

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,

Sveučilište u Dubrovniku,

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Anita Pokupec Bilić

UTJECAJ KEMOTERAPIJE ANTRACIKLINIMA NA
OKSIDACIJSKI STRES, UPALU I METILACIJSKI STATUS
GENA *RBI* U PERIFERNOJ KRVI BOLESNIKA SA SARKOMOM

Doktorski rad

Osijek, 2024

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija, Temeljne medicinske znanosti

Utjecaj kemoterapije antraciklinima na oksidacijski stres, upalu i metilacijski status gena *RB1* u perifernoj krvi bolesnika sa sarkomom

Anta Pokupec Bilić

Doktorski rad je izrađen u: Kliničkom bolničkom centru Zagreb i Sveučilištu u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Mentor 1: Prof.dr.sc. Ana-Marija Domijan
Mentor 2: Prof.dr.sc. Sandra Radić Brkanac

Kratki sažetak doktorskog rada:

Ovo istraživanje provedeno na kohorti bolesnika sa sarkomom pokazalo je da bolesnici sa sarkomom mogu imati promjenu metilacije gena *RB1* te da se viša razina upale i niža razina antioksidansa može povezati s većim tumorskim opterećenjem. Niža razina oksidacijskog stresa i upale te snižena metilacija CpG85 gena *RB1* nakon kemoterapije antraciklinima odražava njen pozitivan učinak.

Broj stranica:

Broj slika: 23

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 129

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: sarkomi, kemoterapija, oksidacijski stres, upala, epigenetika

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: Biology, Basic medical sciences

Impact of anthracycline-based chemotherapy on oxidative stress, inflammation and methylation status of *RB1* gene in peripheral blood in patients with sarcoma

Anta Pokupec Bilić

Thesis performed at: University Hospital Centre Zagreb, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Supervisor/s:

Mentor 1: Prof. Ana-Marija Domijan, PhD

Mentor 2: Prof. Sandra Radić Brkanac, PhD

Short abstract:

This study conducted on a cohort of patients with sarcoma showed that patients with sarcoma may have changes in the methylation of the RB1 gene, and that higher levels of inflammation and lower levels of antioxidants can be associated with greater tumor burden. The lower levels of oxidative stress and inflammation, along with the reduced methylation of the CpG85 region of the RB1 gene after anthracycline chemotherapy, reflect its positive effect.

Number of pages:

Number of figures: 23

Number of tables: 15

Number of references: 129

Original in: Croatian

Key words: sarcomas, chemotherapy, oxidative stress, inflammation, epigenetics

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

POPIS KRATICA

ATP, adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

CAT, katalaza (engl. *catalase*)

CNV, promjena broja kopija (engl. *copy number variants*)

CpG85, CpG u intronu 2 gena *RBI* (engl. *intron 2 CpG of RBI*)

CpG106, CpG u promotoru i eksonu 1 gena *RBI* (engl. *promoter and exon 1 CpG of RBI*)

CRP, C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*)

CT, računalna tomografija (engl. *computed tomography*)

GPx, glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

GR, glutation reduktaza (engl. *glutathione reductase*)

GSH, glutation, (engl. *glutathione*)

GSSG, glutation disulfid (engl. *glutathione disulfide*)

ETC, transportni lanac elektrona (engl. *electron transport chain*)

DNA, deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DNMT, DNA metiltransferaza, (engl. *DNA methyltransferase*)

GIST, gastrointestinalni stromalni tumor (engl. *gastrointestinal stromal tumors*)

IL, interleukin (engl. interleukin)

LMS, leiomiosarkom (engl. *leiomyosarcoma*)

LPO, lijevi oligonukleotid MLPA probe (engl. *left MLPA probe oligonucleotide*)

MDA, malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)

MPNST, sarkom živčanih ovojnica (engl. *Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*)

MR, magnetska rezonancija, (engl. *Magnetic Resonance Imaging*)

MS-MLPA, metilacijsko specifična metoda višestrukog umnažanja vezanih proba (engl. *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

NF1, gen (engl. *neurofibromatosis type 1*)

PFS, period do progresije bolesti (engl. *progression-free survival*)

RBI, gen (engl. *retinoblastoma 1*)

ROS, reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

RNS, reaktivni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*)

RPO, desni oligonukleotid MLPA probe (engl. *right MLPA probe oligonucleotide*)

SOD, superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)

SS, sinovijalni sarkom (engl. *synovial sarcoma*)

STS, sarkomi mekih tkiva (engl. *soft tissue sarcoma*)

TBA, 2-tiobarbituratna kiselina (engl. *2-Thiobarbituric acid*)

TP53, gen (engl. *Tumor Protein P53*)

WHO, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. SARKOMI	1
1.1.1. Podjela sarkoma	1
1.1.2. Incidencija i etiopatogeneza sarkoma.....	3
1.1.3. Terapija sarkoma	4
1.1.4. Mehanizam djelovanja antraciklina.....	5
1.2. OKSIDACIJSKI STRES.....	7
1.2.1. Reaktivni kisikovi spojevi	8
1.2.2. Malondialdehid.....	9
1.2.3. Glutacion.....	10
1.2.4. Superoksid dismutaza.....	11
1.2.5. Uloga oksidacijskog stresa u tumorigenezi i metilacijskim DNA procesima.....	12
1.3. UPALA.....	13
1.3.1. Upala i tumorigeneza.....	14
1.4. EPIGENETIKA.....	15
1.5. GEN <i>RBI</i>	17
1.5.1. Metilacijska mjesta gena <i>RBI</i>	19
1.5.2. Metilacijsko specifična metoda višestrukog umnažanja vezanih proba (MS – MLPA)....	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. ISPITANICI	23
3.2. METODE	24
3.2.1. Metilacijsko profiliranje i kvantifikacija promjena broja kopija (CNV) unutar gena <i>RBI</i> metodom MS-MLPA	24
3.2.2. Određivanje koncentracije ROS	29
Priprema otopine	30
3.2.3. Određivanje koncentracije MDA	32
Priprema otopina	33
Postupak mjerenja koncentracije MDA.....	34
3.2.4. Određivanje aktivnosti SOD.....	34
3.2.5. Određivanje koncentracije GSH.....	37
Priprema otopina	38
Postupak mjerenja koncentracije GSH.....	38
3.2.6. Određivanje hematoloških parametara	39
3.2.7. Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina.....	39
3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	40
4. REZULTATI.....	41

4.1. KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	41
4.2. PROTOKOL KEMOTERAPIJA BOLESNIKA UKLJUČENIH U ISTRAŽIVANJE	42
4.3. TUMORSKO OPTEREĆENJE BOLESNIKA UKLJUČENIH U ISTRAŽIVANJE	43
4.4. KVANTIFIKACIJA PROMJENA U BROJU KOPIJA (CNV) I METILACIJSKI STATUS GENA <i>RBI</i> 44	
4.5. POVEZANOST PARAMETARA OSIDACIJSKOG STRESA I UPALE S TUMORSKIM OPTEREĆENJEM BOLESNIKA.....	46
4.6. PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA I UPALE PRIJE I NAKON KEMOTERAPIJE.....	50
4.7. REGRESIJSKA ANALIZA UČINAKA KEMOTERAPIJE NA PARAMETRE OKSIDACIJSKOG STRESA I UPALE	56
5. RASPRAVA	62
6. ZAKLJUČCI.....	68
7. LITERATURA.....	70
8. SAŽETAK.....	83
9. SUMMARY	85
10. ