i singletni kisik. U RNS ubrajamo slobodne radikale dušikov(II) oksid i dušikov(IV) oksid te spojeve koji nisu radikali nitritnu kiselinu i peroksinitrit (Čepelak, 2009). RONS nastaju u oksidacijskim procesima u stanici, primjerice pri redukciji molekularnog kisika u vodu u mitohondrijima te u vrijeme mikrosomalne peroksisomalne oksidacije. Osim toga, RONS nastaju tijekom upale, infekcije, imunosnih reakcija, izlaganjem ultravioletnom zračenju, ionizirajućemu zračenju te kod mehaničkog i kemijskoga stresa (De Marco, 2013.). U normalnim uvjetima između stvaranja i neutralizacije RONS-a postoji ravnoteža koja osigurava minimalne promjene bioloških molekula. U stanicama i tkivima postoje antioksidacijski sustavi koji uklanjaju ove spojeve. Oksidacijski stres nastaje kada stvaranje RONS-a preraste sposobnost antioksidacijskih sustava da uklone te spojeve te dolazi do njihove reakcije s biološkim molekulama (proteini, lipidi i DNA), uz molekulske i fiziološke promjene (Shacter i sur., 2000.). U procesu karcinogeneze biokemijski učinci RONS-a očituju se genskim oštećenjima, strukturnim oštećenjima proteina te promjenom funkcije proteina zbog promjene transkripcije gena (De Marco, 2013.). Obično se pretpostavlja, premda nema sigurnih znanstvenih dokaza, da stanje stanice u ranim fazama virusne infekcije (faza virusne adsorpcije, faza ulaska virusa u stanicu i faza virusne ekspresije) čini ključni događaj za ishod infekcije HPV-om koja će, ovisno o tome, rezultirati spontanim ozdravljenjem, produktivnom infekcijom ili neoplastičnom transformacijom (De Marco, 2013.). Nakon virusne infekcije, temeljne točke u karcinogenezi jesu uspješnost i točnost replikacije DNA. Oksidacijski stres može snažno utjecati na replikaciju DNA, pri čemu će se stvoriti uvjeti za učinkovitu virusnu integraciju u stanicu domaćina (De Marco, 2013.). Udružen s virusnim onkogenim djelovanjem oksidacijski stres stvara sinergističko okruženje pogodno za umnažanje i integraciju HPV-a u stanicu domaćina (Boner i sur., 2002.). Nadalje, oksidacijski stres sudjeluje u potiskivanju apoptoze, što je temeljni mehanizam za razvoj karcinogeneze, tj. dopuštanja opstanka transformiranih klonova (De Marco, 2013.).

Stoga se smatra da postoji sinergistički učinak genotoksičnoga djelovanja oksidacijskoga stresa i genomske nestabilnosti stanice izazvane infekcijom HPV-om na jednoj ili više molekulskih faza neoplastične inicijacije i njezine progresije (De Marco, 2013.).

2.2. PARAOKSONAZA

Porodicu gena *pon* čine tri člana *pon1*, *pon2* i *pon3*. Geni su locirani na dugome kraku kromosoma 7 i dijele veliku strukturnu sličnost. Geni pokazuju oko 70 % podudarnosti u nukleotidnome slijedu i oko 60 % podudarnosti u slijedu aminokiselina. Produkti tih gena jesu enzimi paraoksonaza 1 (PON1), paraoksonaza 2 (PON2) i paraoksonaza 3 (PON3). Sva tri enzima posjeduju antioksidacijsko djelovanje. Najistraživaniji član ove porodice enzima jest PON1 (Grdić Rajković i sur.,, 2011.). Među ostalim, PON1 se smatra jednim od sakupljača slobodnih radikala i njihovih metaboličkih produkata te se ubraja u enzimski antioksidacijski sustav organizma (Sozmen i sur., 2008.).



Slika 12. Struktura PON1 (slika preuzeta iz literaturnog navoda Yeung i sur., 2004.)

2.2.1. Paraoksonaza 1

PON1 se sintetizira u jetri, a nakon sinteze izlučuje se u krv, gdje je najvećim dijelom vezan za HDL. Manjim se djelom PON1 nalazi vezan i na postprandijalnim hilomikronima i na lipoproteinu vrlo niske gustoće (VLDL). PON1 je protein izgrađen od 354 aminokiselinska ostatka, relativne molekulske mase oko 43 – 45 kDa. PON1 na svojem N-kraju ima hidrofobni signalni peptid koji je ključan za povezivanje PON1 s HDL-om (Draganov i sur., 2004.; Fuhrman i sur., 2005.; Mackness i sur., 1998a.). Nakon izlučivanja iz stanica PON1 se s pomoću hidrofobnoga signalnog peptida na N-kraju veže za fosfolipide HDL-a. Povezanost PON1 s HDL-om nužna je za održavanje normalne serumske aktivnosti ovog enzima. HDL

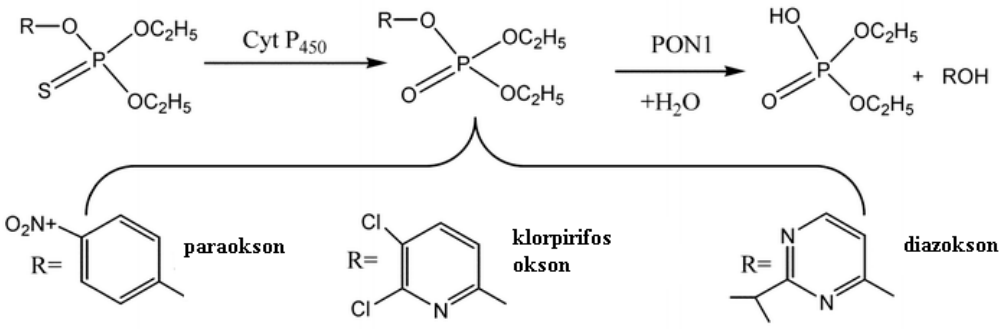
stimulira izlučivanje i stabilizira izlučeni enzim te osigurava amfipatsku okolinu koja štiti hidrofobno područje enzima na N-kraju i koje je vjerojatno nužno za interakciju enzima sa supstratima. Većina PON1 vezana je za HDL koji sadržava apoAI. Ovaj apolipoprotein nije nuždan za vezanje PON1 na HDL, ali je bitan za stabilizaciju enzima i za enzimsku aktivnost. Oko 30 % ukupnog PON1 vezano je za HDL koji sadržava klastrin (apolipoprotein J) (Aviram, 2004a.; Deakin i sur., 2004.; James i sur., 2004.; Sorenson i sur., 1999.).

HDL u plazmi čini heterogenu skupinu lipoproteina koji imaju dva zajednička svojstva, veliku gustoću (> 1,063 g/mL) i malu veličinu (5 – 17 nm). PON1 nije vezan za sve frakcije HDL-a. Manje od 10 % ukupnog HDL-a reagira s protutijelima na PON1 (von Eckardstein i sur., 2001.; James i sur., 2004.).

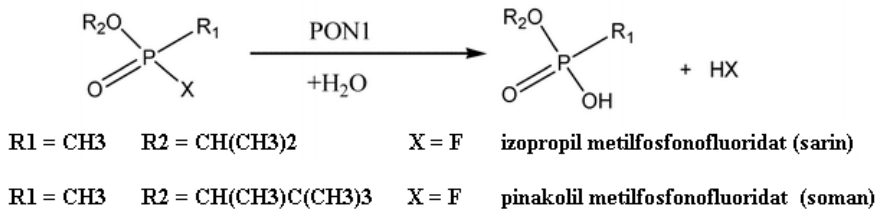
2.2.2. Uloga paraoksonaze 1

PON1 je enzim koji svojom paraoksonaznom, arilesteraznom i laktonaznom aktivnošću hidrolizira široki spektar supstrata. PON1 također posjeduje i nisku razinu peroksidazne aktivnosti i aktivnost sličnu fosfolipazi A2 (Draganov i sur., 2004.; Ng i sur., 2005.).

PON1 hidrolizira oksone paraokson, klorpirifos okson i diazokson, toksične metabolite organofosfornih insekticida parationa, klorpirifosa i diazinona (slika 13.). Hidrolizira i neurotoksične agense kao što su sarin i soman (slika 14.) (Davies i sur., 1996.; Draganov i sur., 2004.).

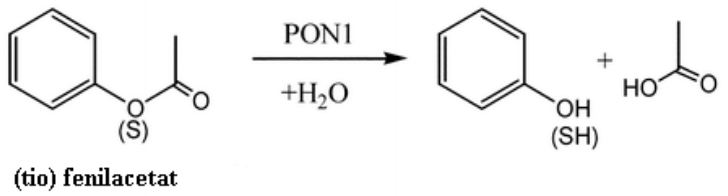


Slika 13. Hidroliza oksona (slika preuzeta iz literaturnog navoda Draganov i sur., 2004.).

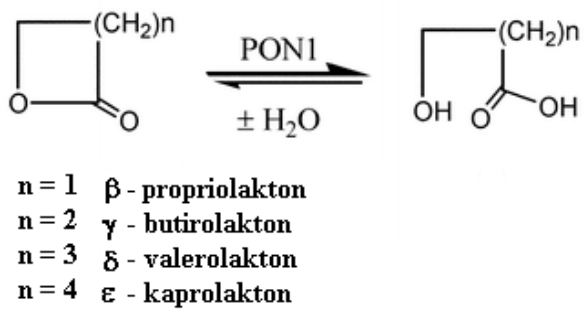


Slika 14. Hidroliza neurotoksičnih agensa (slika preuzeta iz literaturnog navoda Draganov, 2004).

Nadalje, PON1 hidrolizira aromatske estere primjerice fenilacetat, tiofenilacetat i 2–naftilacetat (slika 15.), te različite aromatske i alifatske laktone i ciklične karbonate, primjerice lakton homogentizinske kiseline, dihidrokumarin, γ–butirolakton i homocistein tiolakton (slika 16.). PON1 također katalizira reverzibilnu reakciju laktonizacije γ i δ–hidroksikarboksilnih kiselina (slika 16.) (Billecke i sur., 2000.; Draganov i sur., 2004.; Jakubovski i sur., 2000.; Teiber i sur., 2003.).



Slika 15. Hidroliza (tio)fenilacetata (slika preuzeta iz literaturnog navoda Draganov i sur., 2004.)



Slika 16. Hidroliza laktona i laktonizacija hidroksikarboksilnih kiselina s pomoću PON1 (slika preuzeta iz literaturnog navoda Draganov i sur., 2004.).

PON1 posjeduje i antiaterogeno djelovanje; štiti HDL i LDL od oksidacije i uništava biološki aktivne oksidirane lipide na lipoproteinima i u arterijskim stanicama. Još uvijek nije poznat fiziološki supstrat PON1 te isto tako nije poznat točan mehanizam njegova antiaterogenoga djelovanja. Dosadašnja su istraživanja pokazala da je laktonazna aktivnost najvjerojatnije fiziološka aktivnost PON1, a kao potencijalni fiziološki supstrati predloženi su neki od laktona prisutnih u hrani, lijekovima (statin, spirinolakton) ili derivatima masnih kiselina koji nastaju zbog oksidacije, npr. lakton 5–hidroksi–6E,8Z,11Z,14Z–eikosatetraenoične kiseline (5–HETE lakton) koji se nalazi na HDL-u (Aviram, 2004a.; Su i sur., 2009.). U nedostatku znanja o fiziološkim supstratima, aktivnost PON1 najčešće se određuje sa supstratima paraoksonom (paraoksonazna aktivnost) ili fenilacetatom (arilesterazna aktivnost).

Uvjeti za hidrolitičku i antioksidacijsku aktivnost PON1 nisu jednaki. PON1 posjeduje dva vezna mjesta za kalcij. Jedno je vezno mjesto važno za stabilizaciju nativne strukture, a drugo je bitno za katalitičku aktivnost. Kalcij je bitan za paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 te vezanje kalcija s kelatirajućim sredstvima dovodi do inhibicije enzimske aktivnosti. S druge pak strane, kalcijevi ioni nisu nužni za sprečavanje oksidacije LDL-a koja je izazvana bakrovim ionima. U strukturi PON1 mnogo je aminokiselinskih ostataka koji su važni za organofosfataznu i arilesteraznu aktivnost. Među ostalim, potrebno je izdvojiti tri cisteinska ostatka, cisteinski ostatak na poziciji 284 (C284) koji je slobodan i cisteinske ostatke na pozicijama 42 (C42) i 353 (C353) koji su vezani disulfidnom vezom. C284 nije ključan za paraoksonaznu/arilesteraznu aktivnost budući da zamjena ovoga aminokiselinskog ostatka sa serinom ili alaninom smanjuje, ali ne dovodi do potpuna gubitka ovih aktivnosti. S druge pak strane, ovaj je aminokiselinski ostatak nuždan za sprječavanje oksidacije LDL-a. Smatra se da je C284 smješten u blizini aktivnoga središta enzima te da je bitan za orijentaciju i vezanje supstrata. Zamjena C42 i C353 alaninom rezultirala je inaktivacijom i smanjenim izlučivanjem enzima te se stoga ovi aminokiselinski ostatci smatraju važnima za izlučivanje i katalitičku aktivnost PON1. Dosadašnja istraživanja nisu uspjela dokazati postojanje dva katalitička mjesta pa Aviram i suradnici smatraju da se katalitičko mjesto odgovorno za hidrolitičku i ono odgovorno za antioksidacijsku aktivnost preklapaju (Aviram i sur., 1998.; Draganov i sur., 2004.; Grdić Rajković i sur., 2011., Josse i sur., 1999.; Kuo i sur., 1998.; Yeung i sur., 2004.).

2.2.3. Varijacije u aktivnosti paraoksonaze 1

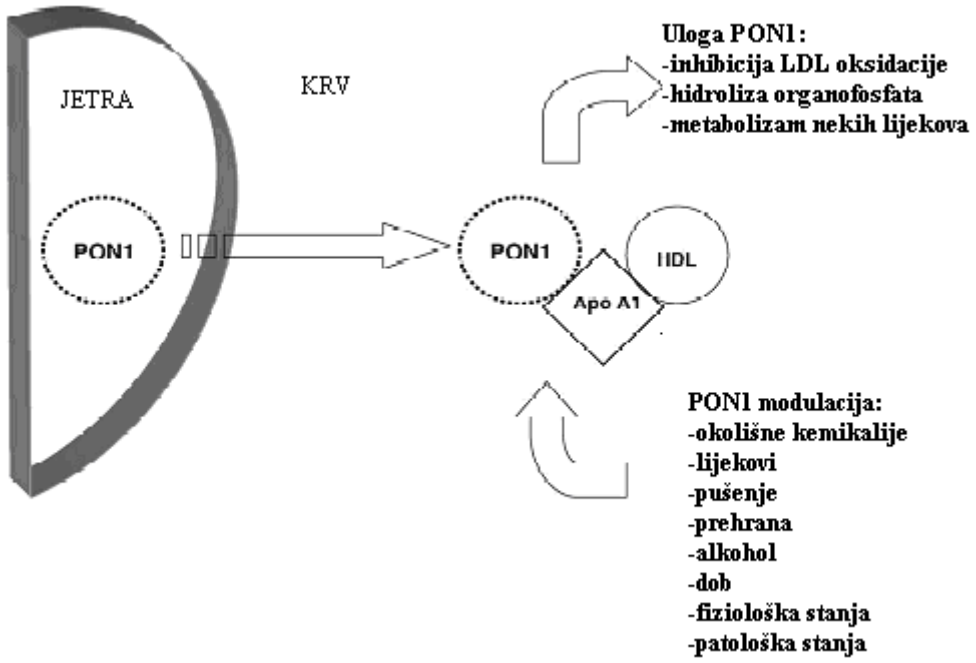
Aktivnost i koncentracija PON1 pokazuju znatnu interindividualnu varijaciju. Aktivnost PON1 varira do 40 puta, dok koncentracija PON1 varira do 13 puta. Mnoga su istraživanja dokazala utjecaj različitih negenskih i genskih čimbenika na aktivnost i koncentraciju PON1 u serumu. Negenski čimbenici obuhvaćaju razne okolišne čimbenike te fiziološka i patološka stanja, dok genski čimbenici obuhvaćaju velik broj polimorfizama u promotorskoj, kodirajućim i intronskim regijama gena *pon1* (Costa i sur., 2005.; Draganov i sur., 2004.; Deakin i sur., 2004.; Durrington i sur., 2002.; Marchegiani i sur., 2008.).

Aktivnost PON1 smanjuje prehrana bogata trans-nezasićenim masnim kiselinama i prehrana bogata mašću s visokim udjelom oksidiranih lipida. S druge pak strane, aktivnost PON1 povećava se djelovanjem oleinske kiseline iz maslinova ulja. Porast aktivnosti također je uočen nakon konzumacije soka od nara koji je bogat polifenolima i antioksidansima (Costa i sur., 2005.; Deakin i sur., 2004.).

Istraživanja su pokazala da i pušenje i konzumacija alkohola utječu na aktivnost enzima. Umjerena konzumacija piva, crnog vina i žestokih pića dovodi do povećanja i aktivnosti i koncentracije PON1. Istodobno umjereno konzumiranje alkohola dovodi do porasta i koncentracije HDL-a i apoAI što u konačnici može rezultirati porastom koncentracije enzima. Međutim, rezultati nisu dosljedni jer neka istraživanja nisu dovela u vezu konzumiranje alkohola i aktivnost PON1. Istraživanja su pokazala da ekstrakt dima cigarete dovodi do smanjenja aktivnosti PON1, a učinak je ovisan o dužini izloženosti i koncentraciji ekstrakta. Učinak je cigaretnog dima, čini se, reverzibilan jer bivši pušači imaju aktivnosti PON1 kao i nepušači (Costa i sur., 2005.; Deakin i sur., 2004.; Marchegianini i sur., 2008.; Nishio i sur., 1997.).

Aktivnost PON1 ovisna je o dobi. Aktivnost je vrlo niska nakon rođenja, postupno se povećava i dostiže vrijednosti kao i kod odraslih već u 6. – 15. mjesecu života. Do smanjenja aktivnosti dolazi u starijoj životnoj dobi (Costa i sur., 2005.; Deakin i sur.; 2004.).

Fiziološka i patološka stanja utječu na aktivnost PON1. Primjerice, snižena aktivnost PON1 nađena je u trudnica isto kao i u bolesnika koji boluju od šećerne bolesti tipa 1 i tipa 2, kroničnog zatajenja bubrega koji se liječe hemodijalizom, hipertireoidizma, kronične bolesti jetre. Snižena je aktivnost povezana i s inzulinskom rezistencijom, upalom i visokom koncentracijom kolesterola (Costa i sur., 2005.; Deakin i sur.; 2004.; Mackness i sur., 2004a.; Mackness i sur., 2002.).



Slika 17. Biološki učinak i modulacija PON1 aktivnosti (slika preuzeta iz literaturnog navoda Costa i sur., 2005.)

Do danas je opisano više od 160 polimorfizama u kodirajućim, intronskim i promotorskoj regiji gena *pon1*. Dva su polimorfizma u kodirajućoj regiji najviše istraživana i to su polimorfizmi Q192R i L55M (Costa i sur., 2005.).

Polimorfizam Q192R označuje zamjenu aminokiseline glutamina argininom na poziciji 192. Ta je zamjena rezultat zamjene nukleotida A s G u egzonu 6 gena *pon1*, što rezultira zamjenom kodona CAA u CGA. Aloenzimi Q192 i R192 razlikuju se u afinitetu i u katalitičkoj aktivnosti prema raznim supstratima. Opažena razlika u enzimskoj aktivnosti u usporedbi s različitim supstratima posljedica je toga što je arginin na poziciji 192 važan aminokiselinski ostatak aktivnoga središta enzima. Aloenzim R192 hidrolizira paraokson šest puta brže nego aloenzim Q192. Nasuprot tomu, aloenzim Q192 hidrolizira sarin, soman i diazokson brže u odnosu prema aloenzimu R192. *In vivo* i *in vitro* pokusu nisu dokazali isti učinak tih aloenzima na ispitivane supstrate. Aloenzim R192 *in vitro* pokazuje veći zaštitni učinak od toksičnoga djelovanja paraoksona i klorpirifos oksona, dok aloenzim Q192 ima veći učinak prema diazoksonu. PON1 *in vivo* ima važnu ulogu u detoksifikaciji diazoksona i klorfirifos oksona, ali ne i paraoksona. Pokusi s miševima koji nemaju gen za PON1 koji su primili jednake količine aloenzima Q192 i R192 pokazali su da oba aloenzima *in vivo* pružaju jednaki zaštitni učinak prema diazoksonu te da je aloenzim R192 učinkovitiji u zaštiti od klorpirifos oksona. *In vivo* se pokazalo da nijedan aloenzim ne pruža zaštitu od toksičnoga

djelovanja paraoksona. Nadalje, ti aloenzimi se razlikuju u brzini hidrolize nekih laktona i karbonilnih estera. S druge pak strane, oba aloenzima hidroliziraju supstrat fenilacetat podjednakom brzinom. Aloenzim Q192 efikasniji je u zaštiti LDL-a od oksidacije *in vitro* negoli aloenzim R192 (Adkins i sur., 1993.; Aviram i sur., 1998.; Billecke i sur., 2000.; Davis i sur., 1996.; Deakin i sur., 2004.; Harel i sur., 2004.; Li i sur., 2000.; Mackness i sur, 1999.; Mackness i sur., 1998b.).

Polimorfizam L55M označuje zamjenu aminokiseline leucina metioninom na poziciji 55, a to je posljedica zamjene nukleotida T s A u egzonu 3 gena *pon1*, što dovodi do zamjene kodona TTG u ATG. Polimorfizam L55M utječe na razinu mRNA, na koncentraciju i aktivnost PON1. Aloenzim M55 povezan je s nižom razinom mRNA s nižom koncentracijom i aktivnošću enzima u usporedbi s aloenzimom L55. Nasuprot tomu, aloenzim M55 je učinkovitiji u sprečavanju oksidacije LDL-a. Istraživanja su pokazala da je aloenzim L55 stabilniji i otporniji na proteolizu, što djelomice objašnjava povezanost aloenzima L55 s većom serumskom koncentracijom (Adkins i sur., 1993.; Blatter Garin i sur., 1997.; Brophy i sur., 2000.; Deakin i sur., 2004.; Harel i sur., 2004.; Leviev i sur., 2001.; Leviev i sur., 2000.; Leviev i sur., 1997.; Mackness i sur., 1998b.).

U promotorskoj regiji gena postoji barem pet polimorfizama koji se nalaze na pozicijama – 909 (G ili C), – 832 (A ili G), –162 (A ili G), –126 (C ili G) i –108 (C ili T), kada se baza koja prethodi startnom kodonu označi s –1 (Deakin i sur., 2004.). Istraživanja su pokazala da polimorfizmi na pozicijama –108, – 832, –162 i – 909 utječu na ekspresiju gena. –108C, –832A, –162A i –909G imaju veću razinu ekspresije te, posljedično, i veću koncentraciju i aktivnost u odnosu na –108T, –832G, –162G i –909C. Analiza doprinosa pojedinačnog polimorfizma u promotorskoj regiji gena *pon1* na serumsku koncentraciju i aktivnost PON1 komplicirana je zbog postojanja neravnotežne povezanosti između polimorfizama promotorske regije te između polimorfizama u promotorskoj regiji i polimorfizama Q192R i L55M u kodirajućim regijama gena *pon1* (Brophy i sur., 2001a.; Brophy i sur., 2001b.; Deakin i sur., 2004.; Draganov i sur., 2004.; Leviev i sur., 2000.; Suehiro i sur., 2000.).

Smatra se da polimorfizam –108C>T najviše pridonosi varijaciji PON1 u serumu i da objašnjava oko 23 – 24 % ukupne varijacije PON1. Dio promotorske regije od oko 200 pb koji sadrži polimorfno mjesto –108 čini najvažniju regulacijsku regiju promotora *pon1*. Pokazano je da je polimorfno mjesto –108 smješteno unutar veznoga mjesta za transkripcijski faktor Sp1 (specifični protein 1). Ako je na poziciji –108 prisutan nukleotid T, narušen je

slijed koji prepoznaje transkripcijski faktor Sp1 te je vezanje tog faktora u tom slučaju slabije nego kada je na toj poziciji nukleotid C. Treba svakako napomenuti da je promotorska aktivnost –108T mnogo manja od – 108C, ali je ona prisutna, što upućuje na to da ova regija samo djelomično regulira transkripciju gena *pon1* (Deakin i sur., 2004.; Draganov i sur., 2004.).

2.2.4. Fenotip paraoksonaze 1

PON1 je u organizmu prisutan u dvama genski određenim oblicima aloenzima, aloenzim A i aloenzim B koji oba posjeduju paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost. Aloenzim B posjeduje relativno visoku paraoksonaznu aktivnost i ta je aktivnost jače stimulirana s 1M NaCl u odnosu prema aloenzimu A. Ovo se svojstvo aloenzima iskorištava u svrhu određivanja fenotipa PON1 (Sozmen i sur., 2008.). Molekularna osnova polimorfne razdiobe paraoksonazne aktivnosti PON1 jest polimorfizam Q192R. Humbert i suradnici ustvrdili su da se na poziciji 192 u ispitanika s aloenzimom B nalazi arginin, dok se kod ispitanika s aloenzimom A nalazi glutamin. Fenotip AA odgovara genotipu QQ, fenotip AB genotipu QR, a fenotip BB genotipu RR (Humbert i sur., 1993.). Dva aloenzima imaju različite prometne brojeve za supstrat paraokson i slične prometne brojeve za supstrat fenilacetat (Eckerson i sur., 1983.). Važno je napomenuti da, budući da arilesterazna aktivnost nema polimorfnu razdiobu, ona služi za procjenu koncentracije PON1 u serumu. Arilesterazna aktivnost korelira s koncentracijom PON1 neovisno o genotipu polimorfizma Q192R, dok paraoksonazna aktivnost korelira samo s koncentracijom PON1 unutar određenog genotipa tog polimorfizma (Kujiraoka i sur., 2000.; Nevin i sur., 1996.;).

Paraoksonazna aktivnost PON1 raspodijeljena je bimodalno i ta aktivnost omogućuje razdvajanje fenotipa AA (homozigoti za nisku aktivnost) od fenotipa AB (heterozigoti) i BB (homozigoti za visoku aktivnost). Nasuprot tomu, arilesterazna aktivnost PON1 raspodijeljena je unimodalno. Danas se za određivanje PON1 fenotipa rabi metoda s dvama supstratima. Razdioba je omjera paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 trimodalna i omogućuje razdvajanje sva tri fenotipa PON1. Međutim, takav omjer aktivnosti ne omogućuje uvijek razdvajanje fenotipa AB i BB pa se primjerice primjenjuju metode u kojima se, uz supstrat paraokson, rabi i supstrat diazokson, čime se postiže bolje razdvajanje AB i BB fenotipa (Eckerson i sur., 1983.; Furlong, 2008.).

Li i suradnici uvode 1993. termin status PON1. Status PON1 daje informaciju o funkcionalnim aloformama PON192 i o koncentraciji PON1 u serumu. Pokazalo se da je status PON1 bitan za određivanje rizika od različitih bolesti (Richter i sur., 2010.). Status PON1 određuje se upotrebom metode dvaju supstrata ili mjerenjem enzimske aktivnosti i koncentracije (Deakin i sur., 2004.).

2.2.5. Paraoksonaza 1 i oksidacijski stres

Porast slobodnih radikala i poremećaj antioksidacijskoga statusa važni su procesi koji sudjeluju u patofiziološkim mehanizmima različitih bolesti kao primjerice pri razvoju ateroskleroze, šećerne bolesti i raka. Enzimski i neenzimski antioksidacijski sustavi, kao primjerice superoksidna dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationska peroksidaza (GPx), PON1 i vitamin E važni su sakupljači slobodnih radikala i njihovih metaboličkih produkata te sudjeluju u održavanju normalnih staničnih funkcija i u sprječavanju razvoja bolesti (Sozmen i sur., 2008.).

Velik broj dosadašnjih istraživanja bazirao se na ispitivanjima uloge PON1 u razvoju ateroskleroze. Poznato je da HDL štiti LDL od oksidacije i umanjuje biološku aktivnost LDL-a. Antioksidacijsko i antiaterogeno djelovanje HDL-a pripisuje se, među ostalim, proteinima koji se nalaze na HDL-u, a jedan je od njih i PON1. PON1 štiti HDL i LDL od oksidacije i uništava biološki aktivne oksidirane lipide na lipoproteinima. PON1 štiti antiaterogenu ulogu HDL-a u reverznom transportu kolesterola sprječavajući njegovu oksidaciju. PON1 sudjeluje u razgradnji fosfolipidnih i kolesterol-esterskih lipidnih peroksida na LDL-a i HDL-a te također hidrolizira lipidne perokside u arterijskim stanicama i u makrofagima smanjujući njihovu aterogenost (Aviram, 2004a.; Aviram i sur. 2004b.; Aviram, 1999a.; Aviram i sur., 1999b; Draganov i sur., 2004.; Mackness i sur., 2004b.; Ng i sur., 2005.).

Oksidacijski stres i oksidirani LDL (oLDL) ne povezuju se samo s razvojem ateroskleroze nego, među ostalim, i s razvojem raka. Djelovanje ROS-a na biološke membrane i/ili lipoproteine dovodi do oksidacijskih promjena polinezasićenih masnih kiselina u procesu koji se naziva lipidnom peroksidacijom. Lipidna peroksidacija dovodi do poremećaja membranske fluidnosti, smanjenja membranskog potencijala, nakupljanja mutagenih lipidnih epoksida, hidroperoksida, alkoksila i peroksilnih radikala i do povećanog rizika od razvoja metastaza (Delimaris i sur., 2007.). Oksidacijski stres uzrokuje oksidacijske

modifikacije LDL-a u subendotelnom prostoru arterijske stijenke. Određena količina oLDL-a iz tog se prostora oslobađa u krvotok. Tijekom oksidacije LDL-a dolazi do oksidacijskih promjena i proteina i lipida te do nastajanja metabolita lipidne peroksidacije. Istraživanja su pokazala da je oLDL nezavisni mitogeni faktor koji inducira proliferaciju ili staničnu smrt te može pridonijeti razvoju i progresiji raka povećavajući otpuštanje citokina i faktora rasta (Delimaris i sur., 2007.). Dosadašnja istraživanja nisu razjasnila odražava li oLDL oksidacijski stres koji nastaje zbog razvoja raka ili je uključen u maligni proces kao neovisni rizični čimbenik. Istraživanja pokazuju pozitivnu korelaciju između povećane koncentracije oLDL-a i povećanog rizika primjerice od raka debeloga crijeva, dojke i ovarija (Delimaris i sur., 2007.; Suzuki i sur., 2004.; Zabirnyk i sur., 2010.).

3. ISPITANICE I METODE

3.1.ISPITANICE

3.1.1. Ispitanice s premalignim promjenama vrata maternice

Ispitivanje je provedeno u uzorcima 65 žena s CIN-om. U svih je ispitanica proveden citološki probir (Papa-test). Jednokratnim špatulama po Ayreu za uzimanje ektocervikalnih i endocervikalnih uzoraka uziman je obrisak iz stražnjeg svoda rodnice te s vrata maternice, a iz cervikalnog kanala obrisak je uzet „Cervical Brush četkicama“ za uzimanje endocervikalnog uzorka. Uzorci su preneseni na predmento staklace te fiksirani 96 %-tnim alkoholom i transportirani u citološki laboratorij. Nakon bojenja preprata aparatom za automatsko bojenje po Papanicolaou nalaz je klasificiran prema međunarodno priznatom obrascu „Zagreb 2002.“ (slika 18.; Ovanin-Rakić i sur., 2003.). Žene čiji su citološki nalazi klasificirani kao CIN upućene su u kolposkopsku ambulnatu na pregled. Svim je ispitanicama napravljen kolposkopski pregled vrata maternice te ciljana biopsija. Pregled je učinjen kolposkopom marke Leisegang, modelom 3MLW, uz uvećanje 7,5/15/30 puta. Rodnica i vrat maternice obrisani su 5 %-tnom octenom kiselinom kako bi se uklonila sluz, a zatim Lugolovom otopinom (1 - 5 %-tna jodna tinkturom koju sačinjava 126,5 mg/L joda). Vidljive morfološke promjene na vratu maternice klasificirane su prema kolposkopskom obrascu „Rio de Janeiro / Zagreb 2011.“ (slika 19.; www.hdgo.hr) prema najnovijoj kolposkopskoj klasifikaciji Rio de Janeiro 2011 (Bornstein, i sur., 2012., Grubišić, 2011.). S mjesta najveće morfološke promjene kliještima za biopsiju po Tischler Morganu uzet je uzorak tkiva koji je odložen u otopinu formalina. Uzorci tako dobivenoga tkiva vrata maternice obrađeni su standardnom patohistološkom metodom (PHD analiza) koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 %-tnom puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniranje i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozin (HE). Klasifikacija CIN-a određena je prema klasifikaciji tumora Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) (Devilee, 2003.). Prema toj klasifikaciji CIN promjene dijele se na CIN1, CIN2 i CIN3. U radu je rabljena „*The Bethesda claffications*“, klasifikacija kojom se CIN promjene dijele u skupinu niskog rizika (LG; od eng. *low grade*) koje su WHO klasifikacijom prema PHD analizi svrstane u skupinu CIN1 promjena i na skupinu visokog rizika (HG; od eng. *high grade*) koje su WHO klasifikacijom prema PHD analizi klasificirane u CIN2, CIN3 i karcinom *in situ* (CIS) promjene (Salomon i sur., 2002.).

Kriteriji za uključivanje u ispitivanu skupinu bili su patohistološka potvrda dijagnoze CIN-a. Kriteriji za isključivanje iz ispitivane skupine bili su: prisutnost bubrežne bolesti, jetrene bolesti, hipertenzije, srčanog udara, moždanog udara, angine pektoris, šećerne bolesti, policističnih jajnika, endometrioze te maligne bolesti. Nadalje, iz ispitivane su skupine isključene ispitanice koje uzimaju lijekove koji remete metabolizam masti i ugljikohidrata te trudnice.

Od 65 žena s patohistološki potvrđenim CIN-om 18 ispitanica imalo je promjene klasificirane kao CIN1, 23 ispitanice imale su promjene klasificirane kao CIN2, a 24 su ispitanice imale promjene klasificirane kao CIN3, odnosno skupinu LG je činilo 18, a skupinu HG 47 ispitanica.

Prezime i ime _____ Datum rodenja _____ Grad _____
Ulica i kuceni broj _____ Tel./Fax/e-mail _____ Datum _____

Zdravstvena jedinica _____ Br. pacijenta _____ Br. O.O. _____

P	Ciklus	ZM	Postmenopauza

KONTRACEPCIJA: HORMONI ULOZAK DRUGO BEZ

RANIJI DIJAGNOSTICKO – TERAPIJSKI POSTUPCI
Citoloska dg. _____
Histoloska dg. _____
Drugo _____
Lijecenje

Uzorak	Identif.br.	Br.lab.dnevnika
V	_____	_____
C	_____	_____
E	_____	_____
Vulva	_____	_____

KLINICKA DIJAGNOZA b.o. drugo

St. . 1 2 3
Gardnerella vag.
Trichomonoas vag.
Fungi
……

Kolposkopija
Endocervikoskopija

Datum:

NAPOMENE:

Potpis ordinariusa

PRIMJERENOST UZORKA

Zadovoljava za interpretaciju
Nezadovoljava za interpretaciju
Nije analiziran
Analiziran, ali nije moguca procjena abnormalnosti epitela
Tumacenje za primjerenost uzorka:
Netocna oznaka
Razbijeno staklo
Slabo fiksiran ili slabo ocuvan
Oskudan
Nema endocervikalnih cilindricnih stanica
Prekriven leukocitima
Prekriven krvi
Razvucen u vise nivoa
Prisutan strani materijal
Drugo:

OPCA PODJELA

Negativno na intraepitelnu ili invazivnu leziju
Abnormalne stanice (vidi opisnu dijagnozu)

OPISNA DIJAGNOZA

Mikroorganizmi

Bacillus vaginalis	Gardnerella vaginalis
Mije ana flora	Chlamydia trachomatis
Fungi	Promjene povezane s HSV
Trichomonas	Promjene povezane s HPV
Actinomyces	Drugo:

Drugi ne-neoplasticni nalazi
Reaktivne promjene na stanicama udru ene s:
upalom IUD
zracenjem drugo :
Reparatorni epitel **Rezervne stanice**

Parakeratoza **Diskeratoza** **Hiperkeratoza**
Cilindricne stanice nakon histerektomije
Endometralne stanice
izvan menzesa u postmenopauzi
Citohormonski status ne odgovara dobi i/ili anamnezi
Drugo

Abnormalne stanice

Skvamozne stanice
Atipicne skvamozne stanice (ASC)
Neodredenog znacenja (ASC-US)
Ne moze se iskljuciti HSIL (ASC-H)
Ne moze se iskljuciti invazija
Skvamozna intraepitelna lezija (SIL)
Dysplasia levis) CIN I) SIL niskog stupnja
Dysplasia media) CIN II
Dysplasia gravis > CIN III > SIL visokog stupnja
Carcinoma in situ
Plus: promjene povezane s HPV
Pocetna invazija se ne moze iskljuciti
Carcinoma planocellulare

Glandularne stanice
Atipicne glandularne stanice
Vjerojatno reaktivne promjene
Vjerojatno intraepitelna lezija
Vjerojatno invazivna lezija
Adenocarcinoma in situ (AIS)
Adenocarcinoma

Porijeklo:
Endocervikalne
Endometralne
Ekstrauterine
Neodredene

V	
C	
E	

Atipicne stanice neodredenog znacenja

Druge maligne neoplazme

UPUTE

Ponoviti pretragu	Kolposkopija
Ponoviti pretragu nakon lijecenja	Histologija
Ponoviti pretragu za 4 mjeseca	Daljnja obrada
Ponoviti pretragu za 6 mjeseci	Drugo
Redovita kontrola	

NAPOMENE:

Primljeno: Odgovoreno: Potpis citotehnicara: Potpis citologa: Procelnik Zavoda:

Slika 18. Citološki obrazac „Zagreb 2002.“ (Ovanin-Rakić i sur., 2003.).

KOLPOSKOPSKI NALAZ

Prezime i ime _____ datum rođenja _____
ulica i kućni broj _____ grad _____
tel./fax _____ e-mail _____
zdravstvena jedinica _____ br. pacijenta _____ br. OO_____

P: | Ciklus: | ZM: | ◻ postmenopauza

Kontracepcija: ◻ Hormonska ◻ IUD ◻ LNG-IUD ◻ drugo ◻ bez

st. č. 1 | 2 | 3 |
◻ gardnerella vaginalis
◻ trichomonas vag.
◻ fungi
_____
◻ PAPA uzet / br. _____
Napomene:
_____

Kolposkopija

RANIJI DIJAGNOSTIČKO-TERAPIJSKI POSTUPCI
Citološka dijagnoza: _____ ◻ HPV-HR: POZ!
Histološka dijagnoza: _____
Ranije operacije: ◻ biopsija ◻ LLETZ ◻ konizacija
Drugo: _____

I REZULTAT KOLPOSKOPIJE:

◻ Zadovoljavajući je za interpretaciju
◻ Nije zadovoljavajući za interpretaciju zbog:
- ◻ upalne promjene
- ◻ krvarenje
- ◻ ožiljci
- ◻ ostalo: .....

◻ Skvamokolumnarna granica:
- ◻ vidljiva je u cijelosti
- ◻ djelomično je vidljiva
- ◻ nije vidljiva

◻ Transformacijska zona:
- ◻ tip 1
- ◻ tip 2
- ◻ tip 3

II KOLPOSKOPSKI NALAZ JE:

◻ n o r m a l a n nalaz.
- ◻ izvorni pločasti epitel
  - ◻ zreli pločasti epitel
  - ◻ atrofija
- ◻ cilindrični epitel
  - ◻ ectopia
- ◻ metaplastični epitel
  - ◻ ovula Nabothii
  - ◻ otvori žljezda
- ◻ deciduoza u trudnoći

◻ a b n o r m a l a n nalaz.

III LOKALIZACIJA I RASPROSTRANJENOST NALAZA:

◻ Kolposkopska promjena nalazi se:
- ◻ unutar transformacijske zone
- ◻ izvan transformacijske zone

◻ Kolposkopska promjena je:
- ◻ solitarna i nalazi se na/između ..... sati,
  - ◻ unutar 1 kvadranta.
  - ◻ unutar ..... kvadranata.
- ◻ multiple promjene, koje se nalaze na ..... sati,
  - ◻ unutar 1 kvadranta.
  - ◻ unutar ..... kvadranata.

◻ Kolposkopska promjena zaprema:
< 25% < 50% < 75% >75 % površine cerviksa.

Datum: _____

Liječnik: _____

IV GRADUS KOLPOSKOPSKE LEZIJE:

◻ **G1 kolposkopski gradus / 'M I N O R C H A N G E S'**
'Low grade' kolposkopija:
- ◻ semitransparentni/nježni ABE.
- ◻ nježni mozaik
- ◻ nježne punktacije
- ◻ iregularan – 'geografski' rub

◻ **G2 kolposkopski gradus / 'M A I O R C H A N G E S'**
'High grade' kolposkopija:
- ◻ netransparentni/grubi ABE
- ◻ brzo nastupanje aceto-bijeljenja
- ◻ grubi/iregularni mozaik
- ◻ grube punktacije
- ◻ oštra granica lezije
- ◻ prominentni otvori žljezda
- ◻ 'inner border sign'
- ◻ 'ridge sign'

◻ **Nespecifičan nalaz:**
- ◻ leukoplakija
- ◻ erozija
- ◻ jod-negativni epitel

◻ **Suspektna invazija:**
- ◻ atipične krvne žile
- ◻ dodatni znaci: fragilne krvne žile, nekroza, ulceracija, egzofitična lezija, iregularna površina.

◻ **Razno:**
- ◻ kongenitalna transformacijska zona
- ◻ kondilom
- ◻ polip
- ◻ upalni proces
- ◻ stenoza
- ◻ kongenitalne anomalije
- ◻ posttraumatske promjene
- ◻ endometrioza

V PREPORUKE ZA LIJEČENJE:

◻ Uredan kolposkopski nalaz, ponoviti PAPA test za 6 mjeseci.
◻ Učiniti cervikalne briseve i provesti terapiju, ponoviti kolposkopiju i PAPA test po završenom liječenju
◻ Liječenje atrofičnih promjena, ponoviti kolposkopiju i PAPA test po završenom liječenju
◻ Ponoviti kolposkopiju i PAPA test za 6 mjeseci.
◻ Histološka verifikacija kolposkopske promjene
◻ HPV –HR test / Imunocitokemijska verifikacija (p16/Ki67)

VI Kolposkopska licenca:

◻ licencirani kolposkopičar
◻ nelicencirani kolposkopičar

Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju HLZ
Hrvatsko društvo za kolposkopiju i bolesti vrata maternice HLZ

rio de janeiro | zagreb 2011

Slika 19. Kolposkopski obrazac „Rio de Janeiro / Zagreb 2011.“ (www.hdgo.hr)

3.1.2. Kontrolna skupina ispitanica

Kontrolna skupina ispitanica, njih 109, izabrana je prema kriterijima što veće podudarnosti s ispitanicama s CIN-om po dobi, načinu života i utjecaju okoliša. Kontrolnu skupinu čine zdrave žene koje su podvrgnute sistematskom pregledu s urednim nalazom Papa-testa u zadnje dvije godine.

Kriterij za isključivanje ispitanica iz kontrolne skupine bili su prisutnost bubrežne bolesti, jetrene bolesti, hipertenzije, srčanog udara, moždanog udara, angine pektoris, šećerne bolesti, policističnih jajnika, endometrioze te maligne bolesti. Nadalje, iz ispitivane su skupine isključene ispitanice koje uzimaju lijekove koji remete metabolizam masti i ugljikohidrata te trudnice.

3.1.3. Uzorci

Uzorci seruma i pune krvi uzete na antikoagulans EDTA uzorkovani su 12 sati nakon uzimanja zadnjeg obroka, u jutarnjim satima. Za određivanje biokemijskih parametara rabljeni su uzorci seruma, a za utvrđivanje prisutnosti polimorfizama uzorci pune krvi. Uzorci krvi uzeti bez antikoagulansa centrifugirani su nakon 30 minuta stajanja tijekom 15 minuta na 3000 okretaja/minuti, nakon čega je odvojen uzorak seruma. Uzorci su do izvođenja analiza razdijeljeni u manje volumene i pohranjeni na –20 °C. Sve ispitanice uključene u istraživanje potpisale su informirani pristanak, a ispitivanje su odobrila etička povjerenstva Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“, Poliklinike „Aviva“ i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.2.METODE

3.2.1. Instrumenti i uređaji

- centrifuga Biofuge Stratos Heraeus, Kendro Laboratory Products, Njemačka
- suha kupelj, Termomixer comfort, Eppendorf AG, Njemačka
- GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, SAD
- sustav za elektroforezu SEA 2000, Elchrom Scientific AG, Švicarska
- sustav za hlađenje MultiTemp III, Amersham Biosciences, Švicarska
- UV lampa, Bioblock Scientific, Francuska
- sustav za slikanje gelova Uvitec, Uvitec, Velika Britanija
- biokemijski automatski analizator BC-AU 680, Beckman Coulter, Brea, SAD
- biokemijski automatski analizator Cobas Integra 400 plus, Roch Diagnostics, Mannheim, Njemačka
- spektrofotometar Cecil 9000, Cecil Instruments Limited, Velika Britanija
- spektrofotometar Cecil Aquarius CE 7200, Cecil Instruments Limited, Velika Britanija
- čitač mikrotitarskih pločica 1420 Victor^3, Perkin Elmer, SAD
- HPLC s UV/VIS detektorom, Shimadzu Corporation, Japan
- Lab 850 pH metar, Schott Instruments, Njemačka
- analitička kolona obrnute faze C18, 125–4 mm, Merck, Njemačka

3.2.2. Kemikalije i reagensi

- test paket FlexiGene DNA, Qiagen GmbH, Njemačka
- izopropanol, Kemika, Hrvatska
- etanol, Kemika, Hrvatska
- početnice, Microsynth GmbH, Švicarska
- TaKaRa, Takara Biotehnology, Japan
- agaroza, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Tris–HCl, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- natrijev acetat, Kemika, Hrvatska
- EDTA, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka

- etidijev bromid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- saharoza, Kemika, Hrvatska
- bromfenolno plavilo, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- ksilen cijanol FF, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- standard DNA, O'RangeRuler^{TM} 50bp DNA ladder, Fermentas Life Sciences, Litva
- restrikcijski enzim AlwI, New England Biolabs, Velika Brtanija
- 10x pufer za restrikcijski enzim AlwI, New England Biolabs, Velika Brtanija
- restrikcijski enzim Hin1II, Thermo Scientific, Litva
- 10x pufer za restrikcijski enzim Hin1II, Thermo Scientific, Litva
- restrikcijski enzim BsrBI, New England Biolabs, Velika Brtanija
- 10x pufer za restrikcijski enzim BsrBI, New England Biolabs, Velika Brtanija
- kalcijev klorid, Kemika, Hrvatska
- natrijev klorid, Lach–Ner Ltd, Češka
- paraokson, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- fenilacetat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- metanol, Kemika, Hrvatska
- 5,5'–ditio-bis–2–nitrobenzojeva kiselina (DTNB), Sigma Aldrich GmbH, Njemačka
- butilirani hidroksi toluen (BHT), Sigma Aldrich GmbH, Njemačka
- fosfatna kiselina, Kemika, Hrvatska
- tiobarbiturna kiselina (TBA), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- voda HPLC čistoće, Merck, Njemačka
- kalcijev dihidrogen fosfat, Merk, Njemačka
- metanol HPLC čistoće, Kemika, Hrvatska
- trigliceridi, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
- kolesterol, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
- HDL kolesterol, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
- LDL kolesterol, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
- apoAI, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka
- aboB, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka

3.2.3. Izolacija DNA

DNA iz pune krvi uzete na antikoagulans EDTA izolirana je pomoću kompleta FlexiGene DNA. Postupak izolacije obuhvaća nekoliko koraka. U prvom se koraku dodaje 1250 µL lizirajućeg pufera i 500 µL pune krvi. Sadržaj se promiješa, centrifugira 6 minuta na 10000 x g da bi se istaložile stanične jezgre i mitohondriji. Nadsloj se odlije, talog posuši okretanjem mikroepruvete na staničevinu, nakon čega se otopi u 250 µL smjese pufera za denaturaciju i proteaze. Smjesa za jedan uzorak sastoji se od 2,5 µL proteaze i 250 µL pufera za denaturaciju. Nakon potpuna otapanja taloga dodaje se 150 µL pufera za denaturaciju, reakcijska se smjesa promiješa i inkubira 10 minuta na 65 °C. Ovaj korak izolacije omogućuje uspješno uklanjanje onečišćenja poput, primjerice, proteina. Nakon završene inkubacije za taloženje DNA iz vodenoga sloja upotrebljava se 300 µL 100 %-tnog izopropanola. Nakon dodatka izopropanola smjesa se dobro promiješa te dolazi do taloženja DNA. Reakcijska se smjesa centrifugira 6 minuta na 10000 x g, nadsloj se odlije, a talog DNA posuši se okretanjem mikroepruvete na staničevinu. Za ispiranje taloga izolirane DNA rabi se 250 µL 70 %-tnog etanola, nakon čega slijedi taloženje centrifugiranjem na 10000 x g tijekom 6 minuta. Nadsloj se ponovno odlijeva, a talog se osuši na zraku. Na posušeni talog DNA dodaje se 200 µL pufera za hidrataciju (10 mmol/L Tris–HCl, pH 8,5) te se DNA otapa preko noći na 65 °C.

3.2.4. Provjera čistoće i koncentracije DNA

Svim izoliranim uzorcima DNA određuje se koncentracija i provjerava se čistoća. Spektofotometrijski se mjeri količina apsorbiranog zračenja od nukleotidnih baza na 260 nm. Mjerenje apsorbancije na dvjema valnim duljinama od 260 nm i 280 nm omogućuje određivanje čistoće pripravka DNA. Na valnoj duljini od 280 nm apsorbiraju proteini, a DNA zadovoljavajuće kvalitete ima omjer $A_{260\ nm}$ / $A_{280\ nm}$ od 1,8 do 2,0. Uzorak DNA razrjeđuje se ultračistom vodom u omjeru 1:20 te se mjeri apsorbancija na 260 i 280 nm. Mjerenje se obavlja na spektofotometru Cecil Aquarius CE 7200 prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Koncentracija i čistoća DNA određuju se prema sljedećim formulama:

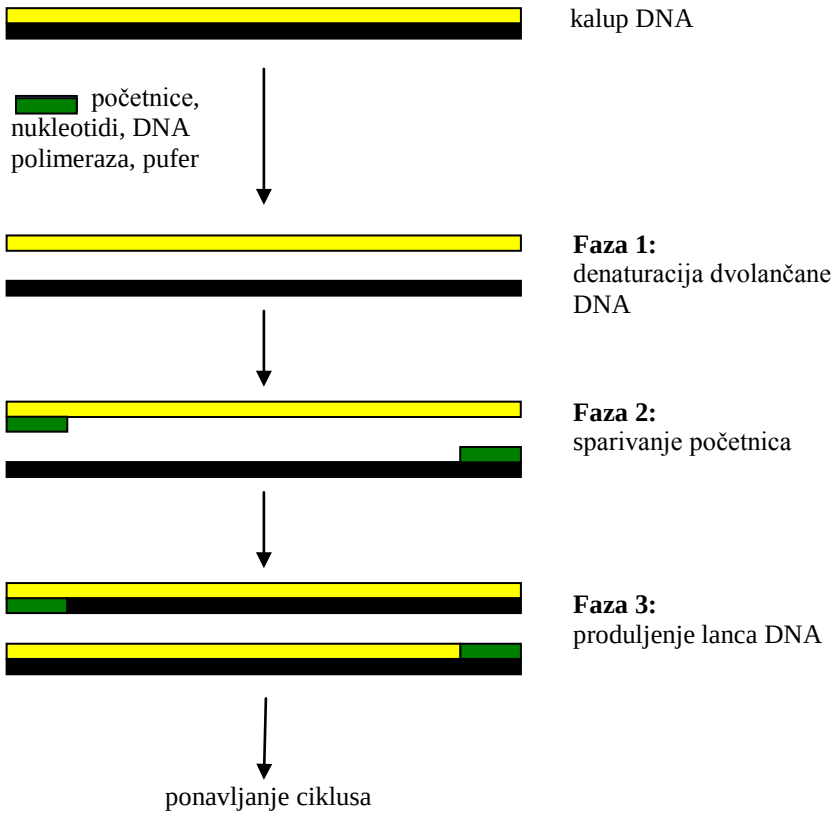
$\mu g/mL\ DNA = A_{260nm} * A * R = A_{260nm} * 50 * 20$

A– apsorbancija 1,0 odgovara koncentraciji dvolančane DNA od 50 µg/mL
R – razrjeđenje DNA (1:20)

$$čistoća\ DNA = A_{260\ nm} / A_{280\ nm}$$

3.2.5. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) brza je, specifična i osjetljiva metoda umnažanja kratkoga slijeda DNA u veliki broj istovjetnih kopija uz termostabilni enzim DNA polimerazu.



Slika 20. Lančana reakcija polimerazom

U reakcijskoj smjesi za PCR uz DNA polimerazu nalaze se i kalup DNA koji želimo umnožiti, par početnica, smjesa četiriju oligonukleotida u jednakom omjeru (deoksiadenozin–5'–trifosfat dATP, deoksigvanozin–5'–trifosfat dGTP, deoksicitidin–5'–trifosfat dCTP, deoksitimidin–5'–trifosfat dTTP) i odgovarajući pufer za PCR. Početnica je kraći jednolančani oligonukleotidni niz. Par početnica je komplementaran krajevima kalupa DNA koji se želi umnožiti te one omeđuju ciljani slijed koji sadržava polimorfno mjesto. PCR reakcija odigrava se u tri faze: faza denaturacije dvolančane DNA u dva jednolančana lanca, faza sparivanja početnica s DNA lancem i faza produljenja lanca DNA (slika 20.). Ova se tri ciklusa ponavljaju mnogo puta, što rezultira eksponencijalnim rastom količine umnožene DNA. U konačnici nastaje 2^n kopija dijela DNA koji se umnaža, gdje „n“ predočuje broj ciklusa.

Tablica 1. Uvjeti provođenja PCR reakcije.

Uvjeti PCR reakcije	**Temperatura**	**Vrijeme**
početna denaturacija	95 °C	12 min
35 ciklusa umnažanja		
denaturacija	94 °C	30 s
sparivanje početnica	Ta*	30 s
produljenje lanca DNA	72 °C	60 s
završno produljivanje lanca	72 °C	7 min

*Ta – temperatura sparivanja početnica

Za umnažanje dijelova DNA koji sadržavaju polimorfna mjesta Q192R (egzon 6 gena *pon1*; SNP ID rs662), L55M (egzon 3 gena *pon1*; SNP ID rs854560) i –108C>T (promotorsko područje gena *pon1*; SNP ID rs705381) primjenjivana je PCR metoda koju su opisali Campo i suradnici uz dvije modifikacije (Campo i sur., 2004.). Promijenjen je slijed početnice 1_{CT} i temperatura vezanja početnica za polimorfizam –108C>T. Ukupni volumen za umnožavanje pojedinačnih polimorfnih odsječaka DNA je 25 µL. Reakcijska smjesa sadržava 100 ng genomske DNA, 0,4 µmol/L svake početnice, 0,2 mmol/L svakog deoksinukleotida, 0,6 jedinica Platinum *Taq* DNA polimeraze i 2,5 µL 10x reakcijskog pufera za PCR (100 mmol/L Tris–HCl, pH 8,3, 500 mmol/L kalijev klorid i 15 mmol/L $MgCl_2$). Umnažanje DNA provodi se u uređaju za PCR GeneAmp PCR System 9700. Uvjeti provođenja PCR reakcije prikazani

su u tablici 1., a početnice, temperature sparivanja početnica i veličine PCR produkata za svaki ispitivani polimorfizam u tablici 2. PCR produkti ostavljaju se najmanje 10 minuta u uređaju za PCR na + 4 °C.

Tablica 2. Početnice, temperature sparivanja početnica i veličina PCR produkata za polimorfizme Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1*.

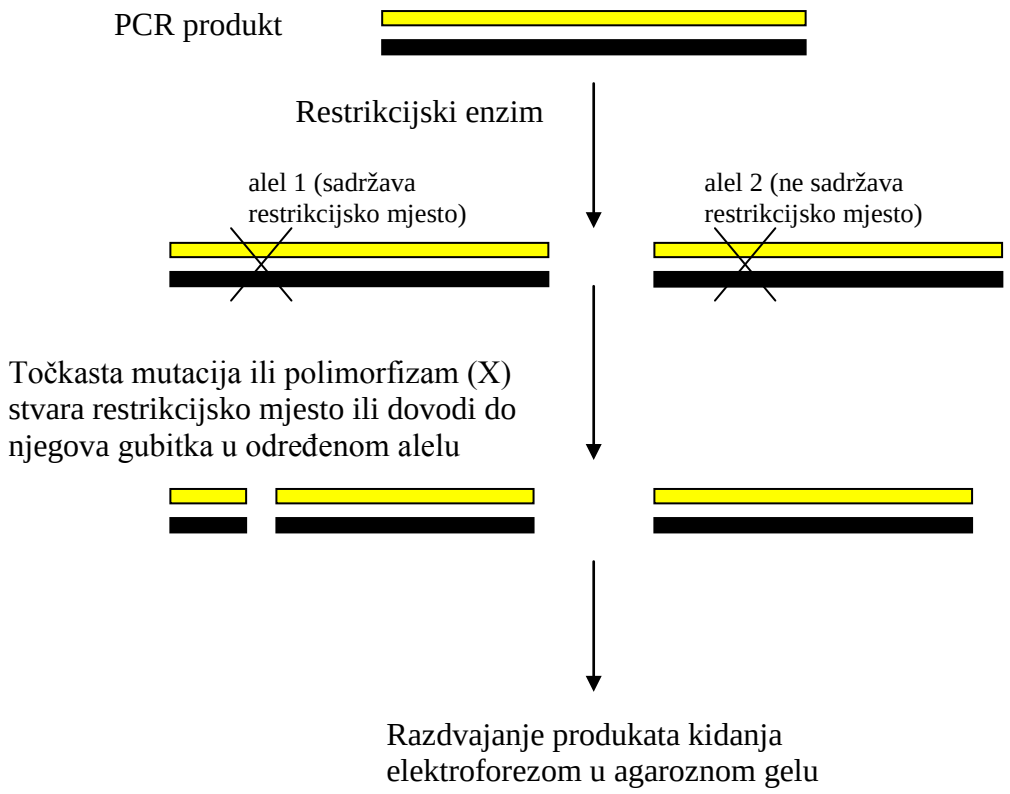
Polimorfizam	**Početnica**	**Temperatura sparivanja početnica**	**Veličina PCR produkta**
Q192R	1_{QR}: 5' TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG 3' 2_{QR}: 5' CCTGAGAATCTGAGTAAATCCACT 3'	60 °C	238 pb
L55M	1_{LM}: 5' CCTGCAATAATATGAAACAACCTG 3' 2_{LM}: 5' TGAAAGACTTAAACTGCCAGTC 3'	63 °C	172 pb
–108C>T	1_{CT}: 5' AGCTAGCTGCCGACCCGGCGGGGAGGaG 3' 2_{CT}: 5' GGCTGCAGCCCTCACCACAACCC 3'	69 °C	240 pb

Malo slovo „**a**" u 1_{CT} početnici označuje uvođenje dodatnog nukleotida zbog kreiranja restrikcijskog mjesta za enzim *Bsr*BI.

Uspješnost reakcije PCR provjerava se elektroforezom umnoženih fragmenata u 2 %-tnom agaroznom gelu u sustavu za elektroforezu SEA 2000 uz sustav za hlađenje MultiTemp III. Elektroforetska pokretljivost fragmenta DNA ovisi o obliku i veličini molekule. Koncentracija agaroze, jakost i smjer električnog polja, sastav pufera za elektroforezu, kao i prisutnost interkalirajućih boja utječu na učinkovitost razdvajanja. Dvopostotni agarozni gel priprema se otapanjem 2 g agaroze u 100 mL TAE pufera za elektroforezu (0,04 mol/L Tris–HCl, 5 mmol/L natrijev acetat, 0,04 mmol/L EDTA, pH 7,9). U agarozni se gel dodaje 5 µL (konačne koncentracije 0,5 µg/mL) etidijeva bromida. 5 µL PCR produkta pomiješa se s 2 µL pufera za nanošenje uzoraka (30 %-tna saharoza, 0,25 %-tno bromfenolno plavilo i 0,25 %-tni ksilen cijanol FF). Elektroforeza se provodi u TAE puferu 20–25 minuta na 120 V uz temperaturu od 15 °C, a vizualizacija razdvojenih fragmenata izvodi se pod UV svjetlom i fotografira sustavom Uvitec.

3.2.6. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata

Umnoženi dijelovi DNA koji sadržavaju polimorfna mjesta analizirani su metodom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP, od engl. *restriction fragment length polymorphism*) koju su opisali Campo i suradnici uz izmjenu restrikcijskog enzima za polimorfizam –108C>T (Campo i sur., 2004.). Cilj je metode otkrivanje točkastih mutacija ili polimorfizama koji uključuju promjenu slijeda DNA u jednom nukleotidu (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*) upotrebom restrikcijskih enzima. Preduvjet za primjenu te metode jest da polimorfizam mijenja nukleotidni slijed u umnoženom fragmentu DNA kao nastanak ili gubitak specifičnoga restrikcijskog mjesta koje prepoznaje restrikcijski enzim. Mjesto raspoznavanja određeno je specifičnim nukleotidnim slijedom koji je najčešće kratki motiv dug 4–6 pb i na kojemu restrikcijski enzim kida dvolančanu DNA. Ovisno o nukleotidu u polimorfnom mjestu doći će do kidanja umnoženog fragmenta DNA ili će ono izostati. Razdvajanje produkata kidanja restrikcijskim enzimom na agaroznom gelu omogućuje određivanje genotipova ispitivanog polimorfizma (slika 21.).



Slika 21. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata

Tablica 3. Restrikcijski enzimi i veličine RFLP produkata.

Polimorfizmi	**Restrikcijski enzim**	**Veličina RFLP produkta**
Q192R	AlwI	Q alel: 238 pb R alel: 175 + 63 pb
L55M	Hin1II	L alel: 172 pb M alel: 103 + 69 pb
–108C>T	BsrBI	C alel: 212 + 28 pb T alel: 240 pb

Reakcijska smjesa za kidanje sadržava odgovarajući restrikcijski enzim za svaki polimorfizam, odgovarajući pufer za restrikcijski enzim i umnoženi odsječak DNA. Za polimorfizam Q192R rabi se restrikcijski enzim AlwI, za polimorfizam L55M rabi se restrikcijski enzim Hin1II, a za polimorfizam –108C>T rabi se restrikcijski enzim BsrBI. Slijed koji raspoznaje restrikcijski enzim AlwI je 5' ...GGATC $(N)_4$/ ...3', slijed za Hin1II je 5' ...CATG/... 3' i slijed za BsrBI je 5'... GAG/CGG...3' (kosa crta označuje mjesto kidanja).

Restrikcijska smjesa za kidanje (ukupnog volumena 15 μL) sadržava: 4 jedinice restrikcijskog enzima AlwI, 1,5 μL 10x pufera za restrikciju (200 mmol/L Tris–acetat, pH 7,9, 100 mmol/L magnezijev acetat, 500 mmol/L kalijev acetat i 1 mg/mL BSA) i 9 μL PCR produkta za polimorfizam Q192R; 5 jedinica restrikcijskog enzima Hin1II, 1,5 μL 10x pufera za restrikciju (100 mmol/L Tris–HCl, pH 7,5, 100 mmol/L magnezijev klorid, 500 mmol/L natrijev klorid i 1 mg/mL BSA) i 10 μL PCR produkta za polimorfizam L55M; 3 jedinice restrikcijskog enzima BsrBI, 1,5 μL 10x pufera za restrikciju (200 mmol/L Tris–acetat, pH 7,9, 100 mmol/L magnezijev acetat, 500 mmol/L kalijev acetat i 1 mg/mL BSA) i 9 μL PCR produkta za polimorfizam –108C>T. Sve tri restrikcijske smjese inkubirane su preko noći na 37 °C. Produkti kidanja sa specifičnim restrikcijskim enzimom za svaki ispitivani polimorfizam prikazani su u tablici 3.

Analiza produkata kidanja restrikcijskim enzimom provodi se elektroforetskim razdvajanjem fragmenata u 4 %-tnom agaroznom gelu u sustavu za elektroforezu SEA 2000 uz sustav za hlađenje MultiTemp III. Agarozni se gel priprema otapanjem 4 g agaroze u 100 mL TAE pufera za elektroforezu. U agarozni gel dodaje se 5 μL (konačne koncentracije 0,5 μg/mL) etidijeva bromida. Elektroforeza se provodi u TAE puferu 60–70 minuta na 120 V uz

temperaturu od 15 °C, a vizualizacija razdvojenih fragmenata kidanja restrikcijskim enzimom provodi se upotrebom UV svjetla i dokumentirana je sustavom Uvitec.

3.2.7. Određivanje paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 u serumu

Paraoksonazna aktivnost PON1 određena je u odsutnosti i u prisutnosti NaCl (bazalna i NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1) upotrebom supstrata paraoksona (O,O–dietil–O–*p*–nitrofenilfosfat) modificiranom metodom koju su opisali Juretić i suradnici (Juretić i sur., 2006.). PON1 kida supstrat paraokson, pri čemu se oslobađa *p*-nitrofenol. Reakcijska smjesa za određivanje bazalne aktivnosti sadržava 300 µL reagensa (2,2 mmol/L $CaCl_2$ u 0,1 mol/L Tris–HCl puferu pH 8,0, i 2,5 mmol/L paraoksona) i 15 µL seruma. Reakcijska smjesa za određivanje NaCl-stimulirane paraoksonazne aktivnosti sadržava 300 µL reagensa (2,2 mmol/L $CaCl_2$ u 0,1 mol/L Tris–HCl puferu pH 8,0, 1,0 mol/L NaCl i 2,5 mmol/L paraoksona) i 15 µL seruma. Oslobađanje *p*-nitrofenola mjeri se kontinuirano na biokemijskom automatskom analizatoru BC-AU680 na 410/480 nm ($\varepsilon_{410/480}$ = 17900 L mol^{-1} cm^{-1}) pri temperaturi od 37 °C. Katalitička aktivnost enzima u internacionalnim jedinicama po litri (U/L) izračunava se prema dolje navedenoj formuli:

$$\text{paraoksonazna aktivnost (U/L)} = \Delta A/\text{min} * \frac{V * 10^6}{\varepsilon * v * b}$$

$$= \Delta A/\text{min} * \frac{315\ \mu L * 10^6}{17900\ L\ mol^{-1}\ cm^{-1} * 15\ \mu L * 1\ cm}$$

$$= \Delta A/\text{min} * 1173\ \mu mol/L$$

V – volumen reakcijske smjese (315 µL)

v – volumen uzorka (15 µL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (17900 L mol^{-1} cm^{-1})

b – debljina kivete (1 cm)

10^6 – faktor za preračunavanje M u µM

Arilesterazna aktivnost PON1 određena je upotrebom supstrata fenilacetata (Grdić Rajković i sur., 2010.). PON1 hidrolizira supstrat fenilacetat uz oslobađanje fenola koji se određuje kontinuiranim mjerenjem. Metoda je modificirana za određivanje na čitaču mikrotitarskih ploča 1420 Victor[3]. Matična otopina supstrata (100 mmol/L fenilacetat u 40 %-tnom metanolu, stabilna tjedan dana na –20 °C) razrijedi se u omjeru 1:5 (20 mmol/L), a uzorci seruma u omjeru 1:100 ili 1:50 s 0,1 mol/L Tris–HCl puferom, pH 8,0 koji sadržava 2 mmol/L $CaCl_2$. Reakcijska smjesa za određivanje arilesterazne aktivnosti PON1 sastoji se od 0,24 mL pufera (0,1 mol/L Tris–HCl pufer, pH 8,0 koji sadržava 2 mmol/L $CaCl_2$), 0,03 mL supstrata i 0,03 mL razrijeđenog seruma. Reakcijska smjesa za određivanje spontane hidrolize supstrata sastoji se od 0,27 mL pufera (0,1 mol/L Tris–HCl pufer, pH 8,0 koji sadržava 2 mmol/L $CaCl_2$) i 0,03 mL supstrata. Kontinuirano mjerenje oslobođenog fenola izvodi se na sobnoj temperaturi s pomoću čitača mikrotitarskih ploča 1420 Victor[3] na valnoj duljini od 260 nm tijekom 4 minute u 8 ciklusa po 30 sekundi prema destiliranoj vodi. Izmjerena promjena apsorbancije u minuti u uzorcima korigira se za promjenu apsorbancije u minuti tijekom spontane hidrolize supstrata (korigirana $\Delta A/min = \Delta A/min_{uzorka} - \Delta A/min_{spontana\ hidroliza\ supstrata}$). Katalitička aktivnost enzima izražena u kilo internacionalnim jedinicama po litri (kU/L) izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$\text{arilesterazna aktivnost (kU/L)} = \Delta A/min * \frac{V * 10^6 * 0{,}001 * R}{\varepsilon * v * b}$$

$$= \Delta A/min * \frac{3\ mL * 10^6 * 0{,}001 * 100}{1310\ L\ mol^{-1}\ cm^{-1} * 0{,}3\ mL * 0{,}5\ cm}$$

$$= \Delta A/min * 1527\ \mu mol/L$$

V – volumen reakcijske smjese (3 mL)

v – volumen uzorka (0,3 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (1310 L mol^{-1} cm^{-1})

b – debljina kivete (0,5 cm)

10^6 – faktor za preračunavanje M u μM

R – razrjeđenje uzorka (100)

0,001 – faktor za preračunavanje U/L u kU/L

Bazalna i NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1, kao i arilesterazna aktivnost PON1 standardizirane su na koncentraciju HDL-a i apoAI. Aktivnosti su u radu prikazane kao bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 (POX); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 (POX1); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (POX/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX/apoAI); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL (POX1/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX1/apoAI); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI).

3.2.8. Određivanje fenotipa paraoksonaze 1

Za određivanje fenotipa PON1 primjenjivana je metoda s dva supstrata (Eckerson i sur., 1983.). U svakom je uzorku određena NaCl-stimulirana paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1. Za svaki se uzorak izračunava omjer ovih aktivnosti koji omogućuje razvrstavanje ispitanika u tri moguća fenotipa: AA (homozigoti, niska aktivnost), AB (heterozigoti, srednja aktivnost) i BB (homozigoti, visoka aktivnost).

3.2.9. Određivanje koncentracije parametara lipidnoga statusa u serumu

Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL kolesterola, LDL kolesterola, apoAI i apoB određene su standardnim metodama na analizatoru Cobas Integra 400 plus uporabom originalnih reagensa tvrtke Roch Diagnostic.

3.2.10. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina u serumu

Koncentracija slobodnih tiolnih skupina u serumu određena je upotrebom Ellmanova reagensa (5,5'–ditio-bis–2–nitrobenzojeva kiselina ili DTNB) metodom koju su opisali Hu i suradnici (Hu i sur., 1994.). U reakciji DTNB-a s tiolnim skupinama oslobađa se 2–nitro–5–merkapto benzojeva kiselina (TNB), koja u vodenoj sredini pri alkalnom i neutralnom pH ionizira u žuto obojeni anion TNB^{-} koji se određuje spektrofotometrijski na 412 nm.

Reakcijska smjesa za određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina sastoji se od 50 µL seruma, 150 µL pufera (0,25 mol/L Tris pufer, pH 8,2 koji sadržava 20 mmol/L EDTA), 10 µL DTNB-a (10 mmol/L DTNB otopljena u apsolutnom metanolu) i 790 µL apsolutnog metanola. Slijepa proba uzorka sadržava 50 µL seruma, 150 µL pufera, 10 µL destilirane vode i 790 µL apsolutnog metanola. Slijepa proba reagensa sadržava 50 µL vode, 150 µL pufera, 10 µL DTNB-a i 790 µL apsolutnog metanola. Reakcijske smjese inkubiraju se 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije slijedi centrifugiranje na 3000 x g tijekom 10 minuta. Apsorbancija u nadsloju mjeri se na 412 nm na spektofotometru CECIL Aquarius CE 7200 prema destiliranoj vodi. Koncentracija tiolnih skupina u serumu izražena u mmol/L izračunava se prema dolje navedenoj formuli:

$$\text{tiolne skupine (mmol/L)} = (A–B–C) * \frac{V * 10^3}{v * \varepsilon * b}$$

$$= (A–B–C) * \frac{1\ \text{mL} * 10^3}{0{,}05\ \text{mL} * 13600\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1} * 1\ \text{cm}}$$

$$= (A–B–C) * 1{,}47\ \text{mM}$$

V – volumen reakcijske smjese (1 mL)

v – volumen uzorka (0,05 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (13600 L mol^{-1} cm^{-1})

b – debljina kivete (1 cm)

10^3 – faktor za preračunavanje M u mM

A – apsorbancija probe na 412 nm

B – apsorbancija slijepe probe reagensa na 412 nm

C – apsorbancija slijepe probe uzorka na 412 nm

3.2.11. Određivanje koncentracije malondialdehida u serumu

Koncentracija MDA u serumu određena je modificiranom metodom koju su opisali Drury i suradnici (Domijan i sur., 2014; Drury i sur., 1997.). Metoda se temelji na reakciji MDA iz seruma s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje crveni pigment koji se određuje pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, od eng. *high performance liquid chromatography*). Specifičnost reakcije povećava se upotrebom antioksidansa butiliranog hidroksitoluena (BHT) i primjenom HPLC-a koji omogućuje odvajanje kompleksa MDA–TBA od ostalih komponenti u reakcijskoj smjesi koje također apsorbiraju na istoj valnoj duljini. Reakcijska smjesa sadržava 50 µL seruma, 5 µL 0,2 %-tnog BHT-a i 750 µL 1 %-tnog H_3PO_4. Sadržaj se epruvete promiješa i u reakcijsku se smjesu dodaje 250 µL 0,6 %-tnog TBA-a i 445 µL vode HPLC čistoće te se smjesa ponovno promiješa. Reakcijska se smjesa inkubira u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 20 minuta. Nakon završene inkubacije reakcija se zaustavlja uranjanjem epruveta u hladnu vodu. Uzorci se prebacuju u automatski ubacivač uzoraka koji je temperiran na 15 °C i koncentracija MDA-a određuje se s pomoću HPLC-a. Mobilna se faza sastoji od 50 mmol/L KH_2PO_4 i metanola HPLC čistoće u omjeru 60:40, a pH mobilne faze podešen je na 6,8. Protok mobilne faze podešen je na 1 mL/min. Rabljena analitička kolona jest kolona obrnute faze C18 koja je tijekom analize temperirana na 32 °C. Valna duljina UV detektora je 532 nm, a vrijeme zadržavanja MDA-a na analitičkoj koloni je 2,5 minute. Koncentracija MDA-a u uzorku određuje se pomoću standardne krivulje standarda 1,1,3,3-tetrametoksi propana poznate koncentracije. Koncentracija MDA-a izražava se u µmol/L.

3.2.12. Određivanje koncentracije reduciranog glutationa u serumu

Koncentracija reduciranog glutationa određena je spektofotometrijskom metodom po Ellmanu (Rumora i sur., 2007.) koja se temelji na vezanju 5,5'–ditio-bis–2–nitrobenzojeve kiseline ili DTNB-a. U reakciji dolazi do kidanja disulfidne veze i nastanka 2-nitro-5-tiobenzoata (NTB^-) koji ionizira u žuto obojeni NTB^{2-}. Reakcijska smjesa sadržava 50 µL DTNB-a, 850 µL fosfatnog pufera i 100 µL seruma za uzorak, 100 µL standarda GSH za standard i 100 µL vode za slijepu probu. Apsorbancija se mjeri na 410 nm, a koncentracija reduciranog GSH-a određuje se pomoću standardne krivulje.

3.2.13. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkih programskih paketa SigmaStat 3.0 za Windows (2003. SPSS Inc.) i Medcalc 13.3.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Osnovna obilježja varijabli testirana su primjenom deskriptivne analize. Upotrebom Kolmogorov-Smirnovljeva testa testirana je normalnost razdiobe podataka. Rezultati podataka koji su slijedili normalnu razdiobu prikazani su u obliku srednja vrijednost ± standardna devijacija, a rezultati podataka koji nisu slijedili normalnu razdiobu prikazani su u obliku medijana i interkvartilnog raspona između prvog i trećeg kvartila. χ^2 test rabljen je za testiranje značajnosti razlike između skupina kategoričkih podataka. Za testiranje značajnosti razlike između skupina brojčanih podataka koje su slijedile normalnu razdiobu primjenjivan je parametrijski nezavisni t-test. Za podatke koji nisu slijedili normalnu razdiobu rabljeni su neparametrijski testovi Mann-Whitneyev test ili Kruskal-Wallisov test i Dunnova metoda za posthoc testiranje. Dijagnostička točnost, pripadajuća granična vrijednost, specifičnost i osjetljivost određene su analizom ROC (*od engl*. reciever operating characteristic) krivulje. Univarijantna i multivarijantna logistička regresija korištena je za ispitivanje određenih parametra kao prediktora CIN-a. Vrijednost P <0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. AKTIVNOST PARAOKSONAZE 1 I LIPIDNI STATUS U ISPITANICA S REDOVITIM MENSTRUALNIM CIKLUSOM I U ISPITANICA U POSTMENOPAUZI

U istraživanje su uključene žene reproduktivne dobi i žene u postmenopauzi. Žene u postmenopauzi imaju promijenjeni lipidni i hormonski status u usporedbi sa ženama reproduktivne dobi. Da bismo isključili utjecaj hormonskoga i lipidnoga statusa na aktivnost PON1, usporedili smo paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 između skupine zdravih žena u postmenopauzi (n = 23) i skupine zdravih žena s redovitim menstrualnim ciklusom (n = 51). Skupina žena s redovitim menstrualnim ciklusom podijeljena je u dvije podskupine, 25 ispitanica u folikularnoj fazi ciklusa i 26 žena u lutealnoj fazi ciklusa. U ovaj dio preliminarnog ispitivanja uključen je samo jedan dio kontrolnih ispitanica.

4.1.1. Koncentracije parametara lipidnoga statusa

Parametri lipidnog statusa uspoređeni su između žena reproduktivne dobi koje su podjeljene u dvije podskupine (folikularna i lutealna faza menstrualnog ciklusa) i skupine žena u postmenopauzi. Koncentracije parametara lipidnoga statusa prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Koncentracije parametara lipidnoga statusa u ispitivanim skupinama.

	Folikularna faza ciklusa[1]	**Lutealna faza ciklusa**[1]	**Postmenopauza**[1]	***P***[2]
Trigliceridi (mmol/L)	0,9 (0,7-1,3)	0,7 (0,6-1,0)	1,5 (0,9-1,7)	**0,002**
Kolesterol (mmol/L)	5,10 (4,78-6,10)	5,05 (4,70-5,40)	6,30 (5,73-7,23)	**<0,001**
HDL (mmol/L)	1,7 (1,4-2,0)	1,7 (1,5-1,9)	1,7 (1,4-2,0)	0,870
LDL (mmol/L)	3,00 (2,56-3,63)	3,00 (2,70-3,70)	3,90 (3,23-4,50)	**<0,001**
apoAI (g/L)	1,68 (1,48-1,94)	1,70 (1,58-1,81)	1,78 (1,60-1,97)	0,386
apoB (g/L)	0,88 (0,75-1,01)	0,79 (0,68-1,00)	1,07 (0,90-1,24)	**0,002**

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2]Testirano Kruskall-Wallisovim testom. Posthoc testiranje provedeno je Dunnovom metodom.
Lipoprotein velike gustoće (HDL); lipoprotein male gustoće (LDL); apolipoprotein AI (apoAI); apolipoprotein B (apoB).

Koncentracija triglicerida (*P* = 0,002), kolesterola (*P* <0,001), LDL kolesterola (*P* <0,001) i apoB (*P* = 0,002) znatno se razlikovala između triju ispitivanih skupina. Posthoc testom utvrđeno je da su koncentracije kolesterola, LDL kolesterola i apoB mnogo veće u ispitanica u menopauzi u odnosu prema skupini žena u folikularnoj fazi i u usporedbi sa ženama u lutealnoj fazi menstrualnog ciklusa. Posthoc testiranjem također je utvrđeno da se koncentracija triglicerida razlikuje samo između skupine ispitanica u menopauzi i skupine ispitanica u lutealnoj fazi ciklusa. Koncentracija HDL kolesterola i apoAI ne razlikuje se između triju ispitivanih skupina.

4.1.2. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1

Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 uspoređene su između skupine žena reproduktivne dobi koje su podjeljene u dvije podskupine (folikularna i lutealna faza menstrualnog ciklusa) i skupine žena u postmenopauzi. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 te aktivnosti standardizirane na koncentraciju HDL-a i apoAI prikazane su u tablici 5. te se nisu razlikovale između triju ispitivanih skupina.

Tablica 5. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 u ispitivanim skupinama**.**

	Folikularna faza ciklusa[1]	**Lutealna faza ciklusa**[1]	**Postmenopauza**[1]	***P***[2]
POX (U/L)	104 (66-260)	106 (63-250)	93 (71-165)	0,847
POX/HDL (U/mmol)	49 (38-153)	58 (42-131)	48 (36-94)	0,775
POX/apoAI (U/g)	50 (37-177)	60 (36-139)	51 (36-88)	0,528
POX1 (U/L)	210 (131-462)	211 (120-442)	180 (139-296)	0, 857
POX1/HDL (U/mmol)	99 (72-272)	115 (81-237)	94 (69-169)	0,855
POX1/apoAI (U/g)	101 (74-315)	116 (69-248)	101 (71-156)	0,580
ARE (kU/L)	74 (63-82)	70 (54-91)	70 (60-81)	0,906
ARE/HDL (kU/mmol)	41 (36-50)	42 (35-50)	41 (32-49)	0,875
ARE/apoAI (kU/g)	41 (37-52)	44 (33-51)	37 (32-45)	0,346

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2]Testirano Kruskall-Wallisovim testom.
Bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 (POX); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 (POX1); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (POX/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX/apoAI); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (POX1/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX1/apoAI); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI).

4.2. ISPITIVANI PARAMETRI U SKUPINI ZDRAVIH ISPITANICA I U SKUPINI ISPITANICA S PREMALIGNIM PROMJENAMA VRATA MATERNICE

Koncentracije parametara lipidnoga statusa, oksidacijskoga stresa, paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1, fenotipovi PON1 i razdioba genotipova i alela Q192R, L55M i -108C>T polimorfizama gena *pon1* uspoređeni su između kontrolne skupine ispitanica (n=109) i skupine ispitanica s CIN-om (n=65).

4.2.1. Demografska obilježja ispitivanih skupina

U tablici 6. prikazana su demografska obilježja kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. Dvije se ispitivane skupine ne razlikuju po dobi, težini, visini ni po indeksu tjelesne mase (BMI).
Također se dvije ispitivane skupine ne razlikuju prema udjelu žena u reproduktivnoj dobi i žena u postmenopauzi.

Tablica 6. Demografska obilježja u ispitivanim skupinama.

	Kontrolne ispitanice[1]	**CIN**[1]	***P***[2]
Dob (godine)	38 (32 – 46)	37 (29 – 42)	0,065
Težina (kg**)**	65 (59 - 75)	63 (58 - 70)	0,121
Visina (cm)	168 (164 - 172)	168 (165 - 170)	0,750
BMI (kg/m^2)	23 (21 - 27)	22 (21 - 24)	0,068
Reproduktivna dob (n, %)	92 84	61 94	0,108
Postmenopauza (n, %)	17 16	4 6	

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) ili kao apsolutni broj i postotak.
[2]Testirano Mann-Whitneyevim testom ili χ^2 -testom.

4.2.2. Koncentracije parametara lipidnoga statusa

Koncentracije parametara lipidnog statusa uspoređene su između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om te su rezultati prikazani u tablici 7. Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i apoB ne razlikuje se između dviju ispitivanih skupina. Koncentracija HDL kolesterola mnogo je niža (*P* <0,001), a koncentracija apoAI mnogo je viša (*P* = 0,006) u skupini ispitanica s CIN-om.

Tablica 7. Koncentracije parametara lipidnoga statusa u ispitivanim skupinama.

	Kontrolne ispitanice[1]	**CIN**[1]	***P***[2]
Trigliceridi (mmol/L)	1,0 (0,7 - 1,3)	0,9 (0,7 - 1,2)	0,716
Kolesterol (mmol/L)	5,3 (4,9 - 6,4)	5,3 (4,9 - 6,1)	0,562
HDL (mmol/L)	1,8 (1,5 - 2,0)	1,4 (1,3 - 1,6)	**<0,001**
LDL (mmol/L)	3,1 (2,7 - 3,8)	3,3 (2,8 - 4,1)	0,228
apoAI (g/L)	1,73 (1,58 – 1,99)	1,88 (1,74 – 2,07)	**0,006**
apoB (g/L)	0,93 ± 0,26	0,88 ± 0,25	0,204

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) ili kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
[2] Testirano Mann-Whitneyevim testom ili nezavisnim t-testom.
Lipoprotein velike gustoće (HDL); lipoprotein male gustoće (LDL); apolipoprotein AI (apoAI); apolipoprotein B (apoB).

4.2.3. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa

Biljezi oksidacijskog stresa uspoređeni su između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa (slobodnih tiolnih skupina, MDA i GSH) prikazane su u tablici 8. Koncentracija tiolnih skupina nije se razlikovala između kontrolne skupine ispitanica i ispitanica s CIN-om. Koncentracija MDA-a je niža (P <0,001), a koncentracija GSH-a viša (P <0,001) u skupini ispitanica s CIN-om.

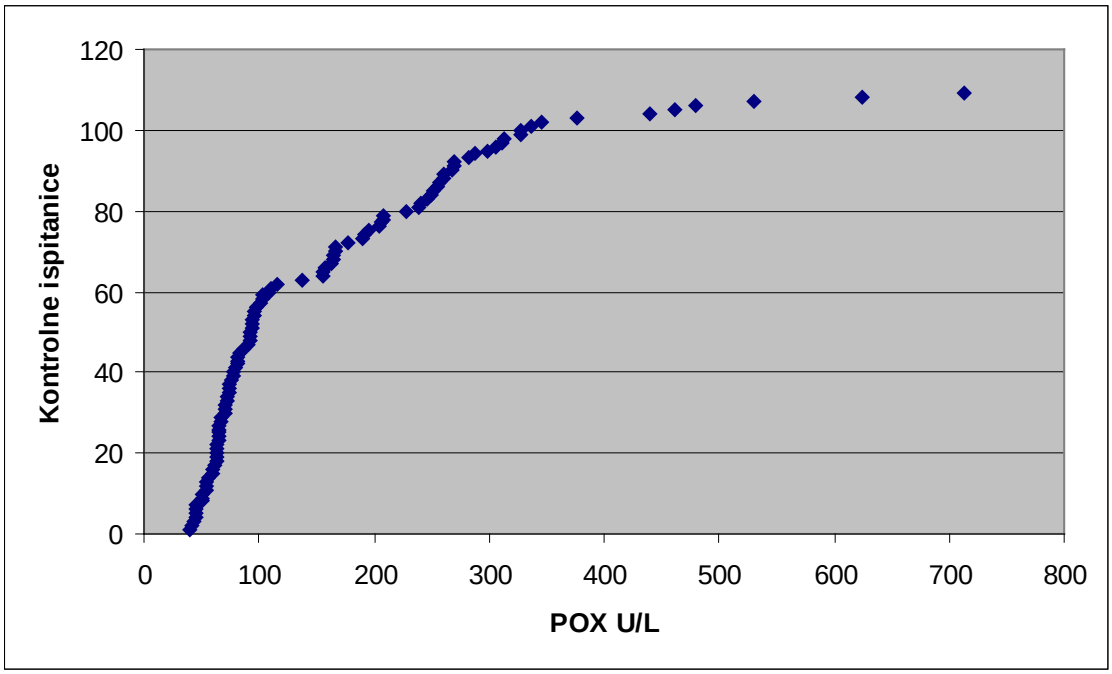
Tablica 8. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa u ispitivanim skupinama.

	Kontrolne ispitanice[1]	**CIN**[1]	***P***[2]
Tioli (mmol/L)	0,362 (0,332 - 0,389)	0,352 (0,304 - 0,404)	0,519
MDA (µmol/L)	0,76 (0,57 - 1,15)	0,39 (0,27 - 0,55)	**<0,001**
GSH (µg/mL)	53,41 (34,75 - 134,41)	111,98 (66,02 - 129,56)	**<0,001**

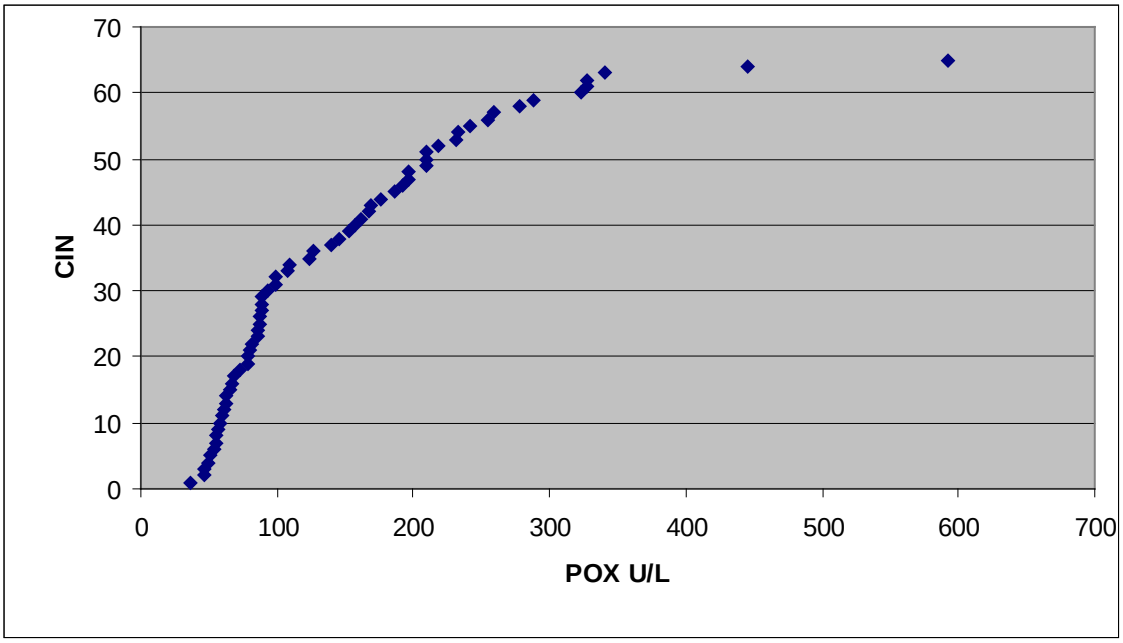
[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2]Testirano Mann-Whitneyevim testom.
Malondialdehid (MDA); reducirani glutation (GSH).

4.2.4. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1

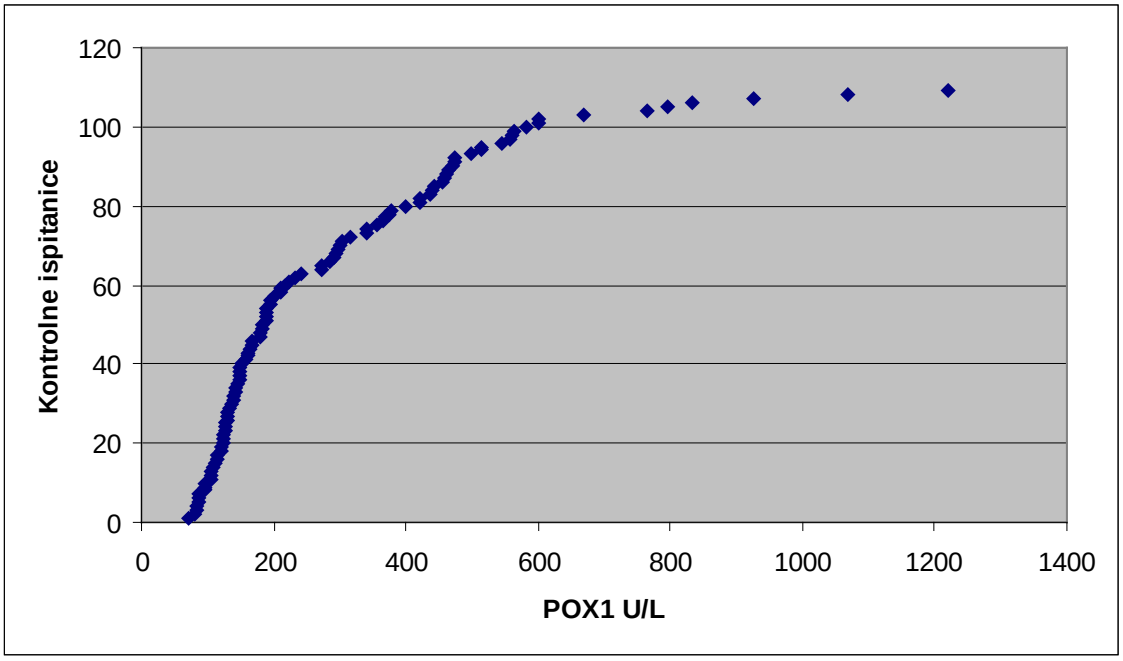
Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 uspoređena je između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. Raspon POX-a u kontrolnoj je skupini ispitanika od 39 do 714 U/L, a u skupini s CIN-om od 37 do 592 U/L. Raspon POX/HDL u kontrolnoj skupini je od 24 do 355 U/mmol, a u skupini s CIN-om od 19 do 556 U/mmol. Raspon je POX/apoAI u kontrolnoj skupini od 23 do 383 U/g, dok je u skupini s CIN-om od 17 do 309 U/g. Raspodjela POX-a i u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanica s CIN-om jest bimodalna (slika 22. i slika 23). Raspon POX1 u kontrolnoj je skupini od 72 do 1219 U/L, a u skupini s CIN-om od 68 do 1139 U/L. Raspon POX1/HDL u kontrolnoj je skupini od 45 do 612 U/mmol, a u skupini s CIN-om od 36 do 964 U/mmol. Raspon POX1/apoAI u kontrolnoj je skupini od 45 do 656 U/g, dok je u skupini s CIN-om od 30 do 535 U/g. Raspodjela POX1 u objema ispitivanim skupinama je bimodalna (slika 24. i slika 25.). Raspon ARE u kontrolnoj je skupini od 32 do 116 kU/L, a u skupini s CIN-om od 9 do 93 kU/L. Raspon ARE/HDL je od 22 do 73 kU/mmol u kontrolnoj skupini i od 7 do 96 kU/mmol u skupini s CIN-om. Raspon ARE/apoAI je od 18 do 68 kU/g u kontrolnoj skupini i od 5 do 66 kU/g u skupini s CIN-om. Raspodjela ARE je unimodalna i u kontrolnoj i u skupini s CIN-om (slika 26. i slika 27.). Vrijednosti POX, POX/HDL, POX/apoAI, POX1, POX1/HDL, POX1/apoAI, ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI u ispitivanim skupinama prikazane su u tablici 9.



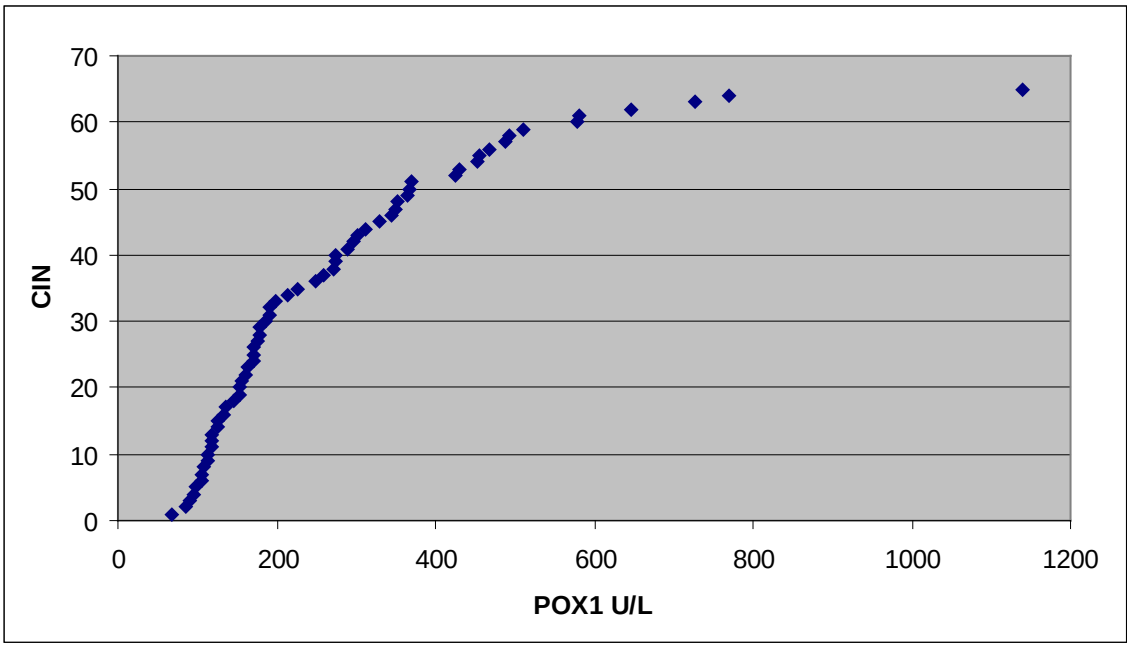
Slika 22. Raspodjela bazalne paraoksonazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica.



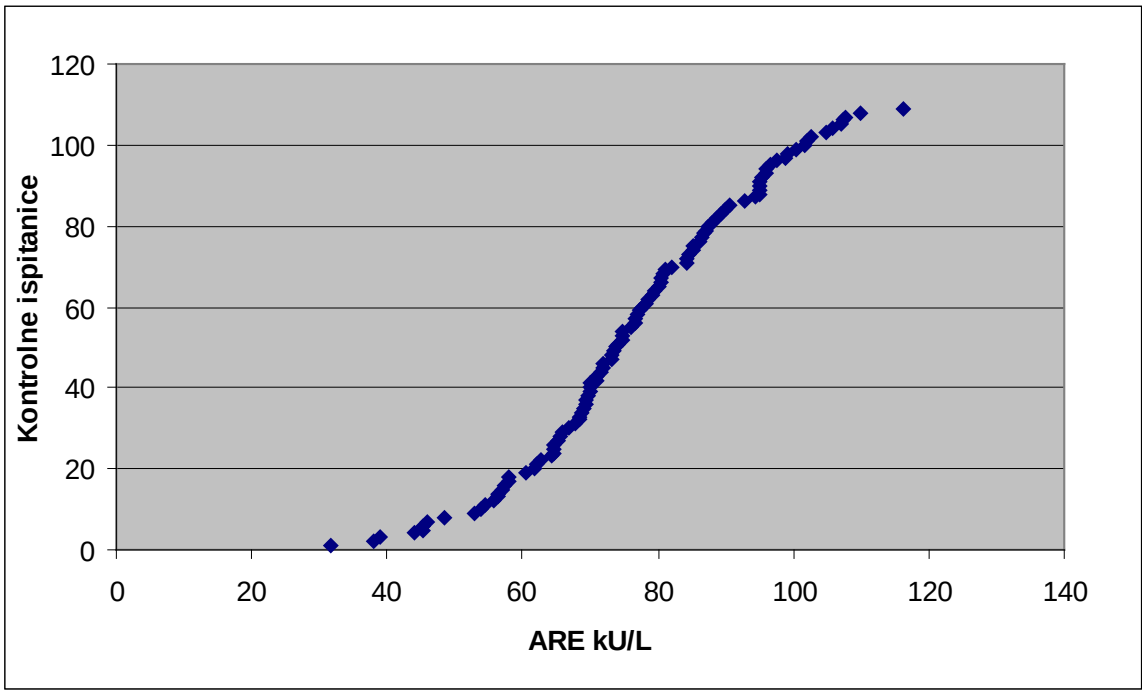
Slika 23. Raspodjela bazalne paraoksonazne aktivnosti PON1 u skupini ispitanica s CIN-om.



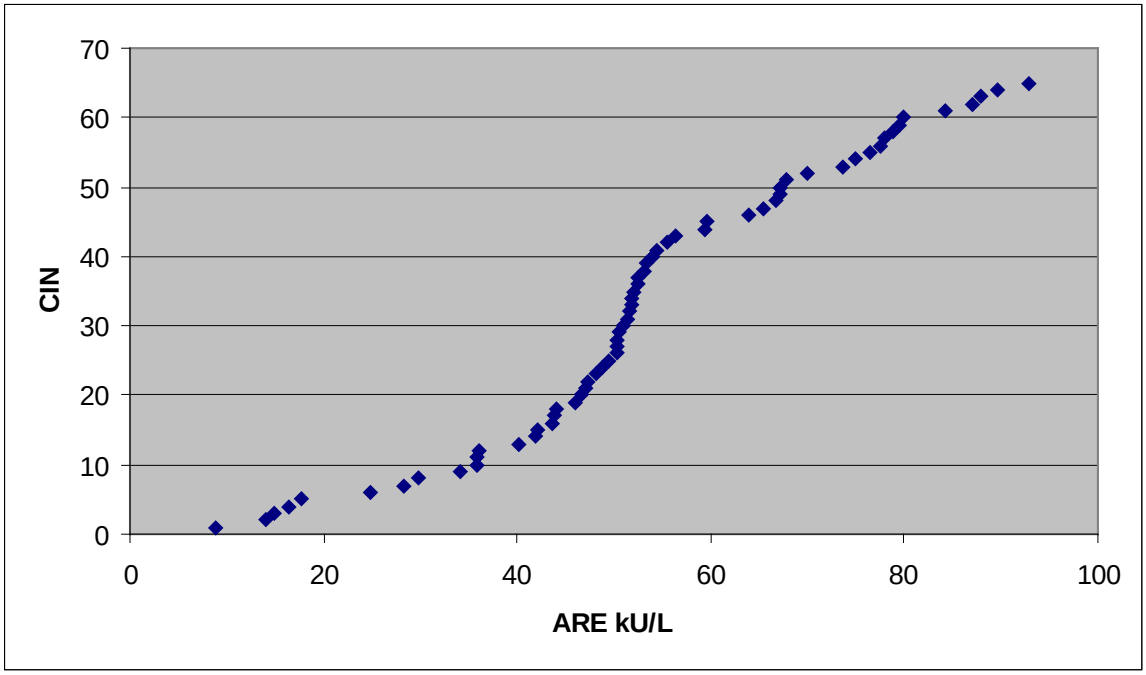
Slika 24. Raspodjela NaCl-stimulirane paraoksonazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica.



Slika 25. Raspodjela NaCl-stimulirane paraoksonazne aktivnosti PON1 u skupini ispitanica s CIN-om.



Slika 26. Raspodjela arilesterazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica.



Slika 27. Raspodjela arilesterazne aktivnosti PON1 u skupini ispitanica s CIN-om.

Tablica 9. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 u ispitivanim skupinama.

	Kontrolne ispitanice[1]	**CIN**[1]	***P***[2]
POX (U/L)	96 (67 - 242)	107 (69 - 209)	0,929
POX/HDL (U/mmol)	51 (39 - 134)	73 (49 - 153)	0,076
POX/apoAI (U/g)	54 (37 - 137)	51 (40 - 115)	0,444
POX1 (U/L)	194 (131 - 426)	199 (136 - 366)	0,985
POX1/HDL (U/mmol)	101(75 - 237)	133 (97 - 271)	0,065
POX1/apoAI (U/g)	105 (74 - 245)	101 (78 - 207)	0,499
ARE (kU/L)	77 ± 17	53 ± 19	**<0,001**
ARE/HDL (kU/mmol)	43 (37 - 50)	37 (28 - 44)	**<0,001**
ARE/apoAI (kU/g)	44 ± 11	29 ± 11	**<0,001**

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) ili kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.
[2]Testirano Mann-Whitneyevim testom ili nezavisnim t-testom.
Bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 (POX); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 (POX1); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (POX/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX/apoAI); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (POX1/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX1/apoAI); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI).

POX, POX/HDL i POX/apoAI isto kao i POX1, POX1/HDL i POX1/apoAI ne razlikuju se značajno između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. ARE je mnogo niža u skupini ispitanica s CIN-om (P <0,001) isto kao i ARE/HDL (P<0,001) i ARE/apoAI (P<0,001). S obzirom na kontrolnu skupinu ispitanica u skupini ispitanica s CIN-om, ARE je niža 31 %, ARE/HDL 14 %, a ARE/apoAI 34 %. U kontrolnoj skupini ispitanica nije utvrđena povezanost ARE i HDL (r_p = 0,324, P <0,001) ni ARE i apoAI (r_s = 0,253, P = 0,009). U skupini ispitanica s CIN-om također nije utvrđena povezanost ARE s HDL-om (r_s = 0,0760, P = 0,546) ni ARE s apoAI (r_s = 0,0786, P = 0,533).

4.2.5. Dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije parametara lipidnoga statusa, oksidacijskoga stresa i arilesterazne aktivnosti paraoksonaze 1

Ispitana je dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije parametara lipidnoga statusa, oksidacijskoga stresa i arilesterazne aktivnosti PON1 za razlikovanje zdrave skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. U obzir su uzeti samo oni parametri čija se koncentracija ili aktivnost znatno razlikovala između ispitivanih skupina. U tablici 10. prikazani su rezultati ispitivanja dijagnostičke točnosti analizom krivulje ROC (od eng. *reciever operating characteristic*) uz pripadajuće površine ispod krivulje (AUC; od eng. *area under the curve*), dijagnostičku specifičnost i osjetljivost te pripadajuće optimalne granične vrijednosti za HDL, apoAI, MDA i GSH te za ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI.

Tablica 10. Dijagnostička točnost u razlikovanju zdrave skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om.

	AUC	**95 % interval pouzdanosti**	***P***	**Osjetljivost (%)**	**Specifičnost (%)**	**Optimalna granična vrijednost**
HDL (mmol/L)	0,726	0,654 - 0,791	<0,0001	75	61	≤1,6
apoAI (g/L)	0,625	0,548 - 0,697	0,0043	75	50	>1,73
ARE (kU/L)	0,811	0,745 - 0,866	<0,0001	65	90	≤56
ARE/HDL (kU/mmol)	0,66	0,584 - 0,729	0,0003	57	72	≤38
ARE/apoAI (kU/g)	0,846	0,783 - 0,896	<0,0001	78	77	≤36
MDA (µmol/L)	0,793	0,725 - 0,851	<0,0001	77	76	≤0,57
GSH (µg/mL)	0,681	0,606 - 0,749	<0,0001	98	43	>47,50

Lipoprotein velike gustoće (HDL); apolipoprotein AI (apoAI); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI); malondialdehid (MDA); reducirani glutation (GSH).

Rezultati su pokazali dobru dijagnostičku točnost za koncentraciju HDL-a te dovoljnu dijagnostičku točnost za koncentraciju apoAI. Dijagnostička je osjetljivost i za HDL i za apoAI 75 %, dok je dijagnostička specifičnost za HDL 61 %, a za apoAI manja i iznosi 50 %.

Dijagnostička točnost za ARE i ARE/apoAI vrlo je dobra, a za ARE/HDL je dovoljna. Osjetljivost za ARE je 65 %, dok je specifičnost 90 %. ARE/HDL ima relativno lošu dijagnostičku osjetljivost od 57 % i nešto bolju specifičnost od 72 %. ARE/apoAI ima osjetljivost od 78 % i specifičnost od 77 %. Za koncentraciju MDA dobivena je dobra dijagnostička točnost, dok je za koncentraciju GSH dobivena dovoljna dijagnostička točnost. Dijagnostička osjetljivost za MDA je 77 %, a specifičnost je 76 %. GSH je pokazao iznimno visoku dijagnostičku osjetljivost od 98 %. Nasuprot tomu, dijagnostička specifičnost za GSH je samo 43 %.

Tablica 11. Univarijantna i multivarijantna logistička regresijska analiza parametara lipidnog statusa, oksidacijskog stresa i arilesterazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om.

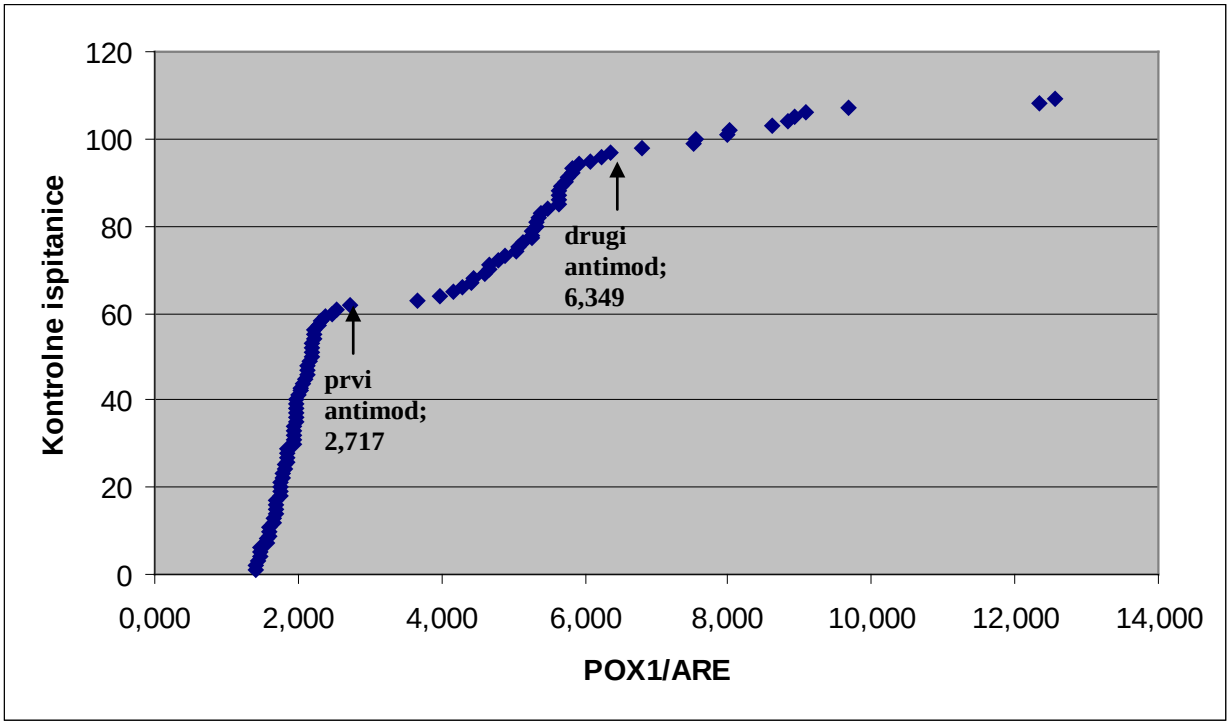
	UNIVARIJANTNA		**MULTIVARIJANTNA**	
	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	***P***	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	***P***
HDL (mmol/L)	0,0851 (0,0294-0,2465)	**<0,0001**		
apoAI (g/L)	4,0633 (1,4039-11,7606)	**0,0081**		
ARE (kU/L)	0,9335 (0,9126-0,9549)	**<0,0001**		
ARE/HDL (kU/mmol)	0,9585 (0,9338-0,9838)	**0,0007**	1,3136 (1,1833-1,4582)	**<0,0001**
ARE/apoAI (kU/g)	0,8734 (0,8359-0,9125)	**<0,0001**	0,6619 (0,5828-0,7517)	**<0,0001**
MDA (µmol/L)	0,1021 (0,0363-0,2873)	**<0,0001**	0,0603 (0,0151-0,2404)	**0,0001**
GSH (µmol/L)	1,0095 (1,0039-1,0152)	**0,0003**	1,0130 (1,0017-1,0245)	**0,0243**

Lipoprotein velike gustoće (HDL); apolipoprotein AI (apoAI); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI); malondialdehid (MDA); reducirani glutation (GSH).

Rezultati univarijantne i multivarijantne analize za parametre lipidnog statusa, oksidacijskog stresa te za arilesteraznu aktivnost PON1 prikazani su u tablici 11. Univarijantnom regresijskom analizom pokazano je da se svi ispitivani parametri mogu razmotriti kao prediktori CIN-a. Multivarijantni logistički regresijski model postigao je AUC (95% CI) od 0,960 (0,919-0,984) te je korektno klasificirao u skupinu CIN-a 89,08 % ispitanica. U ovaj multivarijantni regresijski model uključeni su ARE/HDL, ARE/apoAI, MDA i GSH, dok su HDL, apoAI i ARE isključeni iz ovog multivarijantnog regresijskog modela.

4.2.6. Fenotip paraoksonaze 1

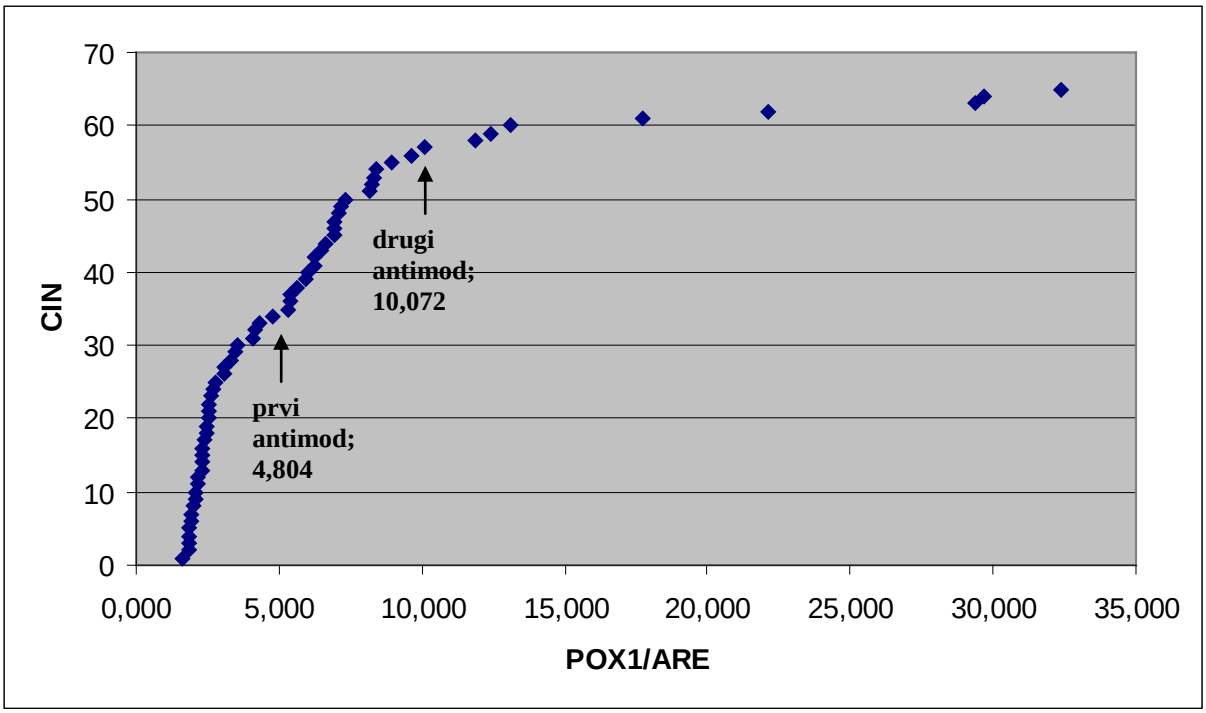
Fenotip PON1 uspoređen je između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. Fenotip PON1 određen je metodom dvostrukog supstrata, a rabljeni su supstrati paraokson i fenilacetat. Na slici 28. prikazana je krivulja raspodjele omjera NaCl-stimulirane paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 za kontrolnu skupinu ispitanica, a na slici 29. za skupinu ispitanica s CIN-om. U objema ispitivanim skupine raspodjela je trimodalna i moguće je odrediti dva antimoda koji razdvajaju fenotip AA, AB i BB. Prvi antimod odvaja ispitanice koje imaju fenotip AA od ispitanica s fenotipom AB i BB, dok drugi antimod odvaja ispitanice s fenotpom AB od ispitanica s fenotipom BB.



Slika 28. Raspodjela omjera NaCl-stimulirane paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica.

U kontrolnoj skupini ispitanica vrijednost omjera POX1/ARE 2,717 predočuje prvi antimod, a vrijednost 6,349 drugi antimod. Ispitanice s fenotipom AA imaju omjer POX1/ARE ≤2,717, s fenotipom AB >2,717 i ≤6,349, a s fenotipom BB >6,349.

U skupini ispitanica s CIN-om vrijednost omjera POX1/ARE 4,804 predočuje prvi antimod, a vrijednost 10,072 drugi antimod. Ispitanice s fenotipom AA imaju omjer POX1/ARE ≤4,804, s fenotipom AB >4,804 i ≤10,072, a s fenotipom BB >10,072.



Slika 29. Raspodjela omjera NaCl-stimulirane paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 u skupini ispitanica s CIN-om.

Učestalost fenotipova AA, AB i BB dane su u tablici 12. Učestalost fenotipova PON1 ne razlikuju se između dviju ispitivanih skupina. U kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om najučestaliji je fenotip AA (kontrolna skupina 57 %, CIN 52 %), dok je najmanje učestali fenotip BB (kontrolna skupina 11 %, CIN 12 %).

Tablica 12. Učestalost fenotipova PON1 u ispitivanim skupinama.

	AA		**AB**		**BB**		***P*[4]**
	n	%	n	%	n	%	
Kontrolne ispitanice[1]	62	57	35	32	12	11	0,842
CIN[1]	34	52	23	36	8	12	

[1]Rezultati su prikazani kao broj (n) i postotak (%) ispitanika s određenim fenotipom.
[2] Testirano χ^2-testom.
Fenotip AA (homozigoti – niska aktivnost), fenotip AB (heterozigoti – srednja aktivnost), fenotip BB (homozigoti – visoka aktivnost).

4.2.7. Polimorfizmi Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1*

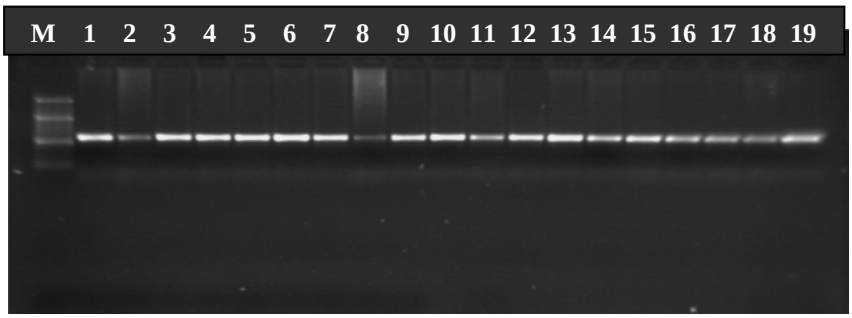
Polimorfizam Q192R označuje zamjenu glutamina argininom na poziciji 192 (SNP ID rs662). Ova promjena aminokiseline rezultat je zamjene nukleotida A s G, što rezultira zamjenom kodona CAA u CGA u egzonu 6 gena *pon1*. Zamjena ovih nukleotida rezultira formiranjem restrikcijskoga mjesta za restrikcijski enzim AlwI.

Polimorfizam L55M označuje zamjenu leucina metioninom na poziciji 55 (SNP ID rs854560). Ova promjena aminokiseline rezultat je zamjene nukleotida T s A, što rezultira zamjenom kodona TTG u ATG u egzonu 3 gena *pon1*. Zamjena tih nukleotida rezultira formiranjem restrikcijskoga mjesta za restrikcijski enzim Hin1II.

Polimorfizam –108C>T označuje da se na poziciji –108 u promotorskoj regiji gena *pon1* može nalaziti C ili T (SNP ID rs705381). Prisutnost citozina na poziciji – 108 zajedno s uvedenim dodatnim nukleotidom u 1_{CT} početnici označenim malim slovom „a“ stvaraju restrikcijsko mjesto za restrikcijski enzim BsrBI.

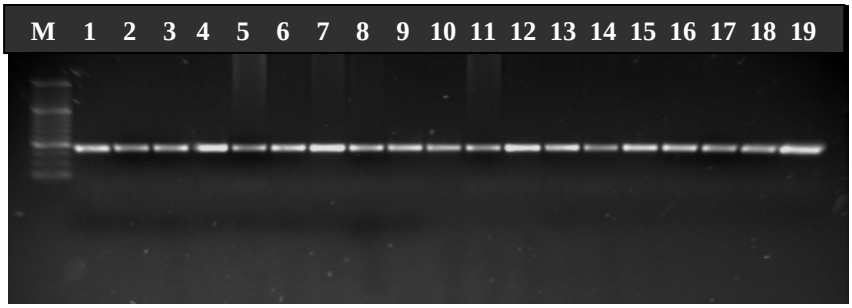
4.2.7.1. Umnažanje dijela DNA koji sadržava polimorfno mjesto lančanom reakcijom polimeraze

Nakon provedene reakcije umnažanja fragmenata DNA PCR metodom uspješnost umnažanja provjerava se elektroforezom na 2 %-tnom agaroznom gelu. Veličina fragmenta umnoženog s parom početnica za polimorfizam Q192R jest 238 pb, veličina fragmenta umnoženog s parom početnica za polimorfizam L55M iznosi 172 pb, a s parom početnica za polimorfizam –108C>T je 240 pb.



238 pb

Slika 30. Kontrolna elektroforeza (2 %-tni agarozni gel) umnoženih fragmenata s parom početnica za polimorfizam Q192R; 1 – 19 umnoženi fragmenti, M 50 pb standard DNA.



172 pb

Slika 31. Kontrolna elektroforeza (2 %-tni agarozni gel) umnoženih fragmenata s parom početnica za polimorfizam L55M; 1 – 19 umnoženi fragmenti, M 50 pb standard DNA.

240 pb

Slika 32. Kontrolna elektroforeza (2 %-tni agarozni gel) umnoženih fragmenata s parom početnica za polimorfizam –108C>T; 1 – 19 umnoženi fragmenti, M 50 pb standard DNA.

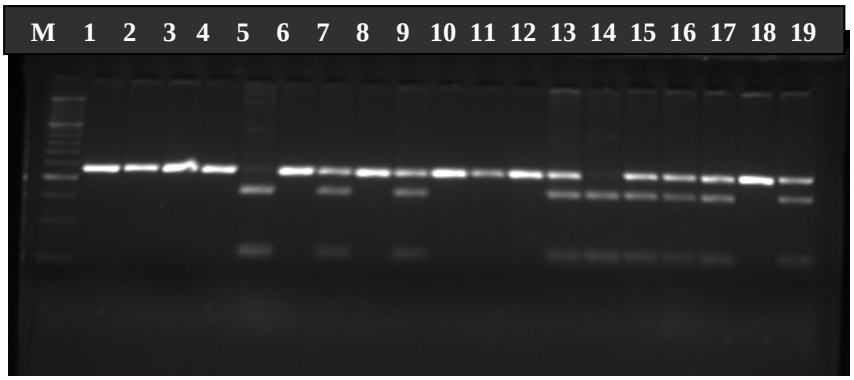
4.2.7.2. Određivanje genotipova polimorfizama gena *pon1*

Na temelju veličine razdvojenih produkata kidanja specifičnim restrikcijskim enzimom određuje se genotip za svaki od triju ispitivanih polimorfizama.

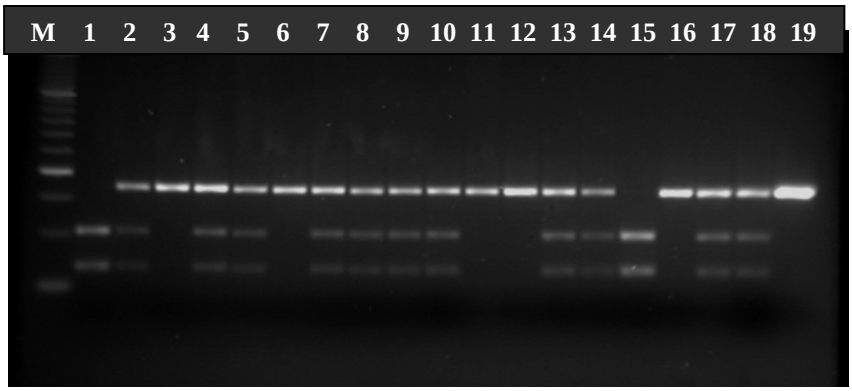
Polimorfizam Q192R gena *pon1*: kod homozigota za alel Q192 (genotip QQ) nalazi se nepokidani fragment od 238 pb, kod homozigota za alel R192 (genotip RR) nalaze se pokidani fragmenti od 175 i 63 pb, dok se u heterozigota (genotip QR) nalaze nepokidani fragment od 238 pb i pokidani fragmenti od 175 i 63 pb (slika 33.).

Polimorfizam L55M gena *pon1*: kod homozigota za alel L55 (genotip LL) nalazi se nepokidani fragment od 172 pb, kod homozigota za alel M55 (genotip MM) nalaze se pokidani fragmenti od 103 i 69 pb, dok se u heterozigota (genotip LM) nalaze nepokidani fragment od 172 pb i pokidani fragmenti od 103 i 69 pb (slika 34.).

Polimorfizam –108C>T gena *pon1*: kod homozigota za alel –108T (genotip TT) nalazi se nepokidani fragment od 240 pb, kod homozigota za alel –108C (genotip CC) nalaze se pokidani fragmenti od 212 i 28 pb, dok se kod heterozigota (genotip CT) nalazi nepokidani fragment od 240 pb i pokidani fragmenti od 212 i 28 pb (slika 35.).



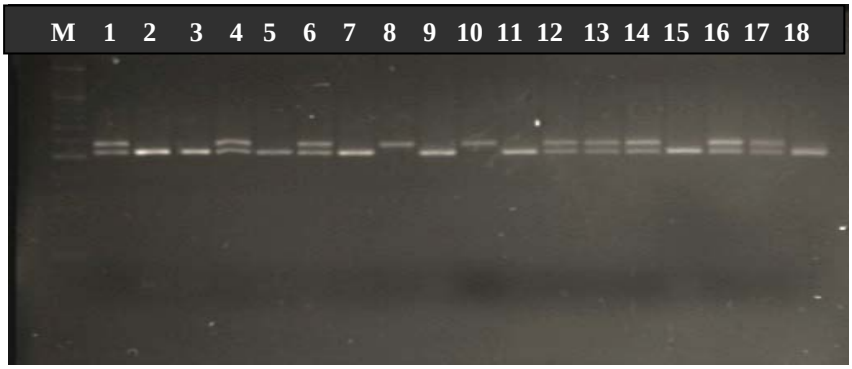
Slika 33. Elektroforeza produkata kidanja restrikcijskim enzimom AlwI u 4%-tnom agaroznom gelu; linija 1 – 4, 6, 8, 10 – 12 i 18 QQ genotip, linija 7, 9, 13, 15 – 17 i 19 QR genotip, linija 5 i 14 RR genotip, M 50 pb standard DNA



172 pb
103 pb

69 pb

Slika 34. Elektroforeza produkata kidanja restrikcijskim enzimom Hin1II u 4%-tnom agaroznom gelu; linija 3, 6, 11, 12, 16 i 19 LL genotip, linija 2, 4, 5, 7 – 10, 13, 14, 17 i 18 LM genotip, linija 1 i 15 MM genotip, M 50 pb standard DNA



240 pb
212 pb

Slika 35. Elektroforeza produkata kidanja restrikcijskim enzimom BsrBI u 4%-tnom agaroznom gelu; linija 2, 3, 5, 7, 9, 11, 15 i 18 CC genotip, linija 1, 4, 6, 12 – 14, 16 i 17 CT genotip, linija 8 i 10 TT genotip, M 50 pb standard DNA. Fragment od 28 pb nije vidljiv nakon razdvajanja produkata kidanja na 4 %-tnom agaroznom gelu.

4.2.7.3. Razdioba genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1*

Učestalosti genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* uspoređene su između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om (tablica 13.). U kontrolnoj skupini ispitanica najučestaliji genotip jest QQ (59 %) za Q192R, LM (42 %) za L55M i CT (45 %) za –108C>T polimorfizme gena *pon1*. U skupini ispitanica s CIN-om najučestaliji su genotipovi QQ (51 %) za Q192R i CT (42 %) za –108C>T polimorfizme gena *pon1*. U skupini ispitanica s CIN-om genotipovi LL i LM za polimorfizam L55M gena *pon1* prisutni su s jednakom učestalosti (43 %). Učestalost genotipova polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* ne razlikuju se značajno između skupine zdravih ispitanica i ispitanica CIN-om.

Tablica 13. Učestalost genotipova polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u ispitivanim skupinama.

Polimorfizam	**Genotip**	**Kontrolne ispitanice**[1]		**CIN**[1]		***P***[2]
		n	%	n	%	
	QQ	64	59	33	51	0,258
***pon1* Q192R**	**QR**	36	33	29	44	
	RR	9	8	3	5	
	LL	43	40	28	43	0,728
***pon1* L55M**	**LM**	46	42	28	43	
	MM	20	18	9	14	
	CC	33	30	23	35	0,784
***pon1* -108C>T**	**CT**	49	45	27	42	
	TT	27	25	15	23	

[1]Rezultati su prikazani kao broj (n) i postotak (%) ispitanika s određenim genotipom.
[2]Testirano χ^2-testom.

Učestalost alela polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* za obje ispitivane skupine prikazane su u tablici 14. Najučestaliji aleli u kontrolnoj skupini ispitanica jesu alel Q (75 %) za Q192R, alel L (61 %) za L55M i alel C (53 %) za -108C>T polimorfizam. U skupini ispitanica s CIN-om također su najučestaliji alel Q (73 %) za Q192R, alel L (65 %) za L55M i alel C (56 %) za –108C>T polimorfizam. Učestalost alela Q192R, L55M i –108C>T polimorfizama gena *pon1* ne razlikuju se značajno između dviju ispitivanih skupina.

Tablica 14. Učestalost alela polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u ispitivanim skupinama.

Polimorfizam	**Aleli**	**Kontrolne ispitanice**[1]		**CIN**[1]		***P***[2]
		n	%	n	%	
***pon1* Q192R**	**Q**	164	75	95	73	0,750
	R	54	25	35	27	
***pon1* L55M**	**L**	132	61	84	65	0,521
	M	86	39	46	35	
***pon1* -108C>T**	**C**	115	53	73	56	0,614
	T	103	47	57	44	

[1]Rezultati su prikazani kao broj (n) i postotak (%) ispitanika s određenim alelom.
[2]Testirano χ^2 -testom.

4.2.7.4. Utjecaj polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* na aktivnost PON1

Ispitan je utjecaj genotipova polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* na POX, POX1 i ARE u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om. POX, POX1 i ARE za pojedine genotipove polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u kontrolnoj skupini ispitanica prikazani su u tablici 15.

Tablica 15. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 i genotipovi polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u kontrolnoj skupini ispitanica.

	POX[1] (U/L)	***P***[2]	**POX1**[1] (U/L)	***P***[2]	**ARE**[1] (kU/L)	***P***[2]
***pon1* Q192R**						
QQ	72 (61 - 93)	**<0,001**	141 (116 - 182)	**<0,001**	75 (64 - 87)	0,216
QR	240 (184 - 269)		421 (329 - 472)		77 (67 - 89)	
RR	462 (341 - 554)		795 (592 - 963)		89 (70 - 100)	
***pon1* L55M**						
LL	228 (112 - 324)	**<0,001**	400 (226 - 563)	**<0,001**	89 (72 - 97)	**<0,001**
LM	80 (67 - 163)		160 (130 - 291)		76 (65 - 81)	
MM	54 (46 - 66)		105 (87 - 128)		60 (47 - 71)	
***pon1* -108C>T**						
CC	246 (95 - 312)	**<0,001**	436 (187 - 558)	**<0,001**	94 (84 - 99)	**<0,001**
CT	96 (67 - 214)		190 (129 - 384)		73 (69 - 82)	
TT	66 (47 - 141)		130 (90 - 251)		60 (50 - 69)	

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2]Testirano Kruskal-Wallisovim testom. Posthock testiranje provedeno je Dunnovom metodom.
Bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 (POX); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 (POX1); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE).

Genotipovi polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* značajno utječu na POX i POX1. POX i POX1 aktivnost najveća je za genotip RR, LL i CC, najniža za genotip QQ, MM i TT, a srednja za genotip QR, LM i CT. Posthock testiranjem Dunnovom metodom ispitano je koji se genotipovi za svaki pojedini polimorfizam međusobno značajno razlikuju u prikazanoj bazalnoj i NaCl-stimuliranoj paraoksonaznoj aktivnosti PON1. POX i POX1 aktivnosti mnogo su veće za genotip RR u odnosu prema genotipu QQ te za genotip QR u odnosu prema genotipu QQ. Između genotipova QR i RR nije utvrđena značajna

razlika. POX i POX1 mnogo su veće za genotip LL s obzirom na genotip MM, za genotip LL s obzirom na genotip LM i za genotip LM s obzirom na genotip MM. POX i POX1 također su mnogo veće za genotip CC u odnosu prema genotipu TT, za genotip CC u odnosu prema genotipu CT i za genotip CT u odnosu prema genotipu TT. ARE se ne razlikuju značajno ovisno o genotipovima polimorfizma Q192R gena *pon1*. Genotipovi polimorfizama L55M i –108C>T gena *pon1* značajno utječu na ARE. Genotipovi LL i CC imaju najvišu, genotipovi MM i TT najnižu, a genotipovi LM i CT srednju aktivnost. Posthock testiranjem Dunnovom metodom ispitano je koji se genotipovi za svaki pojedini polimorfizam međusobno značajno razlikuju u prikazanoj arilesteraznoj aktivnosti PON1. ARE je mnogo viša za genotip LL u usporedbi s genotipom MM, za genotip LL u odnosu prema genotipu LM i za genotip LM u odnosu prema genotipu MM. ARE je također mnogo veća za genotip CC s obzirom na genotip TT, za genotip CC u odnosu prema genotipu CT i za genotip CT s obzirom na genotip TT.

Tablica 16. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 i genotipovi polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u skupini ispitanica s CIN-om.

	POX[1] (U/L)	***P***[2]	**POX1**[1] (U/L)	***P***[2]	**ARE**[1] (kU/L)	***P***[2]
***pon1* Q192R**						
QQ	73 (58 - 88)	**<0,001**	145 (114 - 173)	**<0,001**	52 (44 - 67)	0,094
QR	197 (161 - 245)		351 (286 - 458)		50 (42 - 61)	
RR	445 (357 - 555)		771 (677 - 1047)		77 (60 - 84)	
***pon1* L55M**						
LL	181 (99 -269)	**<0,001**	323 (192 - 491)	**<0,001**	57 (49 - 78)	**0,043**
LM	87 (66 - 181)		168 (131 - 321)		51 (39 - 62)	
MM	54 (46 - 57)		105 (90 - 110)		47 (40 - 53)	
***pon1* -108C>T**						
CC	107 (88 - 273)	**0,011**	214 (173 - 484)	**0,012**	67 (44 - 79)	**0,041**
CT	109 (66 - 196)		199 (129 - 349)		52 (49 - 59)	
TT	63 (51 - 156)		119 (98 - 275)		47 (37 - 52)	

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon);
[2]Testirano Kruskal-Wallisovim testom. Posthock testiranje provedeno je Dunnovom metodom.
Bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 (POX); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 (POX1); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE).

POX, POX1 i ARE za pojedine genotipove polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u skupini ispitanica s CIN-om prikazani su u tablici 16. Genotipovi polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* značajno utječu na POX i POX1. POX i POX1 aktivnost najveća je za genotip RR, LL i CC, najniža za genotip QQ, MM i TT, a srednja za genotip QR, LM i CT. Iznimka je POX za polimorfizam –108C>T gena *pon1*, gdje je genotip CT imao najveću, a genotip CC srednju aktivnost. Posthock testiranjem Dunnovom metodom ispitano je koji se genotipovi za svaki pojedini polimorfizam međusobno značajno razlikuju u prikazanoj bazalnoj i NaCl-stimuliranoj paraoksonaznoj aktivnosti PON1. POX i POX1 aktivnosti mnogo su veće za genotip RR u odnosu prema genotipu QQ te za genotip QR u odnosu prema genotipu QQ. Između genotipova QR i RR nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti. POX i POX1 mnogo su veće za genotip LL s obzirom na genotip MM, za genotip LL s obzirom na genotip LM i za genotip LM s obzirom na genotip MM. POX i POX1 mnogo su veće za genotip CC u odnosu prema genotipu TT. Nije utvrđena značajna razlika u aktivnosti između genotipova CC i CT i između genotipova CT i TT. Kao i kod kontrolne skupine ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om ARE se ne razlikuje značajno ovisno o genotipovima polimorfizma Q192R gena *pon1*. ARE je značajno različita ovisno o genotipovima polimorfizma L55M gena *pon1*. Genotip LL ima najvišu, genotip LM srednju, a genotip MM najnižu aktivnost. Genotipovi polimorfizma –108C>T gena *pon1* također znatno utječu na ARE. Genotip CC ima najveću, genotip CT srednju, a genotip TT najnižu aktivnost. Posthock testiranje pokazalo je da genotip CC ima mnogo veću ARE u odnosu prema genotipu TT, dok između genotipova CC i CT te genotipova CT i TT nema razlike u aktivnosti.

U tablici 17. uspoređena je ARE za svaki pojedini genotip polimorfizama L55M i -108C>T gena *pon1* između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. U skupini ispitanica s CIN-om ARE je značajno niža za svaki pojedini genotip polimorfizama L55M i -108C>T gena *pon1* u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica.

Tablica 17. Arilesterazna aktivnost PON1 i genotipovi polimorfizama L55M i –108C>T gena *pon1* u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om.

	ARE (kU/L)		
	Kontrolne ispitanice[1]	**CIN**[1]	***P***[2]
***pon1* L55M**			
LL	89 (72 - 97)	57 (49 - 78)	**<0,001**
LM	76 (65 - 81)	51 (39 - 62)	**<0,001**
MM	60 (47 - 71)	47 (40 - 53)	**0,017**
***pon1* -108C>T**			
CC	94 (84 - 99)	67 (44 - 79)	**<0,001**
CT	73 (69 - 82)	52 (49 - 59)	**<0,001**
TT	60 (50 - 69)	47 (37 - 52)	**0,003**

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2] Testirano Mann-Whitneyevim testom.
Arilesterazna aktivnost PON1 (ARE).

4.3. ISPITIVANI PARAMETRI U ZDRAVIH ISPITANICA I U ISPITANICA S PREMALIGNIM PROMJENAMA VRATA MATERNICE NISKOG I VISOKOG RIZIKA

Koncentracije parametara lipidnoga statusa i oksidacijskoga stresa, paraoksonazna i arilesterazna aktivnosti PON1, fenotipovi PON1 i razdioba genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* gena uspoređeni su između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om koje su podijeljene u dvije podskupine. Jednu podskupinu činile su ispitanice koje su imale CIN niskog rizika (LG; od eng. *low grade,* n=18) koje su PHD analizom bile svrstane u skupinu CIN1 promjena, a drugu podskupinu činile su ispitanice s CIN-om visokog rizika (HG; od eng. *high grade,* n=47) koje su PHD analizom svrstane u skupinu CIN2, CIN3 i CIS promjena.

4.3.1. Koncentracije parametara lipidnoga statusa

Parametri lipidnog statusa uspoređeni su između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama. Koncentracije parametara lipidnoga statusa u ispitivanim skupinama prikazane su u tablici 18.

Tablica 18. Koncentracije parametara lipidnoga statusa u ispitivanim skupinama.

	Kontrolne ispitanice[1]	**LG**[1]	**HG**[1]	***P***[2]
Trigliceridi (mmol/L)	1,0 (0,7 - 1,3)	1,0 (0,8 - 1,5)	0,9 (0,7- 1,2)	0,331
Kolesterol (mmol/L)	5,3 (4,9 - 6,4)	5,3 (4,6 - 5,9)	5,3 (4,9 - 6,2)	0,839
HDL (mmol/L)	1,8 (1,5 - 2,0)	1,5 (1,3 - 1,8)	1,4 (1,3 - 1,6)	**<0,001**
LDL (mmol/L)	3,1 (2,7 - 3,8)	3,1 (2,6 - 3,8)	3,4 (3,0 - 4,1)	0,255
apoAI (g/L)	1,73 (1,58 - 1,99)	1,92 (1,76 - 2,16)	1,88 (1,73 - 2,05)	**0,016**
apoB (g/L)	0,91 (0,74 - 1,10)	0,77 (0,67 - 0,91)	0,88 (0,70 - 1,03)	0,248

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2]Testirano Kruskal-Wallisovim testom. Posthoc testiranje provedeno je Dunnovom metodom.
CIN niskog rizika (LG); CIN visokog rizika (HG); Lipoprotein velike gustoće (HDL); lipoprotein male gustoće (LDL); apolipoprotein AI (apoAI); apolipoprotein B (apoB).

Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i apoB nisu se razlikovale između kontrolne skupine ispitanica, skupine ispitanica s LG promjena i skupine ispitanica s HG promjenama. Koncentracije HDL kolesterola (P <0,001) i apoAI (P = 0,016) značajno se razlikuju između triju ispitivanih skupina. Posthoc testiranjem utvrđeno je da je koncentracija HDL-a mnogo veća u kontrolnoj skupini ispitanica u odnosu prema skupini ispitanica s LG promjenama te također u kontrolnoj skupini ispitanica u usporedbi sa skupinom ispitanica s HG promjenama.

4.3.2. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa

Biljezi oksidacijskog stresa uspoređeni su između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa u ispitivanim skupinama prikazane su u tablici 19. Koncentracija tiolnih skupina ne razlikuje se između kontrolne skupine ispitanica i između skupine ispitanica s LG i HG promjenama.

Tablica 19. Koncentracije biljega oksidacijskoga stresa u ispitivanim skupinama.

	Kontrolne ispitanice[1]	**LG**[1]	**HG**[1]	***P***[2]
Tioli (mmol/L)	0,362 (0,332 - 0,389)	0,327 (0,304 - 0,395)	0,365 (0,306 - 0,411)	0,309
MDA (µmol/L)	0,755 (0,573 - 1,150)	0,668 (0,383 - 0,886)	0,350 (0,244 - 0,457)	**<0,001**
GSH (µg/mL)	53,41 (34,75 - 134,41)	117,94 (62,72 - 139,52)	111,42 (67,55 - 126,10)	**<0,001**

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2]Testirano Kruskal-Wallisovim testom. Posthoc testiranje provedeno je Dunnovom metodom.
CIN niskog rizika (LG); CIN visokog rizika (HG); malondialdehid (MDA); reducirani glutation (GSH).

Koncentracija MDA-a značajno se razlikuje između triju ispitivanih skupina (P <0,001). Posthoc testiranjem utvrđeno je da kontrolna skupina ima mnogo veću koncentraciju MDA-a u odnosu prema skupini s HG promjenama te da skupina ispitanica s LG promjenama ima mnogo veću koncentraciju MDA-a u usporedbi sa skupinom s HG promjenama.

Koncentracija GSH-a također se značajno razlikuje između triju ispitivanih skupina (P <0,001). Posthoc testiranje pokazalo je da kontrolna skupina ispitanica ima mnogo nižu koncentraciju GSH-a u odnosu prema skupini s LG promjenama, te da je također mnogo niža koncentracija GSH-a u kontrolnoj skupini ispitanica nego u skupini s HG promjenama. Koncentracija GSH-a između skupine s LG promjenama i skupine s HG promjenama ne razlikuje se značajno.

4.3.3. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1

Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 uspoređena je između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 prikazana je u tablici 20. POX, POX/HDL, POX/apoAI te POX1, POX1/HDL i POX1/apoAI ne razlikuju se između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama. ARE (*P* <0,001), ARE/HDL (*P* <0,001) i ARE/apoAI (*P* <0,001) razlikuje se između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama.

Tablica 20. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 u ispitivanim skupinama.

	Kontrolne[1] ispitanice	**LG[1]**	**HG[1]**	***P*[2]**
POX (U/L)	96 (67 - 242)	172 (99 - 242)	89 (63 - 188)	0,114
POX/HDL (U/mmol)	51 (39 -134)	121 (59 - 161)	62 (45 - 139)	0,067
POX/apoAI (U/g)	53 (37 - 137)	99 (46 - 122)	44 (35 - 109)	0,149
POX1 (U/L)	194 (131 - 426)	302 (192 - 430)	178 (121 - 337)	0,125
POX1/HDL (U/mmol)	101 (75 - 237)	215 (119 - 284)	121 (88 - 246)	0,061
POX1/apoAI (U/g)	105 (74 - 245)	173 (94 - 216)	86 (71 - 199)	0,179
ARE (kU/L)	76 (66 - 89)	48 (36 - 74)	52 (46 - 67)	**<0,001**
ARE/HDL (kU/mmol)	43 (37 - 50)	33 (28 - 38)	38 (28 - 45)	**<0,001**
ARE/apoAI (kU/g)	42 (37 - 51)	26 (18 - 30)	29 (24 - 36)	**<0,001**

[1]Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).
[2]Testirano Kruskal-Wallisovim testom. Posthoc testiranje provedeno je Dunnovom metodom.
CIN niskog rizika (LG); CIN visokog rizika (HG); bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 (POX); bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (POX/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX/apoAI); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 (POX1); NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (POX1/HDL) i na koncentraciju apoAI (POX1/apoAI); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL–a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI).

Posthoc testiranjem utvrđeno je da su ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI viši u kontrolnoj skupini ispitanica nego u skupini s LG promjenama te u kontrolnoj skupini ispitanica u usporedbi sa skupinom s HG promjenama. ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI ne razlikuju se značajno između skupine s LG promjenama i skupine s HG promjenama.

U kontrolnoj skupini ispitanica nije utvrđena povezanost ARE i HDL (r_p = 0,324, *P* <0,001) ni ARE i apoAI (r_s = 0,253, *P* = 0,009). U skupini ispitanica s LG promjenama i s HG promjenama također nije utvrđena povezanost ARE s HDL (r_p = 0,0254, *P* = 0,920; r_p = 0,105, *P* = 0,484) ni ARE s apoAI (r_p = -0,156, *P* = 0,537; r_p = 0,152, *P* = 0,308).

4.3.4. Dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije parametara lipidnoga statusa, oksidacijskoga stresa i arilesterazne aktivnosti PON1

Ispitana je dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije HDL, GSH te ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI za razlikovanje zdrave skupine ispitanica i skupine ispitanica s LG promjenama vrata maternice. U tablici 21. prikazani su rezultati ispitivanja dijagnostičke točnosti analizom krivulje ROC uz pripadajuće površine ispod krivulje, dijagnostičku specifičnost i osjetljivost te pripadajuće optimalne granične vrijednosti. Rezultati su pokazali dovoljnu dijagnostičku točnost za koncentraciju HDL-a te osjetljivost od 67 % i specifičnost od 72 %. Dijagnostička točnost za ARE i ARE/apoAI vrlo je dobra, dok je za ARE/HDL dobra. Dijagnostička osjetljivost za ARE je 72 %, a za ARE/HDL i za ARE/apoAI 78 %. Dijagnostička je specifičnost za ARE i ARE/apoAI visoka i iznosi 92 i 90 %, a za ARE/HDL nešto je niža i iznosi 72 %. Za koncentraciju GSH-a dobivena je dovoljna dijagnostička točnost, 100 %-tna osjetljivost i niska specifičnost od samo 47 %.

Tablica 21. Dijagnostička točnost u razlikovanju zdrave skupine ispitanica i skupine ispitanica s LG promjenama vrata maternice.

	AUC	**95%-tni interval pouzdanosti**	***P***	**Osjetljivost (%)**	**Specifičnost (%)**	**Optimalna granična vrijednost**
HDL (mmol/L)	0,698	0,610 - 0,776	0,0061	67	72	≤1,5
ARE (kU/L)	0,817	0,739 - 0,880	<0,001	72	92	≤53
ARE/HDL (kU/mmol)	0,732	0,647 - 0,807	0,0030	78	72	≤38
ARE/apoAI (kU/g)	0,855	0,782 - 0,911	<0,0001	78	90	≤30
GSH (µg/mL)	0,689	0,601 - 0,768	0,0001	100	47	>50,8

Lipoprotein velike gustoće (HDL); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI); reducirani glutation (GSH).

Tablica 22. Univarijantna i multivarijantna logistička regresija parametara lipidnog statusa, oksidacijskog stresa i arilesterazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica i skupini ispitanica s LG promjenama vrata maternice.

	UNIVARIJANTNA		**MULTIVARIJANTNA**	
	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	***P***	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	***P***
HDL (mmol/L)	0,1414 (0,0301-0,6642)	**0,0074**		
ARE (kU/L)	0,9272 (0,8953-0,9602)	**<0,0001**		
ARE/HDL (kU/mmol)	0,9465 (0,9046-0,9904)	**0,0106**	1,2523 (1,1095 - 1,4135)	**<0,0001**
ARE/apoAI (kU/g)	0,8602 (0,8033-0,9211)	**<0,0001**	0,6650 (0,5620-0,7869)	**<0,0003**
GSH (µmol/L)	1,0090 (1,0004-1,0178)	**0,0406**		

Lipoprotein velike gustoće (HDL); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI); reducirani glutation (GSH).

Rezultati univarijantne i multivarijantne analize za parametre lipidnog statusa, oksidacijskog stresa te za arilesteraznu aktivnost PON1 prikazani su u tablici 22. Univarijantnom regresijskom analizom pokazano je da se svi ispitivani parametri mogu razmotriti kao prediktori LG promjena. Multivarijantni logistički regresijski model postigao je AUC (95% CI) od 0,946 (0,891-0,978) te je korektno klasificirao u skupinu s LG promjenama 93,70 % ispitanica. U ovaj multivarijantni regresijski model uključeni su ARE/HDL i ARE/apoAI dok su ARE, HDL i GSH isključeni iz ovog multivarijantnog regresijskog modela.

Također je ispitana dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije HDL-a, GSH-a, ARE-a, ARE/HDL-a i ARE/apoAI-a za razlikovanje zdrave skupine ispitanica i skupine ispitanica s HG promjenama vrata maternice. U tablici 23. prikazani su rezultati ispitivanja dijagnostičke točnosti ispitane analizom ROC krivulje uz pripadajuće površine ispod krivulje, dijagnostičku specifičnost i osjetljivost te pripadajuće optimalne granične vrijednosti. Rezultati su pokazali dobru dijagnostičku točnost za koncentraciju HDL-a te specifičnost od 79 % i osjetljivost od 61 %. Dijagnostička točnost za ARE i ARE/apoAI vrlo je dobra, dok je za ARE/HDL dovoljna. Osjetljivost za ARE i ARE/apoAI jest 81 % i 94 %, dok je specifičnost 72 % i 63 %. ARE/HDL ima nisku osjetljivost od 45 % i specifičnost od 79 %. Za koncentraciju GSH-a dobivena je dovoljna dijagnostička točnost te 98 %-tna osjetljivost i 43 %-tna specifičnost.

Tablica 23. Dijagnostička točnost u razlikovanju zdrave skupine ispitanica i skupine ispitanica s HG promjenama vrata maternice.

	AUC	95 % interval pouzdanosti	*P*	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)	Optimalna granična vrijednost
HDL (mmol/L)	0,737	0,661 - 0,804	<0,0001	79	61	≤1,6
ARE (kU/L)	0,808	0,738 - 0,867	<0,0001	81	72	≤68
ARE/HDL (kU/mmol)	0,631	0,551 - 0,707	0,0088	45	79	≤36
ARE/apoAI (kU/g)	0,842	0,775 - 0,895	<0,0001	94	63	≤39
GSH (µg/mL)	0,678	0,598 - 0,750	<0,0001	98	43	>47,5

Lipoprotein velike gustoće (HDL); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI); reducirani glutation (GSH).

Tablica 24. Univarijantna i multivarijantna logistička regresija parametara lipidnog statusa, oksidacijskog stresa i arilesterazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica i skupini ispitanica s HG promjenama vrata maternice.

	UNIVARIJANTNA		**MULTIVARIJANTNA**	
	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	*P*	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	*P*
HDL (mmol/L)	0,0632 (0,0181-0,2210)	<0,0001		
ARE (kU/L)	0,9338 (0,9105-0,9578)	<0,0001		
ARE/HDL (kU/mmol)	0,9557 (0,9269-0,9854)	0,0022	1,3172 (1,1799-1,4704)	<0,0001
ARE/apoAI (kU/g)	0,8719 (0,8297 - 0,9162)	<0,0001	0,6761 (0,5937-0,7699)	<0,0001
MDA (µmol/L)	0,0276 (0,0058-0,1322)	<0,0001	0,0562 (0,0125-0,2530)	0,0002
GSH (µmol/L)	1,0089 (1,0031-1,0146)	0,0010	1,0124 (1,0007-1,0243)	0,0377

Lipoprotein velike gustoće (HDL); arilesterazna aktivnost PON1 (ARE); arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a (ARE/HDL) i na koncentraciju apoAI (ARE/apoAI); malondialdehid (MDA); reducirani glutation (GSH).

Rezultati univarijantne i multivarijantne analize za parametre lipidnog statusa, oksidacijskog stresa te za arilesteraznu aktivnost PON1 prikazani su u tablici 24. Univarijantnom regresijskom analizom pokazano je da se svi ispitivani parametri mogu razmotriti kao prediktori HG promjena. Multivarijantni logistički regresijski model postigla je AUC (95% CI) od 0,957 (0,913-0,983) te je korektno klasificirao u skupinu s HG

promjenama 88,46 % ispitanica. U ovaj multivarijantni regresijski model uključeni su ARE/HDL, ARE/apoAI, GSH i MDA dok su ARE i HDL isključeni iz ovog multivarijantnog regresijskog modela.

Također smo ispitali dijagnostičku točnost za razlikovanje ispitanica s LG i HG promjenama na vratu maternice za jedini parametar čija se koncentracija razlikovala između spomenutih dviju skupina ispitanica. Koncentracija MDA-a pokazala je dobru dijagnostičku točnost (AUC: 0,726; 95 % CI 0,601 – 0,829; P = 0,0042), 85 %-tnu osjetljivost i 67 %-tnu specifičnost za razlikovanje ispitanica s LG i HG promjenama. Pripadajuća je granična vrijednost ≤0,524 µmol/L. Nasuprot tome univarijantnom logističkom regresijskom analizom MDA se nije pokaza kao dobar prediktor HG promjena. Također smo ispitali dijagnostičku točnost MDA za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s HG promjenama. Dijagnostička je točnost vrlo dobra (AUC: 0,863; 95 % CI 0,799 – 0,913; P <0,0001), a osjetljivost i specifičnost su 83 %. Pripadajuća granična vrijednost koncentracije MDA je ≤0,494 µmol/L.

4.3.5. Fenotip paraoksonaze 1

Fenotip PON1 uspoređen je između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama. Učestalost fenotipova PON1 dane su u tablici 25. U kontrolnoj skupini ispitanica kao i u skupini ispitanica s HG promjenama najučestaliji je fenotip AA (kontrolna skupina 57 %, HG 62 %), dok je najmanja učestalost uočena za fenotip BB (kontrolna skupina 11 %, HG 13 %). U skupini ispitanica s LG promjenama najučestaliji je fenotip AB (61 %), a najmanje je učestali fenotip BB (11 %). Učestalost fenotipova PON1 ne razlikuju se značajno između kontrolne skupine ispitanica, skupine ispitanica s LG promenama i skupine ispitanica s HG promjenama.

Tablica 25. Učestalost fenotipova PON1 u ispitivanim skupinama.

	AA		**AB**		**B**		***P*[2]**
	n	%	n	%	n	%	
Kontrolna skupina[1]	62	57	35	32	12	11	0,090
LG[1]	5	28	11	61	2	11	
HG[1]	29	62	12	25	6	13	

[1]Rezultati su prikazani kao broj (n) i postotak (%) ispitanika s određenim fenotipom.
[2]Testirano χ^2 -testom.
Fenotip AA (homozigoti niska aktivnost); fenotip AB (heterozigoti srednja aktivnost), fenotip BB (homozigoti visoka aktivnost); CIN niskog rizika (LG); CIN visokog rizika (HG).

4.3.6. Polimorfizmi Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1*

Razdioba genotipova polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* uspoređena je između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama. U tablici 26. prikazane su učestalosti genotipova polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u ispitivanim skupinama.

Tablica 26. Učestalost genotipova polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u ispitivanim skupinama.

Polimorfizmi	**Genotipovi**	**Kontrolne ispitanice[1]**		**LG[1]**		**HG[1]**		***P*[2]**
		n	%	n	%	n	%	
***pon1* Q192R**	QQ	64	59	7	39	26	55	0,291
	QR	36	33	10	55	19	40	
	RR	9	8	1	6	2	5	
***pon1* L55M**	LL	43	40	10	55	18	38	0,607
	LM	46	42	7	39	21	45	
	MM	20	18	1	6	8	17	
***pon1* -108C>T**	CC	33	30	10	55	13	28	0,273
	CT	49	45	5	28	22	47	
	TT	27	25	3	17	12	25	

[1]Rezultati su prikazani kao broj (n) i postotak (%) ispitanika s određenim genotipom.
[2]testirano χ^2-testom. Zbog maloga broja ispitanica s određenim genotipom statistički značajna razlika između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s LG i s HG promjenama testirana je za genotip QQ i za nositelje R-alela (genotip QR i RR) za polimorfizam Q192R gena *pon1*.
CIN niskog rizika (LG); CIN visokog rizika (HG).

Za polimorfizam Q192R u kontrolnoj skupini ispitanica najučestaliji je genotip QQ (59 %), u skupini ispitanica s LG promjenama najučestaliji je genotip QR (55 %), a u skupini s HG promjenama genotip QQ (55 %). Za polimorfizam L55M u kontrolnoj skupini ispitanica najučestaliji je genotip LM (42 %), u skupini ispitanica s LG promjenama najučestaliji je genotip LL (55 %), a u skupini s HG promjenama genotip LM (45 %). Za polimorfizam –108C>T u kontrolnoj skupini ispitanica najučestaliji je genotip CT (45 %), u skupini

ispitanica s LG promjenama najučestaliji je genotip CC (55 %), a u skupini s HG promjenama genotip CT (47 %). Razdioba genotipova za tri određivana polimorfizma gena *pon1* nije se razlikovala između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama.

U tablici 27. prikazane su učestalosti alela polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u ispitivanim skupinama. Najučestaliji alel polimorfizma Q192R jest alel Q u kontrolnu skupinu ispitanica (75 %), u skupinu ispitanica s LG promjenama (67 %) i u skupini ispitanica s HG promjenama (76 %). Najučestaliji alel polimorfizma L55M jest alel L u kontrolnoj skupini ispitanica (61 %), u skupini ispitanica s LG promjenama (75 %) i u skupini ispitanica s HG promjenama (61 %). Najučestaliji alel polimorfizma -108C>T jest alel C u kontrolnoj skupini ispitanica (53 %), u skupinu ispitanica s LG promjenama (69 %) i u skupini ispitanica s HG promjenama (51 %). Razdioba alela za tri određivana polimorfizma gena *pon1* nije se razlikovala između kontrolne skupine ispitanica i skupina ispitanica s LG i HG promjenama.

Tablica 27. Učestalost alela polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* u ispitivanim skupinama

Polimorfizmi	**Aleli**	**Kontrolne ispitanice[1]**		**LG[1]**		**HG[1]**		***P*[2]**
		n	%					
***pon1* Q192R**	Q	164	75	24	67	71	76	0,529
	R	54	25	12	33	23	24	
***pon1* L55M**	L	132	61	27	75	57	61	0,240
	M	86	39	9	25	37	39	
***pon1* -108C>T**	C	115	53	25	69	48	51	0,141
	T	103	47	11	31	46	49	

[1]Rezultati su prikazani kao broj (n) i postotak (%) ispitanika s određenim alelom.
[2]testirano χ^2 -testom.
CIN niskog rizika (LG); CIN visokog rizika (HG).

5. RASPRAVA

Oksidacijski stres smatra se jednim od čimbenika koji pridonosi razvoju raka. Stoga je svrha provedenog istraživanje bila odrediti aktivnost antioksidacijskog enzima PON1 upotrebom dvaju različitih supstrata (paraokson i fenilacetat) u žena s CIN-om. Također je određen fenotip PON1. Ispitana su i tri polimorfizma gena *pon1* (Q192R, L55M i -108C>T) za koje je iz literaturnih podataka poznato da utječu na paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost te na koncentraciju PON1. Istraživanje je obuhvatilo i određivanje parametara lipidnoga statusa i oksidacijskoga stresa.

Rak vrata maternice drugi je po učestalosti rak u svijetu. Glavni etiološki čimbenik karcinogeneze jest infekcija HPV-om. Klinički se HPV-ovi klasificiraju u skupinu niskog rizika i skupinu visokog rizika na temelju relativne sklonosti lezija uzrokovanih HPV-om da maligno napreduju. Skupina HPV-a niskog rizika rezultira razvojem umjerenih displazija vrata maternice i genitalnih bradavica, dok visoko rizična skupina HPV-a rezultira razvojem dislazije i CIN-a. Većina je infekcija HPV-om supklinička i prolazna (80 %), a izlječenje je rezultat učinkovitoga djelovanja imunosnog odgovora koji ili uklanja virus iz organizma ili ga potiskuje ispod granice detekcije (Ho i sur., 1998.). U malom postotku, kada virus nije potisnut, dolazi do napredovanja infekcije u CIN1 te zatim u CIN2/3. Za razvoj raka vrata maternice iz CIN-a potrebno je više koraka karcinogeneze koji su do sada ostali nerazjašnjeni. Utvrđeno je da oko 10 % CIN1 i 20–30 % CIN2/3 napreduje do raka (Di Domenico i sur., 2012.). Čini se da je prisutnost infekcije HPV-om nužna za razvoj raka vrata maternice, ali je bitno naglasiti da su i drugi kofaktori bitni za razvoj te vrste raka. Ostali su čimbenici rizika uzimanje oralnih kontraceptiva, nizak socio-ekonomski status, maluntricija, pušenje, dob stupanja u spolne odnose i broj seksualnih partnera. Jedan od kofaktora koji je privukao interes istraživača jest i oksidacijski stres (Di Domenico i sur., 2012.; Manju i sur., 2002b.).

U normalnim fiziološkim uvjetima u organizmu postoji ravnoteža između endogenih oksidansa i antioksidansa. U organizmu postoje enzimski i neenzimski antioksidacijski sustavi. Neenzimski antioksidacijski sustavi uključuju bilirubin, glutation te vitamine A, C i E, dok enzimski antioksidacijski sustavi uključuju SOD, GPx i CAT. Jedan od enzima koji je bitan za sakupljanje slobodnih radikala u organizmu jest i PON1. Neravnoteža u stvaranju i uklanjanju ROS-a rezultira razvojem oksidacijskoga stresa te u takvim uvjetima ROS može dovesti do oštećenja staničnih lipida, proteina i DNA. Poznato je da su oksidacijski stres i ROS uključeni u inicijaciju i promociju razvoja raka (Di Domenico i sur., 2012.; Looi i sur., 2008.; Sozmen i sur., 2008.). Istraživanja su pokazala da lipidna peroksidacija može imati važnu ulogu u razvoju raka te je visoka koncentracija lipidnih peroksida povezana s

karcinogenezom na životinjskim modelima (Delimaris i sur., 2007.). Povećana koncentracija ROS-a i/ili njihovo nedostatno uklanjanje staničnim ili plazmatskim antioksidansima rezultira stvaranjem produkata lipidne peroksidacije na LDL-u. oLDL se smatra neovisnim mitogenim faktorom koji inducira proliferaciju ili staničnu smrt te može pridonijeti nastanku i napredovanju raka povećavajući oslobađanje citokina i faktora rasta (Delimaris i sur., 2007.).

PON1 je enzim koji se sintetizira u jetri i nakon sinteze izlučuje se u krvnu plazmu, gdje se najvećim dijelom veže na HDL (Draganov i sur., 2004.; Fuhrman i sur., 2005.). Enzim putem svoje organofosfatazne, arilesterazne i laktonazne aktivnosti hidrolizira velik broj raznolikih supstrata. PON1 pripisuje se antiaterogeno i antioksidacijsko djelovanje (Draganov i sur., 2004., Grdić Rajković i sur., 2011.). Budući da je dobro poznata uloga PON1 u sprečavanju oksidacije HDL-a i LDL-a, razumno je i ovaj enzim svrstati u skupinu enzima koji svojim antioksidacijskim djelovanjem mogu utjecati na karcinogenezu.

5.1. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 u ispitanica s redovitim menstrualnim ciklusom i u ispitanica u postmenopauzi

Kao što je detaljno objašnjeno, u istraživanje su uključene ispitanice reproduktivne dobi i ispitanice u postmenopauzi. S obzirom na žene reproduktivne dobi, žene u postmenopauzi imaju promijenjeni hormonski i lipidni status, što se može odraziti na aktivnost PON1. Stoga smo odredili parametre lipidnog statusa te paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 u skupini žena reproduktivne dobi koju smo podijelili na dvije podskupine (folikularna i lutealna faza ciklusa) te u skupini žena u postmenopauzi. Rezultati prikazani u tablici 4. pokazuju proaterogeni lipidni profil žena u postmenopauzi, što je u skladu s do sada objavljenim radovima (Topcuoglu i sur., 2005.; Zago i sur., 2004.). Koncentracije ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i apoB mnogo su veće u skupini ispitanica u postmenopauzi negoli u ispitanica u lutealnoj i folikularnoj fazi ciklusa. Nadalje, koncentracija triglicerida također je mnogo viša u postmenopauzi, što je u skladu s objavljenim rezultatima (Topcuoglu i sur., 2005.; Zago i sur., 2004.), a zanimljivo je da se koncentracija triglicerida razlikovala samo između skupine žena u lutealnoj fazi ciklusa i žena u postmenopauzi. Mogući razlog je promjena hormonskoga statusa u folikularnoj i lutealnoj fazi ciklusa, no ova pretpostavka zahtijeva daljnje istraživanje. Dobro je poznato da je vezanje PON1 s HDL-om nuždan preduvjet za održavanje normalne serumske aktivnosti PON1.

Vezanje PON1 za HDL nije ovisno o apoAI, ali je njegova prisutnost bitna za postizanje optimalne aktivnosti i stabilnosti enzima (James i sur., 2004.; Sorenson i sur., 1999.). Promjene koncentracije HDL-a, kao i sastava i razdiobe podfrakcija HDL-a, mogu rezultirati promjenama u PON1 aktivnosti. Zago i koautori pokazali su da je sastav HDL-a u žena u postmenopauzi promijenjen. HDL ima veću količinu triglicerida i nižu količinu kolesterola (Zago i sur., 2004.). Uspoređujući koncentraciju HDL-a i apoAI između žena u postmenopauzi i žena u reproduktivnoj dobi, nismo utvrdili značajnu razliku. U tablici 5. prikazane su paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 koje se nisu značajno razlikovale između triju ispitivanih skupina. Također su paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 standardizirane na koncentraciju HDL-a i apoAI bile slične u trima ispitivanim skupinama. Na temelju prikazanih rezultata moguće je zaključiti da uočene promjene lipidnoga statusa u žena u postmenopauzi u usporedbi sa ženama reproduktivne dobi ne utječu na paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1. Stoga su u istraživanje i u kontrolnu skupinu ispitanica i u skupinu ispitanica s CIN-om uzete i žene reproduktivne dobi i žene u postmenopauzi.

5.2. Paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice

U različitim patološkim stanjima koja su povezana s oksidacijskim stresom, primjerice kod kardiovaskularnih bolesti, kod šećerne bolesti i u bolesnika na hemodijalizi, utvrđeno je sniženje PON1 aktivnosti (Grdić Rajković i sur., 2011.; Marchegiani i sur., 2008.). Do sada objavljeni literaturni podatci također pokazuju smanjenu PON1 aktivnosti u različitim vrstama raka (Arioz i sur., 2009.; Balci i sur., 2012.; Camuzcuoglu i sur., 2009.; Elkiran i sur., 2007.; Samra i sur., 2011.). Primjerice, paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 snižena je u bolesnica s rakom jajnika, a sniženje aktivnosti je povezano i sa stadijem raka, histološkim stupnjem i koncentracijom tumorskih markera CA-125 (Camuzcuoglu i sur., 2009.). Nadalje, snižena paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 utvrđena je i u bolesnica s rakom dojke i endometrija (Arioz i sur., 2009.; Balci i sur., 2012.). U svojem radu Samra i suradnici odredili su paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1, kao i koncentraciju PON1 u serumu bolesnika s različitim vrstama raka. Sva tri ispitivana parametra bila su mnogo niža u bolesnika s rakom dojke, prostate, pluća te u non-Hodgkinovu limfomu. Ovo je jedino istraživanje u kojemu je ispitivana aktivnost i koncentracija PON1 u bolesnica s rakom vrata maternice, te je utvrđena snižena paraoksonazna i arilesterazna

aktivnost PON1, kao i koncentracija PON1 (Samara i sur., 2011.). Pretraživanjem literature nismo uspjeli pronaći nijedan rad u kojem je određivana paraoksonazna ili arilesterazna aktivnost PON1 u ispitanica s CIN-om. Bazalna i NaCl-stimulirana aktivnost PON1, kao i ove aktivnosti standardizirane na koncentraciju HDL-a i apoAI ne razlikuju se znatno između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om (tablica 9.). Spomenute aktivnosti ne razlikuju se znatno ni između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica podijeljenih na LG i HG promjene (tablica 20.). S druge strane, arilesterazna aktivnost PON1, kao i standardizirane aktivnosti na koncentraciju HDL-a i apoAI značajno su niže u skupini ispitanica s CIN-om (tablica 9.). U skupini ispitanica s CIN-om ARE je niža za 31 %, ARE/HDL za 14 %, a ARE/apoAI za 34 %. Ispitana je dijagnostička vrijednost određivanja ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s CIN-om (tablica 10.). ARE/HDL pokazao je najlošiju dijagnostičku točnost te osjetljivost od 57 % i specifičnost od 72 %. ARE je pokazala vrlo dobru dijagnostičku točnost te za optimalnu graničnu vrijednost od ≤ 56 kU/L osjetljivost od 65 % i specifičnost od 90 %. Vrlo visoka dijagnostička specifičnost pokazuje nam da s vrlo velikom sigurnošću možemo reći da osobe s ARE-om ≤56 kU/L nemaju CIN. ARE/apoAI ima relativno dobru dijagnostičku vrijednost za razlikovanje zdravih ispitanica od onih s CIN-om, dijagnostička je točnost vrlo dobra, a osjetljivost i specifičnost su 78 % i 77 % za optimalnu graničnu vrijednost od ≤36 kU/g. Na temelju dobivenih rezultata ARE/apoAI pokazao se kao potencijalni biomarker CIN-a. Međutim, potrebno je imati na umu da je rezultat dobiven na relativno malom broju ispitanika i da za potvrdu ARE/apoAI kao biomarkera CIN-a treba provesti istraživanje na mnogo većem broju ispitanica. ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI također se razlikuju između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s LG i HG promjenama (tablica 20). Posthoc testiranjem je utvrđeno da se statistički značajno razlikuju kontrolna skupina ispitanica i skupina ispitanica s LG promjenama te kontrolna skupina ispitanica i skupina ispitanica s HG promjenama. Između skupine ispitanica s LG i HG promjenama nije utvrđena razlika između ARE, ARE/HDL i ARE/apoAI. ARE i ARE/apoAI potencijalni su biomarkeri za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s LG promjenama (tablica 21.) Oba parametra imaju vrlo dobru dijagnostičku točnost te osjetljivost od 72 %, odnosno 78 % i specifičnost od 92 %, odnosno 90 %. Dijagnostička je točnost ARE/HDL-a dobra, a osjetljivost i specifičnost su 78 %, odnosno 72 %. Od ovih triju parametara samo se ARE izdvaja kao mogući biomarker za razlikovanje kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s HG promjenama s vrlo dobrom dijagnostičkom točnošću te osjetljivošću od 81 % i specifičnošću od 72 % (tablica

23.). Unatoč vrlo dobroj dijagnostičkoj točnosti ARE/apoAI ima nisku specifičnost (63 %), a ARE/HDL uz dobru dijagnostičku točnost ima premalu osjetljivost (45 %). Svakako treba potvrditi dobivene rezultate na većemu broju ispitanica.

5.3. Parametri lipidnog statusa u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice

Kao što je već spomenuto, HDL i apoAI važni su za održavanje normalne serumske aktivnosti PON1 (James i sur., 2004.; Sorenson i sur., 1999.). Između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om nije uočena razlika u koncentracijama triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i apoB (tablica 7). Ovi lipidni parametri nisu se razlikovali ni između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s LG i HG promjenama (tablica 18.). Koncentracija HDL-a mnogo je niža, a koncentracija apoAI mnogo viša u skupini ispitanica s CIN-om u usporedbi s kontrolnom skupinom. Koncentracija HDL-a također je mnogo veća u kontrolnoj skupini ispitanica negoli u skupini s LG promjenama i u skupini s HG promjenama. Između skupine ispitanica s LG i HG promjenama nije uočena razlika. Snižena ARE u skupini ispitanica s CIN-om i u podskupinama ispitanica s LG i HG promjenama nije rezultat uočenih promjena koncentracija HDL-a i apoAI. Da bismo isključili utjecaj promijenjenih koncentracija ovih dvaju parametara na arilesteraznu aktivnost PON1, aktivnost je standardizirana na koncentracije HDL-a i apoAI. Budući da su i ARE/HDL i ARE/apoAI mnogo niže u skupini ispitanica s CIN-om te u skupinama ispitanica s LG i HG promjenama u odnosu prema kontrolnoj skupini ispitanica, možemo zaključiti da uočeno sniženje arilesterazne aktivnosti PON1 nije rezultat promijenjenih koncentracija HDL-a i apoAI. U prilog ovakvom zaključku ide i nepostojanje korelacije između koncentracije HDL-a, apoAI i ARE-a u kontrolnoj skupini ispitanica, u skupini ispitanica s CIN-om, u skupini ispitanica s LG promjenama i u skupini ispitanica s HG promjenama. Promjene parametara lipidnoga statusa utvrđene su kod različitih vrsta raka (Camuzcuoglu i sur., 2009.; Delimaris i sur., 2007.; Samra i sur., 2011.). Rezultati objavljenih radova nisu dosljedni, što može biti rezultat različite patologije bolesti, različitih prehrambenih navika ili utjecaja čimbenika okoliša. O razlozima promjena lipidnoga statusa u bolesnica s različitim vrstama raka raspravlja se, a uočena promjena koncentracije HDL-a i apoAI u bolesnica s CIN-om zahtijeva daljnja istraživanja. Ispitana je dijagnostička vrijednost određivanja koncentracije HDL-a i apoAI za dijagnostiku CIN-a, no nijedan se od ovih dvaju parametara nije pokazao

kao potencijalni biomarker (tablice 10., 21.. i 23.). Arilesterazna aktivnost PON1, za razliku od paraoksonazne aktivnosti, nema polimorfnu razdiobu te služi za procjenu koncentracije PON1 (Nevin i sur., 1996.). Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost sniženja koncentracije PON1 u serumu žena s CIN-om.

5.4. Polimorfizmi Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice

Jedan od mogućih razloga sniženja aktivnosti PON1 jest i različita razdioba genotipova polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1*. Ta tri polimorfizma gena *pon1* najčešće su određivana i dobro je poznat njihov učinak na PON1 aktivnost. Polimorfizam Q192R utječe na brzinu hidrolize različitih supstrata. *In vitro* R192 aloenizm hidrolizira supstrat paraokson većom brzinom nego aloenzim Q192. *In vitro* supstrate sarin, soman i diazokson većom brzinom hidrolizira aloenzim Q192. Oba aloenzima hidroliziraju supstrat fenilacetat podjednakom brzinom (Davies i sur., 1996.; Deakin i sur., 2004.). Polimorfizam L55M utječe na razinu PON1 mRNA, na koncentraciju i na enzimsku aktivnost PON1. Aloenzim M55 povezan je s nižom razinom mRNA te nižom koncentracijom i aktivnošću PON1 u odnosu prema aloenzimu L55 (Blatter Garin i sur., 1997.; Deakin i sur., 2004.; Leviev i sur., 2000.; Leviev i sur., 1997.). Od polimorfizama u promotorskoj regiji gena *pon1* najviše je istraživan polimorfizam -108C>T te se smatra da taj polimorfizam najviše pridonosi varijaciji PON1 u serumu. Ovaj polimorfizam utječe na ekspresiju gena *pon1*. C na poziciji –108 povezan je s većom ekspresijom gena *pon1* te, posljedično, s većom koncentracijom i aktivnošću PON1 nego kada je na toj poziciji prisutan T (Brophy i sur., 2001a.; Deakin i sur., 2004; Leviev i sur., 2000.; Suehiro i sur., 2000.). Istraživanje je pokazalo da POX i POX1 znatno ovise o genotipovima Q192R, L55M i –108C>T polimorfizama gena *pon1* i u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om (tablice 15. i 16.). Genotipovi RR, LL i CC imaju najvišu, genotipovi QR, LM i CT srednju, a genotipovi QQ, MM i TT najnižu POX i POX1 i u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om. Iznimka je POX za polimorfizam –108C>T gena *pon1* u skupini ispitanica s CIN-om, gdje genotip CT ima najveću, a genotip CC srednju aktivnost. Jednaki utjecaj spomenutih polimorfizama na paraoksonaznu aktivnost PON1 pronađen je i u drugim istraživanjima (Brophy i sur., 2000.; Letellier i sur., 2002.; Parra i sur., 2007.; Roest i sur.,

2007.). U objema ispitivanim skupinama ARE nije ovisila o genotipovima polimorfizma Q192R gena *pon1* (tablice 15 i 16.). Leviev i suradnici također nisu uočili znatan utjecaj polimorfizma Q192R na ARE, dok se u drugim radovima ARE razlikovala između triju genotipova ovog polimorfizma, ali su razlike u aktivnosti bile mnogo manje nego u slučaju polimorfizama L55M i –108C>T (Brophy i sur., 2001a.; Leviev i sur., 2000.; Roest i sur., 2007.). Genotipovi polimorfizma L55M gena *pon1* znatno utječu na ARE. Genotip LL ima najveću, LM srednju, a MM najmanju aktivnost i u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om (tablice 15 i 16.). Genotipovi polimorfizma –108C>T gena *pon1* također znatno utječu na ARE u objema ispitivanim skupinama. Genotipp CC ima najveću, genotip CT srednju, a genotip TT najmanju aktivnost (tablice 15 i 16.). Jednaki utjecaj polimorfizma L55M i –108C>T opisan je i u drugim radovima (Brophy i sur., 2001a.; Leviev i sur., 2000.; Roest i sur., 2007.). U skupinini ispitanica s CIN-om ARE je značajno niža za svaki pojedini genotip polimorfizam L55M i -108C>T gena *pon1* (tablici 17.) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica.

S obzirom na to da polimorfizmi Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* utječu na aktivnost i koncentraciju PON1, ispitivana je veza između tih polimorfizama i različitih vrsta raka. Prisutnost QQ genotipa za polimorfizam Q192R gena *pon1* povezana je s 2,8 puta većim rizikom od raka jajnika u turskoj populaciji. Dob pojave raka jajnika u ispitivanoj populaciji ovisila je o genotipovima polimorfizama L55M i Q192R gena *pon1* (Arpaci i sur., 2009.). U drugom su istraživanju aleli L55 i Q192 povezani sa smanjenim rizikom od raka jajnika u odnosu prema nositeljima genotipa RR i MM (Lurie i sur., 2008.). U talijanskoj populaciji nositelji genotipa QR i RR imaju manji rizik od raka dojke u usporedbi s nositeljima genotipa QQ. Također je polimorfizam L55M povezan s većim rizikom za rak dojke u spomenutoj populaciji (Antnogneli i sur., 2009.). Stevens i suradnici pokazali su da žene s genotipom MM za polimorfizam L55M imaju 57 % veći rizik od raka dojke i 85 % veći rizik od invazivnog raka dojke, dok polimorfizam Q192R nisu povezali s rizikom za razvoj tog raka (Stevens i sur., 2006.). Saadat je u svojoj meta analizi utvrdio da su aleli M55 i Q192 povezani s većim rizikom od raka dojke (Saadat, 2011.). Pregledom literature nismo pronašli nijedan rad u kojemu su određivani genotipovi polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u bolesnica s rakom vrata maternice ni u ispitanica s CIN-om, pa smo stoga željeli ispitati i to jesu li spomenuta tri polimorfizma rizični čimbenici za razvoj i napredovanje CIN-a.

Poznato je da se razdioba alela polimorfizma Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* razlikuje između populacija. Učestalosti alela ispitivanih polimorfizama gena *pon1* u

kontrolnoj skupini ispitanica usporedili smo s učestalosti alela drugih populacija (tablica 28.). Dobivene učestalosti alela triju ispitivanih polimorfizama u kontrolnoj skupini ispitanica gotovo su identične s već objavljenim podatcima za Hrvatsku populaciju (Grdić i sur., 2008.). U hrvatskoj populaciji, kao i u ostalim europskim populacija aleli Q192 i L55 učestaliji su od alela R192 i M55. Azijska populacija ima veću učestalost alela R192 i vrlo nisku učestalost alela M55. Aleli –108C i –108T podjednako su zastupljeni i njihova se razdioba ne razlikuje između europskih i azijskih populacija.

Tablica 28. Razdioba alela polimorfizma Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* u raznim svjetskim populacijama.

POPULACIJE	**Q192R**		**L55M**		**–108C>T**		
	Q	**R**	**L**	**M**	**C**	**T**	**Literatura**
europske populacije							
Hrvati	0,75	0,25	0,61	0,394	0,53	0,47	ovo istraživanje
Hrvati	0,77	0,23	0,66	0,34	0,54	0,46	Grdić i sur., 2008.
Turci	0,69	0,31	0,72	0,28	–	–	Aynacioglu i sur., 1999.
Britanci	0,78	0,22	0,70	0,30	0,52	0,48	O`Leary i sur, 2005.
Talijani	0,65	0,35	0,66	0,34	0,57	0,43	Sardo i sur., 2005.
Španjolci	0,70	0,30	0,63	0,37	0,46	0,54	Parra i sur., 2007.
Nizozemci	0,68	0,32	0,63	0,37	–	–	Leus i sur., 2001.
Finci	0,69	0,31	0,67	0,33	–	–	Clarimon i sur., 2004
Francuzi	0,63	0,37	0,63	0,37	–	–	Letellier i sur., 2002.
azijske populacije							
Japanci	0,40	0,60	0,94	0,06	0,48	0,52	Suehiro i sur., 2000.
Japanci	0,35	0,65	0,92	0,08	–	–	Imai i sur., 2000.
Kinezi	0,35	0,65	1,00	0,00	0,56	0,44	Wang i sur., 2003.

Usporedbom kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om (tablica 13.) utvrđeno je da su u objema ispitivanim skupinama najučestaliji genotipovi QQ (59 % i 51 %) za Q192R i CT (45 % i 42 %) za –108C>T polimorfizme gena *pon1*. U objema je skupinama najmanje učestali genotip RR (8 % i 5 %) za Q192R i TT (25 % i 23 %) za –108C>T polimorfizme gena *pon1*. Za polimorfizam L55M gena *pon1* najučestaliji je genotip LM (42 %), a najmanje je učestali genotip MM (18 %) u kontrolnoj skupini ispitanica, dok su u skupini CIN-a genotipovi LL i LM prisutni s istom učestalosti (43 %), a genotip MM ima

najmanju učestalost (14 %). U objema ispitivanim skupinama najučestaliji su alel Q (75 % i 73 %) za Q192R, alel L (61 % i 65 %) za L55M te alel C (53 % i 56%) za –108 C>T polimorfizam gena *pon1* (tablica 14.). Za polimorfizam Q192R u skupini ispitanica s LG promjenama najučestaliji je genotip QR (55 %), a u skupini s HG promjenama genotip QQ (55 %) (tablica 26.). Za polimorfizam L55M u skupini ispitanica s LG promjenama najučestaliji je genotip LL (55 %), a u skupini s HG promjenama genotip LM (45 %) (tablica 26.). Za polimorfizam –108C>T u skupini ispitanica s LG promjenama najučestaliji je genotip CC (55 %), a u skupini s HG promjenama genotip CT (47 %) (tablica 26.). Najučestaliji alel polimorfizma Q192R je alel Q u skupinu ispitanica s LG promjenama (67 %) i u skupini ispitanica s HG promjenama (76 %) (tablica 27.). Najučestaliji alel polimorfizma L55M jest alel L u skupinu ispitanica s LG promjenama (75 %) i u skupini ispitanica s HG promjenama (61 %) (tablica 27.). Najučestaliji alel polimorfizma –108C>T je alel C u skupinu ispitanica s LG promjenama (69 %) i u skupini ispitanica s HG promjenama (51 %) (tablica 27.). Učestalost genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1* ne razlikuju se značajno između kontrolne skupine ispitanica i ispitanica s CIN-om (tablica 13. i 14.) niti između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s LG i HG promjenama (tablica 26. i 27.). Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da snižena ARE nije rezultat različite distribucije genotipova triju ispitivanih polimorfizama gena *pon1*. Nadalje rezultati upućuju na to da nijedan od spomenutih polimorfizama nije rizični čimbenik za razvoj CIN-a kao ni za napredovanje ovih promjena iz niskorizičnih u visokorizične. Budući da na aktivnost PON1 utječu različiti negenski čimbenici te da postoji niz polimorfizama u promotorskoj i kodirajućim regijama gena *pon1* koji nisu istraženi u ovom radu ne možemo isključiti njihov utjecaj na ARE i razvoj CIN-a. Također treba imati na umu da su polimorfizmi Q192R, L55M i –108C>T određeni na relativno malome broju uzoraka te se dobiveni rezultati trebaju potvrditi na mnogo većoj skupini ispitanica.

5.5. Fenotip paraoksonaze 1 u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice

Fenotip PON1 rezultat je utjecaja genskih čimbenika, tj. polimorfizama u promotorskoj i kodirajućim regijama gena *pon1*, kao i niza negenskih čimbenika (Roest i sur., 2007.). Snižena ARE u bolesnica s CIN-om moguće je posljedica različite razdiobe fenotipova PON1 između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om. Fenotip PON1 određen je metodom s dvama supstratima, paraoksonom i fenilacetatom (Eckerson i sur., 1983.). Kao što je očekivano, razdioba paraoksonazne aktivnosti PON1 (bazalne i NaCl-stimulirane) je bimodalna (slike 22., 23., 24., 25.), razdioba arilesterazne aktivnosti jest unimodalna (slike 26., 27.), a razdioba omjera POX1/ARE je trimodalna (slike 28., 29.) i u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om. Omjer POX1/ARE omogućio je razdvajanje ispitanica s fenotipom AA (homozigoti niska aktivnost), AB (heterozigoti) i BB (homozigoti visoka aktivnost). Polimorfizam Q192R gena *pon1* molekularna je podloga polimorfne razdiobe praoksonazne aktivnosti PON1. U ispitanika s aloenzimom B na poziciji 192 nalazi se arginin (R), dok se u ispitanika s aloenzimom A nalazi glutamin (Q). Fenotip AA odgovara genotipu QQ, fenotip AB genotipu QR, a fenotip BB genotipu RR (Eckerson i sur., 1983.; Humbert i sur., 1993.). U kontrolnoj skupini ispitanica i u skupini ispitanica s CIN-om najučestaliji je fenotip AA (57 % i 52 %), dok je najmanje učestao fenotip BB (11 % i 12 %) (tablica 12.). Učestalosti su fenotipova u dvjema ispitivanim skupinama podjednake i ne razlikuju se značajno. U skupini ispitanica s HG promjenama, kao i u kontrolnoj skupini ispitanica, najučestaliji je fenotip AA (62 %), a najmanje je učestao fenotip BB (13 %). U skupini ispitanica s LG promjenama najveća je učestalost fenotipa AB (61 %), a najmanja fenotipa BB (11 %). Iako se fenotipovi razlikuju po učestalosti između triju ispitivanih skupina, ova razlika nije statistički značajna (tablica 25.). Pregledom literaturnih podataka nismo uspjeli naći nijedan rad u kojemu je određivan fenotip PON1 u bolesnica s CIN-om. Uspoređeno je podudaranje fenotipova PON1 i genotipova polimorfizma Q192R gena *pon1* u ispitivanim skupinama. U kontrolnoj je skupini ispitanika podudarnost genotipa i fenotipa PON1 jako dobra. U samo 6,4 % ispitanica nije utvrđeno podudaranje, tri su ispitanice imale fenotip AB, a genotip QQ, dok su četiri ispitanice imale fenotip BB, a genotip QR. U skupini ispitanica s CIN-om nepodudaranje fenotipa i genotipa nađeno je u čak 21 % ispitanika. Kod 4 ispitanice određen je fenotip AA i genotip QR, u 3 ispitanice fenotip AB i fenotip QQ te kod 1 ispitanice fenotip AB i genotip RR, a kod 6 ispitanica fenotip BB i genotip QR. Nepodudaranje genotipa i fenotipa moguća je posljedica prisutnosti, primjerice, mutacija

krivog smisla i besmislenih mutacija u genu *pon1*. Jarvik i suradnici utvrdili su mutaciju Trp194Stop u alelu R u jednog ispitanika kojemu su određeni fenotip AA i genotip QR (Jarvik i sur., 2003.). U daljnjim istraživanja svakako treba ispitivati razloge nepodudaranja fenotipa i genotipa u ispitanica s CIN-om jer možda prisutnost takvih mutacija može objasniti i uočenu smanjenu aktivnost ARE-a u ispitanica s CIN-om.

5.6. Biljezi oksidacijskog stresa u ispitanica s premalignim promjenama vrata maternice

Istraživanja koja su obuhvatila određivanje parametara oksidacijskoga stresa u serumu bolesnica s rakom vrata maternice pokazale su povećanu lipidnu peroksidaciju i promjene u enzimskim i neenzimskim antioksidacijskim mehanizmima. Primjerice, Ahmed i suradnici utvrdili su smanjenu koncentraciju glutationa, vitamina E i C, smanjenu aktivnost GPx-a i SOD-a te povećanu koncentraciju lipidnih peroksida u ispitanica s rakom vrata maternice (Ahmed i sur., 1999.). Manju i suradnici u dvama su svojim radovima utvrdili sniženu aktivnost SOD-a, GPx-a, glutation-S-transferaze (GST) i CAT-a, smanjenu koncentraciju glutationa (GSH), vitamina C i E te povećanu koncentraciju lipidnih peroksida i konjugiranih diena u ispitanica s rakom vrata maternice (Manju i sur., 2002a.; Manju i sur., 2002b.). Beevi i suradnici također su potvrdili prisutnost oksidacijskoga stresa (porast MDA, smanjenje SOD-a, CAT-a i GPx-a) u tih ispitanica (Beevi i sur., 2007.). U dvama istraživanjima određeni su parametri oksidacijskoga stresa u bolesnica s CIN-om i rakom vrata maternice. Kim i suradnici pokazali su da je koncentracija MDA-a najveća u ispitanica s CIN-om, srednja u bolesnica s rakom, a najniža u kontrolnoj skupini. Nadalje aktivnost GPx-a najveća je u kontrolnoj skupini ispitanica, srednja u skupini s CIN-om, a najniža u skupini s rakom. Također je uočen pad ukupnoga antioksidacijskoga statusa, od kontrole, CIN-a do raka (Kim i sur., 2003.). Looi i suradnici pokazali su porast koncentracije MDA-a u skupini s CIN-om i u skupini s rakom u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanica. Aktivnost GPx-a bila je veća, a SOD-a i CAT-a niža u ispitanica s CIN-om i rakom u usporedbi s kontrolnim ispitanicama (Looi i sur., 2008.). Prisutnost povećane lipidne peroksidacije te promjene u antioksidacijskom sustavu u bolesnica s CIN-om upućuju na važnost oksidacijskoga stresa već u ranoj fazi karcinogeneze, tj. u fazi CIN-a. U ovom su radu određene koncentracije parametara oksidacijskoga stresa slobodnih tiolnih skupina, MDA i GSH (tablice 8. i 19.). Većina je slobodnih tiolnih skupina u serumu prisutna na albuminima koji su važni

izvanstranični antioksidansi. Albumin reagira sa slobodnim radikalima, pri čemu dolazi do oksidacije tiolnih skupina (Mallikarjunappa i sur., 2007.). U uzorcima tkiva raka vrata maternice u usporedbi s normalnim tkivom vrata maternice utvrđena je povećana razina oksidiranih tiolnih skupina proteina, čime se sugerira da jaki oksidacijski uvjeti djeluju na stanice raka (De Marco, 2013.). U ovom istraživanju, koncentracija slobodnih tiolnih skupina u serumu ne razlikuje se značajno između kontrolne skupine ispitanika i skupine ispitanica s CIN-om niti između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica podijeljenih na LG i HG promjene (tablice 8. i 19.). Na temelju ovih rezultata vidljivo je da ispitanice s CIN-om nemaju povećanu oksidaciju slobodnih tiolnih skupina u odnosu prema zdravim ispitanicama. Jedan od aldehida koji je produkt lipidne peroksidacije jest i MDA (Černe i sur., 2006.; Griffiths i sur., 2002.; Jialal i sur., 1996.). Koncentracija MDA-a mnogo je niža u skupini ispitanica s CIN-om u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanica (tablica 8.). Koncentracija MDA-a značajno se razlikuje i između kontrolnih ispitanica i ispitanica s LG i HG promjenama (tablica 19.). Posthoc testiranjem utvrđeno je da je koncentracija MDA-a mnogo manja u skupini ispitanica s HG promjenama negoli u kontrolnoj skupini ispitanica te da skupina ispitanica s HG promjenama ima mnogo nižu koncentraciju MDA-a u odnosu prema skupinu s LG promjenama. Dobiveni rezultati upućuju na vjerojatno aktiviranje i djelovanje antioksidacijskih sustava koji sprečavaju razvoj lipidne peroksidacije u žena s CIN-om.

Glutation je tripeptid (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicin) koji ima različite funkcije u organizmu. Svoje antioksidacijsko djelovanje ostvaruje izravno reakcijom slobode tiolne skupine cisteinskog ostatka s ROS-om i elektrofilima ili neizravno djelujući kao kofaktor raznih enzima (Lushchak i sur., 2011.). Koncentracija reduciranog GSH-a mnogo je veća u skupini ispitanica s CIN-om negoli u kontrolnoj skupini ispitanica (tablica 8.). kao i u skupini ispitanica s LG i HG promjenama u odnosu prema kontrolnoj skupini ispitanica (tablica (tablica 19.). Koncentracija reduciranog GSH-a ne razlikuje se značajno između skupine ispitanica s LG i HG promjenama. Ovaj podatak podupire gore navedene pretpostavke da se u bolesnica s CIN-om aktiviraju i djeluju antioksidacijski sustavi organizma. U radu smo odredili dijagnostičku vrijednost određivanja koncentracije GSH-a i MDA-a za dijagnostiku CIN-a. GSH se nije pokazao kao dobar dijagnostički biomarker (tablice 10., 21., i 23.). Dijagnostička je točnost MDA-a za razlikovanje zdravih ispitanica od ispitanica s CIN-om dobra, a dijagnostička osjetljivost i specifičnost su 77 i 76 %. Dobra dijagnostička točnost za MDA uz osjetljivost od 85 % i nisku specifičnost od 67 % dobivena je za razlikovanje ispitanica s LG i HG promjenama. MDA se pokazao kao dobar biomarker s vrlo dobrom

točnošću, osjetljivošću i specifičnošću od 83 % za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s HG promjenama. Dobiveni rezultati koncentracija parametara oksidacijskoga stresa nisu u skladu s objavljenim literaturnim podatcima (Kim i sur., 2003.; Looi i sur., 2008.). Međutim, Kim i suradnici određivali su parametre oksidacijskoga stresa na populaciji žena iz Koreje, a Looi i suradnici na populaciji žena iz Malezije (Kim i sur., 2003.; Looi i sur., 2008.). Različite prehrambene i životne navike te utjecaj okolišnih čimbenika u različitim dijelovima svijeta mogu biti jedan od razloga nepodudaranja rezultata. Naše istraživanje, kao i ova navedena istraživanja rađeno je na relativno malom broju ispitanica s CIN-om te dobivene rezultate treba potvrditi na većoj ispitivanoj skupini. U većine žena uočava se spontana eliminacija HPV-a tijekom dvije godine zbog adekvatnoga djelovanja imunosnog sustava. Jedan od mogućih čimbenika koji dovodi do eliminacije virusa i izlječenja CIN-a jest i dobar antioksidacijski odgovor organizma. S obzirom na to da žene nismo pratili longitudinalno, ne možemo znati u kojih će ispitanica doći do progresije bolesti, a u kojih do izlječenja nakon dvije ili više godina. Da bismo utvrdili ulogu dobroga antioksidacijskog odgovora u sprječavanju progresije i/ili izlječenju CIN-a, potrebno je provesti longitudinalno istraživanje.

5.7. Mogući prediktori premalignih promjena vrata maternice

Univarijantnom i multivarijantnom regresijskom analizom ispitali smo arilesteraznu aktivnost PON1, koncentraciju HDL, apoAI, MDA i GSH kao moguće prediktore CIN-a (tablica 11.). Univarijantnom regresijskom analizom svi ispitivani parametri su se pokazali kao potencijalni prediktori CIN-a. U multivarijantni logistički regresijski model uključeni su ARE/HDL, ARE/apoAI, MDA i GSH te je ovim modelom ispravno klasificirano 89,08 % ispitanica s CIN-om. HDL, ARE, ARE/HDL, ARE/apoAI i GSH su se pokazali kao potencijalni prediktori LG promjena, a multivarijantni logistički regresijski model uključio je ARE/HDL i ARE/apoAI te je korektno klasificirao 93,70% ispitanica s LG promjenama (tablica 22.). HDL, ARE, ARE/HDL, ARE/apoAI, MDA i GSH također su potencijalni prediktori HG promjena, a multipli logistički regresijski model uključio je ARE/HDL, ARE/apoAI, MDA i GSH te je korektno klasificirano u skupinu s HG promjenama 88,46 % ispitanica (tablica 24.). MDA je jedini parametar čija se koncentracija razlikovala između skupine ispitanica s LG i HG promjenama no, međutim, logističkom regresijskom analizom nismo potvrdili MDA kao prediktora za razlikovanje ovih promjena.

Ovo je istraživanje prvo istraživanje kojim je obuhvaćeno određivanje paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1, fenotip PON1 te polimorfizmi Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* u ispitanica s CIN-om. Dobiveni rezultati pokazuju da je u žena s CIN-om prisutna oksidacijsko-antioksidacijska neravnoteža. Snižena arilesterazna aktivnost PON1 ukazuje na vjerojatno sniženu koncentraciju PON1 u serumu ovih ispitanica, što je moguće posljedica smanjene ekspresije gena *pon1* uslijed poremećaja redoks homeostaze. Uočene promjene koncentracija HDL-a i apoAI nisu čimbenici koji objašnjavaju sniženu ARE. Nadalje, ovim je istraživanjem pokazano da polimorfizmi Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* nisu rizični čimbenici za CIN i da ne objašnjavaju uočeno sniženje ARE u tih ispitanica.

6. ZAKLJUČCI

Paraoksonazna aktivnost PON1, kao i standardizirane aktivnosti na koncentracije HDL-a i apoAI, ne razlikuju se značajno između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om niti kontrolne skupine ispitanica i podskupina ispitanica s LG i HG promjenama.

Arilesterazna aktivnost PON1, kao i standardizirane aktivnosti na koncentraciju HDL-a i apoAI, mnogo su niže u skupini ispitanica s CIN-om te u skupini ispitanica s LG i HG promjenama u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica. Između skupina ispitanica s LG i HG promjenama nije uočena razlika u ovim aktivnostima.

Fenotipovi PON1 ne razlikuju se značajno između ispitivanih skupina.

Razdioba genotipova i alela polimorfizama Q192R, L55M i -108C>T gena *pon1* podjednaka je u kontrolnoj skupini ispitanica, i u skupini ispitanica s CIN-om te u kontrolnoj skupini ispitanica i u skupinama ispitanica s LG i HG tipom promjena.

Potvrđen je u literaturi opisan utjecaj polimorfizama Q192R, L55M i – 108C>T gena *pon1* na paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 u kontrolnoj skupini ispitanica, kao i u skupini ispitanica s CIN-om.

Uočeno sniženje ARE-a nije rezultat promijenjenih koncentracija HDL-a i apoAI, utjecaja fenotipova PON1 ni različite razdiobe genotipova polimorfizama Q192R, L55M i –108C>T gena *pon1*. Mogući razlog snižene ARE jest smanjena ekspresija gena *pon1* uslijed poremećaja redoks homeostaze u žena s CIN-om.

Koncentracija tiolnih skupina ne razlikuje se značajno između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s CIN-om niti između kontrolne skupine ispitanica i skupine ispitanica s LG i HG promjenama. Dobiveni rezultati pokazuju da u ispitanica s CIN-om nije dokazana povećana oksidacija slobodnih tiolnih skupina u serumu.

Koncentracija MDA-a mnogo je niža, dok je koncentracija reduciranog GSH-a mnogo viša u skupini ispitanica s CIN-om. Koncentracija GSH-a viša je u skupini žena s LG ili HG promjenama u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanica dok ova razlika nije uočena između skupina ispitanica s LG i HG promjenama. Koncentracija MDA je niža u skupini žena

s HG promjenama u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanica te je koncentracija MDA također značajno niža u skupini ispitanica s HG promjenama u odnosu na skupinu ispitanica s LG promjenama. Dobiveni rezultati upućuju na oksidacijsko-antioksidacijsku neravnotežu u žena s CIN-om.

MDA se pokazao kao dobar dijagnostički biomarker sa zadovoljavajućom točnošću, specifičnošću i osjetljivošću za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s HG promjenama. ARE/apoAI potencijalni je biomarker za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s CIN-om. Nadalje, ARE i ARE/apoAI potencijalni su biomarkeri za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s LG promjenama, dok je ARE potencijalni biomarker za razlikovanje zdravih ispitanica i ispitanica s HG promjenama.

Multivarijantni logistički regresijski model koji uključuje ARE/HDL, ARE/apoAI, MDA i GSH korektno klasificira u skupinu CIN-a 89,08 % ispitanica. Multivarijantni regresijski model koji uključuje ARE/HDL i ARE/apoAI korektno klasificira u skupinu s LG promjenama 93,70 % ispitanica. Također multivarijantni logistički regresijski model koji uključuje ARE/HDL, ARE/apoAI, GSH i MDA korektno klasificira u skupinu s HG promjenama 88,46 % ispitanica.

7. LITERATURA

1. Adkins S, Gan N, Mody M, La Du BN (1993) Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. Am J Hum Genet. 52: 598 – 608.

2. Ahmed MI, Fayed ST, Hossein H, Tash FM (1999) Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma. Dis Markers 15: 283-91.

3. Antognelli C, Del Buono C, Ludovini V, Gori S, Talesa VN, Crinò L, Barberini F, Rulli A (2009) CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. BMC Cancer. 20:115.

4. Arioz DT, Camuzcuoglu H, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O (2009) Assessment of serum paraoxonase and arylesterase activity in patients with endometrial cancer. Eur J Gynaecol Oncol. 30: 679-82.

5. Arpaci A, Görmüs U, Dalan B, Berkman S, Isbir T (2009) Investigation of PON1 192 and PON1 55 polymorphisms in ovarian cancer patients in Turkish population. In Vivo. 23: 421-4.

6. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du BN (1998) Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18: 1617 – 1624.

7. Aviram M (1999 a) Does paraokonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? Mol Med Today. 5: 381 – 386.

8. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B (1999 b) Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. Free Radic Biol Med. 26: 892-904.

9. Aviram M (2004 a) Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med. 37: 1301 – 1303.

10. Aviram M, Rosenblat M (2004 b) Paraoxonase 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. Free Radic Biol Med. 37: 1304 – 1316.

11. Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit EE, Roots I (1999) Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. Toxicol Appl Pharmacol. 157: 174 - 177.

12. Balci H, Genc H, Papila C, Can G, Papila B, Yanardag H, Uzun HJ (2012) Serum lipid hydroperoxide levels and paraoxonase activity in patients with lung, breast, and colorectal cancer. Clin Lab Anal. 26: 155-60.

13. Basta A. Ed. J. Jordan, A Singer (2006) The Cervix, 2nd edition, Blackwell Publishing Ltd, 122).

14. Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A (2007) Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. Clin Chim Acta.375:119-23.

15. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN (2000) Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metab Dispos. 28 1335 – 1342.

16. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, Ruiz J (1997) Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. J Clin Invest. 99. 62 – 66.

17. Bohmer G, Van Den Brule AJ, Brummer O, Meijer CL, Petry KU (2003) No conformed case of human papilloma virus DNA-negative cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or invasive primary cancer of the uterine cervix among 511 patients. Am J Obstet Gynecol 189: 118-20.

18. Boner, W,Taylor E.R, Tsirimonaki E, Yamane K, Campo M.S, Morgan I.M (2002) A functional interaction between the HPV16 E2 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. J. Biol. Chem. 277: 22297–22303.

19. Bornstein J, Bentley J, Bösze P (2012) 2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. Obstet.Gynecol. 120: 166–72.

20. Bosch FX, de Sanjose S (2007) The epidemiology of human papillomavirusinfection and cervical cancer. Dis Markers. 23: 213–227

21. Bosch FX, de Sanjose S.Chapter 1: (2003) Human papillomavirus andcervical cancer – burden and assessment of causality. J Natl InstMonogr; 31:3–13.

22. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a world wide perspective. J Natl Cancer Inst. 7: 796-802.

23. Broders AC (1932) Carcinoma in situ with penetrating epithelium. JAMA 99: 1670-1674.

24. Brophy VH, Jarvik G P, Richter RJ, Rozek LS, Schellenberg GD, Furlong CE (2000) Analysis of paraoxonase (PON1) L55M status requires both genotype and phenotype. Pharmacogenetics. 10. 453 – 460.

25. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE (2001 a) Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. Am J Hum Genet. 68: 1428 – 1436.

26. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong C.E (2001 b) Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. Pharmacogenetics. 11: 77-84.

27. Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto M, Fontana L, Castaldo M, Bonaiuto A, Saitta C, Bitto A, Manduca B, Riggio S, Saitta A (2004) Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107) C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. Exp. Gerontol. 39: 1089-1094.

28. Camuzcuoglu H, Arioz DT, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O (2009) Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol. 112: 481-5.

29. Castle PE, Giuliano AR (2003) Chapter 4: genital tract infections, cervical inflammation and antioxidant nutrients assessing their roles ashuman papillomavirus cofactors. J Natl Inst Monogr. 31: 29–34.

30. Clarimon J, Eerola J, Hellström O, Tienari PJ, Singleton A (2004) Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. Neurosci Lett. 367 : 168 - 170.

31. Clifford GM, Goncalves MA, Franceschi S (2006) Human papillo-mavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. AIDS. 20: 2337–2344.

32. Cosette M W (2007) Advances in primary and secundary intervention for cervical cancer: human papilloma virus prophylactic vaccines and testing. Nature Clinical Practice Oncology. 224-235.

33. Costa LG, Vitalone A, Cole T B, Furlong CE (2005) Modulation of paraoxonase (PON1) activity. Biochem Pharmacol. 69: 541 – 550.

34. Čepelak I (2009) Medicinska naklada. Slobodni radikali i antioksidansi. u: Medicinska biokemija. ur: Štraus B. 3. izdanje Zagreb: 638-48.

35. Černe D Lukač-Bajalo J (2006) Oxidative stress assays for disease risk stratification. Acta Pharm. 56: 1 – 17.

36. Ćorušić A, Babić D (2005) Ginekološka onkologija, Rak vrata maternice, Medicinska naklada, Zagreb., 149-159.

37. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE (1996) The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. Nat Genet. 14: 334 – 336.

38. De Marco F (2013) Oxidative Stress and HPV Carcinogenesis. Viruses 5: 708–731.

39. Deakin SP, James RW (2004) Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase – 1. Clin Sci. 107: 435 – 447.

40. Delimaris I, Faviou E, Antonakos G, Stathopoulou E, Zachari A, Dionyssiou-Asteriou A (2007) Oxidized LDL, serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer. Clin Biochem. 40: 1129-34.

41. Devilee P (2003) Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs (IARC WHO Classification of Tumours). The International Agency for Research on Cancer .

42. Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M (2012) Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. Biochim Biophys Acta. 1822: 737-47.

43. Division of STD Prevention. (1999) Prevention of genital HPV infection and sequelae: report of an external consultants' meeting. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.

44. Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Zanić-Grubišić T (2014) Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples., Biomed Chromatogr. doi: 10.1002/bmc.3361.

45. Draganov D I, La Du BN (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 369: 78 – 88.

46. Drury JA, Nycyk JA, Cooke RWI (1997) Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants, Clin Chim Acta. 263: 177 – 185.

47. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2002) The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22: 1248 – 1250.

48. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN (1983) The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. Am J Hum Genet. 35: 1126 – 1138.

49. Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca S (2007) Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. BMC Cancer. 7: 48.

50. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M (2005) Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. Atherosclerosis. 180: 55 – 61.

51. Furlong C.E. (2008) Paraoxonase: An historical perspective The paraoxonase: Their role in disease development and xenobiotic metabolism. Dordrecht, Springer, 61-73.

52. Garcia-Closas R, Castellsague X, Bosch X, Gonzalez CA (2005) Therole of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review ofrecent evidence. Int J Cancer. 117: 629–637.

53. Grdić Rajkovic M, Rumora L, Barisic K (2011) The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. Biochem Med. 21: 122-30.

54. Grdić Rajković M, Rumora L, Juretić D, Grubisić TZ, Flegar-Mestrić Z, Vrkić N, Sinjeri Z, Barisić K (2010). Effect of non-genetic factors on paraoxonase 1 activity in patients undergoing hemodialysis. Clin Biochem. 43: 1375-80.

55. Grdić M, Barišić K, Rumora L, Salamunić I, Tadijanović M, Grubišić Žanić T, Pšikalová R, Flegar-Meštrić Z, Juretić D (2008) Genetic Frequencies of Paraoxonase 1 Gene Polymorphisms in Croatian Population. Croatica Chemica Acta. 81: 105-111.

56. Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg A, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parra J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB (2002) Biomarkers. Mol Aspects Med. 23: 101 – 208.

57. Grubišić G (2011) Nova kolposkopska klasifikacija Rio de Janeiro. Gynaecol Perinatol 21: 22–30.

58. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL,. Tawfik DS (2004) . Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 11: 412 -419.

59. Hawthorn RJ, Murdoch JB, McLean AB, McKie RM. (1988) Langerhan's cells and subtypes of human papillomavirus in cervicalintraepithelial neoplasia. BMJ. 297: 643–646.

60. HDGO postupnik: Cervikalne intraepitelne lezije www.hdgo.hr

61. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 12: 338:423-8.

62. Znaor A (2011) Incidencija raka u Hrvatskoj. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb.

63. Hu ML (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. Methods Enzymol. 233: 380 – 385.

64. Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE (1993) The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. Nat Genet. 3: 73 – 76.

65. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Oh-hashi Y, Yazaki Y (2000) Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic disease. Atherosclerosis 149: 435 - 442.

66. Jakubowski H (2000) Calcium–dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. J Biol Chem. 275: 3957 – 3962.

67. James RW, Deakin SP (2004) The importance of high–density lipoproteins for paraoxonase–1 secretion, stability, and activity. Free Radic Biol Med. 37: 1986 – 1994.

68. Jarvik GP, Jampsa R, Richter RJ, Carlson CS, Rieder MJ, Nickerson DA, Furlong CE (2003) Novel paraoxonase (PON1) nonsense and missense mutations predicted by functional genomic assay of PON1 status. Pharmacogenetics 13: 291 – 295.

69. Jialal I, Devaraj S (1996) Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. Clin Chem. 42: 498 – 506.

70. Josse D, Xie W, Renault F, Rochu D, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O (1999) Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. Biochemistry 38: 2816 – 2825.

71. Jukić S (1999) Patologija ženskog spolnog sustava.3 izd., AGM, Zagreb.

72. Juretić D, Motejlkova A, Kunović B, Rekić B, Flegar-Meštrić Z, Vujić L, Mesić R, Lukać-Bajalo J, Simeon-Rudolf V (2006) Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. Acta Pharm. 56: 59 – 68.

73. Kahn JA. (2009) HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). N Engl J Med. 361: 273.

74. Kim SY, Kim JW, Ko YS, Koo JE, Chung HY, Lee-Kim YC (2003) Changes in lipid peroxidation and antioxidant trace elements in serum of women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. Nutr Cancer. 47: 126-30.

75. Kujiraoka T, Oka T, Ishihara M, Egashira T, Fujioka T, Saito E, Saito S, Miller N.E, Hattori H (2000). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human serum paraoxonase concentration. J Lipid Res. 41: 1358 – 1363.

76. Kumar V, Abbas AK, Nelson F, Mitchell R (2007) Robbins Basic Pathology (8th ed.). Elsevier. 718–721.

77. Kuo CL, La Du BN (1998) Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. Drug Metab Dispos. 26: 653 – 660.

78. Kurman RJ, Lora Hedrick EL, Ronnett BM, (Eds.) (2011) Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract: Precancerous Lesions of the Cervix, Sixth Edition.

79. Letellier C, Durou MR, Jouanolle AM, Le Gall JY, Poirier JY, Ruelland A (2002) Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. Diabetes Metab. 28: 297 – 304.

80. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJP, Voorbij HAM (2001) PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients, Atherosclerosis 154 : 641 - 649.

81. Leviev I, Deakin S, James RW (2001) Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. J Lipid Res. 42: 528 – 535.

82. Leviev I, James RW (2000) Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20: 516 - 521.

83. Leviev I, Negro F, James RW (1997) Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17: 2935 – 2939.

84. Li WF, Costa LG, Richter R J,Hagen T, Shih DM, Tward A, Lusis AJ, Furlong CE (2000) Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. Pharmacogenetics 10: 767 – 779.

85. Looi ML, Mohd Dali AZ, Md Ali SA, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA (2008) Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. Eur J Cancer Prev. 17: 555-60.

86. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, Goodman MT. (2008) Genetic polymorphisms in the Paraoxonase 1 gene and risk of ovarian epithelial carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers. 17: 2070-7.

87. Lushchack VI (2001) Glutathion homeostasis and function: potential targets for medical interventions. Journal of aminoa acids 2012: 1-26.

88. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI (1998 a) Human serum paraoxonase. Gen Pharmacol. 31: 329 – 336.

89. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN (1998 b) Effect of the human serum paroxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. FEBS letters. 423: 57-60.

90. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI (1999) Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. Lancet 353: 468 – 469.

91. Mackness M, Durington PN, Mackness MI (2002) The paraoxonase gene family and coronary heart disease. Curr Opin Lipidol. 13: 357-362.

92. Mackness M, Mackness B (2004 a) Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important. *Free Radic Biol Med.* 37: 1317 – 1323.

93. Mackness M, Durrington P, Mackness B (2004 b) Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol. 15: 399 – 404.

94. Mallikarjunappa S, Prakash M (2007) Urine protein thiols in chronic renal failure patients. Indian Journal of Nephrology 17: 7 -9.

95. Manju V, Balasubramanian V, Nalini N (2002 a) Oxidative stress and tumor markers in cervical cancer patients. J Biochem Mol Biol Biophys. 6: 387-90.

96. Manju V, Kalaivani Sailaja J, Nalini N (2002 b) Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. Clin Biochem. 35: 621-5.

97. Marchegiani F, Marra M, Olivieri F, Cardelli M, James RW, Boemi M, Franceschi C (2008) Paraoxonase 1: genetics and activities during aging. *Rejuvenation Res.* 11: 113 – 127.

98. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S (2002) Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study.International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Lancet. 359: 1085-92.

99. Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) Med Epi- demiological classifi cation of human papillomavirus- types associated with cervical cancer. N Engl J. 348: 518-27.

100. Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, Richter RJ, Humbert R, Hokanson JE. Brunzell JD (1996) Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 1243 - 1249.

101. Ng CJ, Shih DM, Hama SY,Villa N, Navab M, Reddy ST (2005) The paraoxonase gene family and atherosclerosis. Free Radic Biol Med. 38: 153 – 163.

102. Nishio E, Watanabe Y. Biochemical and biophysical research communication (1997) cigarette smoke extract inhibites plasma paraoxonase activity by modification oft he enzymes free thiols. 236: 289-293.

103. O´Leary KA, Edwards RJ, Town MM, Boobis AR (2005) Genetic and other sources of variation in the activity of serum paraoxonase/diazoxonase in humans: consequences for risk from exposure to diazinon. Pharmacogenet Genomics. 15: 51 - 60.

104. Ovanin-Rakić A, Pajtler M, Stanković T (2003) Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice “Zagreb 2002”. Modifikacija klasifikacija “Zagreb 1990” i “NCI Bethesda system 2001”. Gynaecol Perinatol 12: 148-53.

105. Parra S, Alonso-Villaverde C, Coll B, Ferré N, Marsillach J, Aragonès G, Mackness M, Mackness B, Masana L, Joven J, Camps J (2007) Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. Atherosclerosis 194 : 175 – 181.

106. Patterson RE, White E, Kristal AR, et al. (1997) Vitamin supplements and cancer risk: the epidemiologic evidence. Cancer Causes and Control. 8: 786-802.

107. Richter RJ Jarvik GP Furlong C (2010) Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. U: Reddy ST (ed.). Paraoxonase in inflammation, infection and toxicology. Humana Press. 29-35.

108. Richart RM, Barron BA. (1969) A follow-up study of patients with cervical dysplasia. Am J Obstet Gynecol; 195: 386-393.

109. Roest M, van Himbergen TM, Barendrecht AB, Peeters PH, van der SchouwYT, Voorbij HA(2007) Genetic and environmental determinants of the PON-1 phenotype. Eur J Clin Invest. 37: 187 – 196.

110. Rumora L, Domjan AM, Žanić Grubišić T, Peraica M (2007) Mycotoxin fumonosin B1 alters cellular redox balance and signaling pathways in rat liver and kidney. Toxicology 242: 31-38.

111. Saadat M (2012) Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. Cancer Epidemiol. 36: 101-3.

112. Samra ZQ, Pervaiz S, Shaheen S, Dar N, Athar MA (2011) Determination of oxygen derived free radicals producer (xanthine oxidase) and scavenger (paraoxonase1) enzymes and lipid parameters in different cancer patients. Clin Lab. 57: 741-7.

113. Sardo MA, Campo S, Bonaiuto M, Bonaiuto A, Saitta C, Trimarchi G, Castaldo M, Bitto A, Cinqueqrani M, Saitta (2005) Antioxidant effect of atorvastatin is independent of PON1 gene T(-107)C, Q192R and L55M polymorphisms in hypercholesterolaemic patients. Curr Med Res Opin. 21: 777 - 784.

114. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J (2007) Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet. 370: 890–907.

115. Schneider A, Holtz M, Gissmann L (1987) Increased prevalence ofhuman papillomavirus in the lower genital tract of pregnant women. Int J Cancer. 40: 198–201.

116. Shacter E (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev. 32: 307 – 326.

117. Sillman F, Stanek A, Sedlis A, Rosenthal J, Lanks KW, Buchhagen D (1984) The relationship between human papillo-mavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosup-pressed women. Am J Obstet Gynecol.150: 300–308.

118. Slattery ML, Robison LM, Schuman KI, French TK, AbbottTM, Overall JC Jr (1989) Cigarette smoking and exposure topassive smoke are risk factors for cervical cancer. JAMA. 261: 1593–1598.

119. Smith JS, Lindsay L, Hoots B (2007) Human papillomavirus typedistribution in invasive cervical cancer and high-grade cervicallesions: a meta-analysis update. Int J Cancer. 121: 621–632.

120. Solomon D, Davey D, Kurman R (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting of cervical cytology. JAMA. 287: 2114-9.

121. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN (1999) Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N–terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A–I stabilizes activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19: 2214 – 2225.

122. Sozmen EY, Sagin FG, Kayikcioglu M, Sozmen B (2008) Oxidative stress and antioxidants and PON1 in health and disease. U: Mackness B (ed.) The paraoxonase. Their role in disease development and xenobiotic metabolism. Dordrecht, Springer, 61-73.

123. Stanley M. (2006) Immune response to human papilomavirus. Vaccine. 24: 16-22.

124. Stevens VL, Rodriguez C, Pavluck AL, Thun MJ, Calle EE (2006) Association of polymorphisms in the paraoxonase 1 gene with breast cancer incidence in the CPS-II Nutrition Cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 15: 1226-8.

125. Su ND, Hung ND, Cheon–Ho P, Ree KM, Dai–Eun S (2009) Oxidative inactivation of lactonase activity of purified human paraoxonase 1 (PON1). Biochim Biophys Acta. 1790: 155 – 160.

126. Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y,Shindo M, Tanaka H,Hashimoto K (2000) A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. Atherosclerosis 150: 295-298.

127. Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Toyoshima H, Kojima M, Tokudome S, Hayakawa N, Watanabe Y, Tamakoshi K, Suzuki S, Ozasa K, Tamakoshi A; Japan Collaborative Cohort Study Group (2004) Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort Study. Cancer Epidemiol Biomarkers. 131781-7.

128. Teiber JF, Draganov DI, La Du BN (2003) Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. Biochem Pharmacol. 66: 887 – 896.

129. Topçuoglu A, Uzun H, Aydin S, Kahraman N, Vehid S, Zeybek G, Topçuoglu D (2005) The effect of hormone replacement therapy on oxidized low density lipoprotein levels and paraoxonase activity in postmenopausal women. Tohoku J Exp Med. 205: 79-86.

130. Viac J, Guerin-Reverchon I, Chardonnet Y, Bremond A (1990) Langerhan's cells and epithelial modifications in cervical intraep-ithelial neoplasia: correlation with human papillomavirus infection. Immunobiology. 180:328–338.

131. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G (2001) High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21: 13 – 27.

132. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1891: 12-9.

133. Wang X, Fan Z, Huang J, Su S, Yu Q, Zhao J, Hui R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Gu D (2003) Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23: 328 – 334.

134. Yeung DT, Josse D, Nicholson JD, Khanal A, McAndrew CW, Bahnson BJ, Lenz DE, Cerasoli DM (2004) Structure/function analyses of human serum paraoxonase (HuPON1) mutants designed from a DFPase–like homology model. Biochim Biophys Acta. 1702: 67 – 77.

135. Zabirnyk O, Liu W, Khalil S, Sharma A, Phang JM (2010) Oxidized low-density lipoproteins upregulate praline oxidase to initiate ROS-dependent autophagy. Carcinogenesis. 31: 446–454.

136. Zago V, Sanguinetti S, Brites F, Berg G, Verona J, Basilio F, Wikinski R, Schreier L (2004) Impaired high density lipoprotein antioxidant activity in healthy postmenopausal women. Atherosclerosis. 177: 203-10.

137. Zekan J, Sirotković SM, Skerlev M (2011) Oncogenic aspect of HPV infections oft he female genital tract //DNA replication-current advances/ Seligmann H (ur.). New York: In Tech, 595-612.

138. Zekan J, Sirotković SM., Ćorušić A, Lešin J (2009) Oncogenic Aspects HPV Infections of the Female. Medicus 1: 1867 – 71.

139. Zekan J, Skerlev M, Vrčić H (2005) Infekcija HPV i premaligne i maligne promjene vrata maternice. Medix 58.

8. POPIS KRATICA

POPIS KRATICA

ARE	arilesterazna aktivnost PON1
ARE/apoAI	arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju apoAI
ARE/HDL	arilesterazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a
CAT	katalaza
CIN	cervikalna intraepitelna neoplazija
CIS	karcinom *in situ*
GPx	glutationska peroksidaza
GSH	reducirani glutation
GST	glutation S-transferaza
HDL	lipoprotein velike gustoće
HG	CIN visokog rizika (od eng. *high grade)*
HPV	humani papiloma virus
LDL	lipoprotein male gustoće
LG	CIN niskog rizika (od eng. *low grade*)
MDA	malondialdehid
oLDL	oksidirani lipoprotein male gustoće
PCR	lančana reakcija polimerazom
PHD	patohistološka dijagnoza
PON1	paraoksonaza 1
POX	bazalna paraoksonazna aktivnost PON1
POX/apoAI	bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju apoAI
POX/HDL	bazalna paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a
POX1	NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1
POX1/apoAI	NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju apoAI
POX1/HDL	NaCl-stimulirana paraoksonazna aktivnost PON1 standardizirana na koncentraciju HDL-a
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata
RNS	reaktivni dušikovi spojevi
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (od engl. *single nucleotide polymorphism*)

SOD	superoksidna dizmutaza
VLDL	lipoprotein vrlo niske gustoće

9. ŽIVOTOPIS

Dražan Butorac rođen je 18. travnja 1967. godine u Kninu, gdje je završio osnovnu i srednju medicinsku školu, te stekao zvanje medicinskog tehničara općega smjera. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1987., a diplomirao je 1993. godine. Stručni ispit položio je 1994. godine. Specijalista ginekologije i porodništva postao je 2002. godine, a specijalista uže specijalizacije „Ginekološke onkologije“ postao je 2012. godine. Sveučilišni poslijediplomski doktorski studiji Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2009. godine. Od 2007. godine radi u KBC-u „Sestre milosrdnice“ u Klinici za ženske bolesti i porodništvo. Zadnje četiri godine bavi se problematikom premalignih i ranih malignih promjena vrata maternice i donjega genitalnog trakta, te obavlja dužnost tajnika Hrvatskoga društva za kolposkopiju i bolesti vrata maternice Hrvatskoga liječničkog zbora

POPIS RADOVA:

A. Popis znanstvenih radova

1. Kruljac I, Butorac D, Vrkljan M (2014) Letrozole or Clomiphene for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome. New England Journal of Medicine. 371: 1462-1464.
2. Butorac D, Ćelap I, Kačkov S, Robić V, Miletić T, Flegar Meštrić Z, Hulina A, Kuna K, Žanić Grubišić T, Grdić Rajković M (2014) Paraoxonase 1 activity and phenotype distribution in premenopausal and postmenopausal women. Biochemia Medica 24: 273-80.
3. Tišljarić-Medenjak D, Kosec V, Tonković-Durisević I, Zec I, Sabolović-Rudman S, Kuna K, Herman R, Ivicević-Bakulić T, Soljacić-Vranes H, Tuckar N, Muzinić D, Butorac D, Bolanca I, Kosec A, Stipoljev F (2011) Biochemical Screening of Fetal Aneuploidies and Neural Tube Defects by »Double-Test« in Croatia: A 10 Years’ Experience. Collegium Antropologicum 35: 957-62.
4. Tišljarić-Medenjak D, Zec I, Košec V, Ivičević Bakulić T, Kuna K, Herman R, Butorac D, Bolanča I, Ujević M, Radončić E, Baras–Slivar S, Šemnički N, Tonković-Đurišević I, Kralik-Oguić S, Lovrić B (2009) Kombinirani ultrazvučno-biokemijski probir fetalnih trisomija u prvom i dvostruki biokemijski probir u drugom tromjesečju u neugroženim trudnoćama. Gynecol Perinatol 18: 123-131.
5. Starčević M, Tumbri J, Butorac D, Salihagić Kadić A (2011) Early neurological outcome of neonates with intrauterine growth restriction, Journal of perinatal medicine 39: 146-146.

B. Popis radova u zbornicima skupova

1. Butorac D, Eljuga D, Gall V, Leniček T, Jokanović Lj, Vuković A, Grdić Rajković M, Kuna K, Kraljevic Z (2014) Microinvasive cervical cancer after pregnancy „Vanished“, Follow up in Gynecological malignancies. Torino.
2. Butorac D (2014) Hormonski aktivni tumori jajnika, Drugi hrvatski simpozij o raku jajnika. Zagreb.
3. Jukić M, Butorac D, Leniček T, Grdić-Rajković M, Vrkljan-Radošević M, Kovačević T, Bolanča I, KunK, Kraljević Z, Grubišić G (2014) Pregnancy after several surgical treatments of adenocarcinoma in situ of the uterine cervix. 15 th World Congress for Cervical Pathology and Colposcopy. London.
4. Butorac D, Grdic Rajković M, Ćelap I, Kačkov S, Miletić T, Hulina A , Žanic GrubišicaT (2014) Arylesterase activity of Paraoxonase 1 patienst with premalignat lesion od the cervics. Follow up in Gynecological malignancies. Torino.
5. Butorac D, Jukić M, Kuna K, Grdić Rajković M, Mirošević G, Ćelap I, Kovačević T, Grubišić G (2013) LLETZ in the University Hospital „Sestre milosrdnice“, 6 th Congres oft he European Federation for Colposcopy and Cervical. Praha.
6. Butorac D, Kuna K , Eljuga D, Lepušić D, Grdic Rajkovic M, Čelap I, Grubišić G, Roguljić (2013) A sixteen years of LETZ-in University hospital center “Sisters of Charity” Zagreb, Croatia. 3rd Congress of Gynecologists and Obstetricians of Macedonia. Ohird
7. Butorac D, Kuna K, Grdić Rajković M, Grubišić G, Miletić T, Kraljević Z, Soljačić Vraneš H, Jukić M (2013) Prisutnost HPV infekcije u cervikalnim intraepitelnim lezijama visokog stupnja (HSIL), 5. Hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama sa međunarodnim sudjelovanjem. Opatija.
8. Soljačić Vraneš H, Kuna K, Kopjar M, Kraljević Z, Jukić M, Radošević Vrkljan M, Butorac D, Vuković A, Leniček T, Marton I (2013) Risk of malignancy amongs women undergoing polyp or myoma resections, 1st Annual MESGE Congres in Conjuctions with the Turkish Socyiety og Ginecological Endoscopy. Antalya.
9. Butorac D , Grubišić G, Kuna K , Bolanča B, Grbavac I , Vuković A, Eljuga D, Roguljić A (2013) Rezultati liječenja preinvazivnih lezija vrata maternice LETZ-

om, 1. međunarodni kongres 2. hrvatski simpozij o prevenciji i liječenju početnog raka vrata maternice. Zagreb.

10. Butorac D, Kraljević Z (2012) Resekcija submukoznog mioma XIII. Hrvatski poslijediplomski tečaj ginekološke kirurgije i endoskopije s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb.
11. Butorac D, Jokanović LJ, Grubišić G, Kos M, Miše I, Vuković A, Eljuga D, Kraljević Z, Kuna K, Tučkar N, Delač J, Grbavac I, Roguljić A (2012) Kolposkopija u ranoj dijagnozi preinvazivnih promjena vrata maternice. 2. Hrvatski kongres ginekološke onkologije sa međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb.
12. Kraljević Z, Butorac D, Grbavac I, Bolanča I (2012) Premaligne lezije vrata maternice u žena u postmenopauzi, „Iskustva iz uroginekološke ambulante“. 1. hrvatski simpozij o prevenciji i liječenju početnog raka vrata maternice s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb.
13. Butorac D, Tučkar N, Eljuga D, Leniček T, Kuna K, Kraljević Z , Levanat S, Eljuga LJ, Ljiljak D, Mazulin T, Klarić P, Delač J, Sušac I (2011) Primary uterine and ovarian cancer in patients diagnosed with breast cancer : A Case report. 17th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO). Milan.
14. Mirošević G, Butorac D, Kruljac I, Leniček T, Babić N, Kuna K, Klarić P, Kraljević Z, Lepušić D, Vrkljan M (2011) Tumor Leydigovih stanica - prikaz slučaja. VIII hrvatski kongres o ginekološkoj endokrinologiji, humanoj reprodukciji i menopauzi i VI hrvatsko–slovenski simpozij o menopauzi i andropauzi. Brijuni.
15. Mirošević G, Butorac D, Kruljac I, Vrkljan M (2012) Erythrocytosis and thrombocytosis secondary to hypertestosteronemia caused by ovarian Leydig cell tumor. 14th European Congress of Endocrinology. Florence.
16. Mirošević G, Butorac D, Kruljac I, Berković Cigrovski M, Herman Mahečić D, Šulentić P, Babić N, Altabas V, Bečejac B, Kuna K, Vrkljan M (2011) Secondary erythrocytosis caused by Leydig cell tumour: a case report. Peti hrvatski endokrinološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Pula.
17. Mirošević G, Goldoni V, Nikolić M, Butorac D, Kruljac I, Berković Cigrovski M, Herman Mahečić D, Šulentić P, Altabas V, Bečejac B, Ljubičić N, Vrkljan M

(2011) Hormonal status in patients treated with intragastric ballon. Peti hrvatski endokrinološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Pula.

18. Mirošević G, Nikolić M, Butorac D, Goldoni V, Boban M, Supanc V, Zjačić-Rotkvić V, Ljubičić N, (2010) Hormonal status of patients treated by intragastric balloon; 4. Slovenski endokrinološki kongres. Maribor.
19. Grubišić G, Butorac D, Ljiljak D, Kos M (2008) Precancerous cervical lesions during pregnancy: Case report. International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy XIII World Congres. Auckland.
20. Butorac D, Kraljević Z, Tučkar N, Grubišić G, Novaković I (2012) Sekundarna prevencija raka vrata maternice- dijagnostički postupnik. 1. hrvatski simpozij o prevenciji i liječenju početnog raka vrata maternice. Zagreb.
21. Butorac D, Klarić P, Balenović A, Kuna K, Kraljević Z, Jokanović Lj, Eljuga D, Ljiljak D, Đaković I, Grbavac I (2010) PET/CT u praćenju raka jajnika. 1. Hrvatski simpozij o raku jajnika. Zagreb.
22. Butorac D, Leniček T, Levanat S, Eljuga LJ, Ljiljak D, Mazulin T, Klarić P, Delač J, Sušac I, Grbavac I, Eljuga D (2010) Primary uterine and ovarian cancers in patients diagnosed with breast cancer- a case report: HDIR 1: From bench to Clinic. Zagreb.
23. Mirošević G, Nikolić M, Boban M, Supanc V, Butorac D, Krpan R, Posavec LJ, Goldoni V, Zjačić-Rotkvić V, Ljubičić N (2010) Hormonal status of patients treated by intragastric balloon. 4.Hrvatski kongres o debljini. Umag.
24. Kuna K, Butorac D (2008) Metode potpomognute oplodnje i način dovršenja trudnoće u razdoblju od 2001-2007. XXIV perinatalni dani „Ante Dražančić“. Zagreb.
25. Butorac D, Bagarić I, Kraljević Z, Tučkar N, Vrkljan-Radošević M (2005) Kaznena djela protiv spolne slobode i spolnog ćudoređa. XXII perinatalni dani „Ante Dražančić“. Zagreb.
26. Butorac D, Herman R, Janeš-Poje V, Gudek J, Tučkar N, Vrkljan Radošević M, Samoilović S, Bojanić G (2005) Učestalost nalaza uzročnika infekcija dobivenih iz obrisaka cerviksa i krvi žena Koprivničko-Križevačke županije. VII Hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama „Simozij Slavka Schonwalda“. Opatija.

27. Butorac D, Grubišić G, Vrkljan-Radošević M, Herman R, Košec V, Ivičević-Bakulić T, Tučkar N, Getaldić B, Sumpor B (2004) Usporedba rezultata primjene tramadola i petidina u porodu, XXI Perinatalni dani „Ante Dražančić“, Osijek.
28. Ivičević Bakulić T, Hodek B, Marton I, Vrkljan Radošević M, Herman R, Košec V, Butorac D (2002) Izbor metode poroda kod stanja iza carskog reza ovisno o prethodno izmjerenoj vrijednosti DUS-a. XIX perinatalni dani „Ante Dražančić“. Zagreb.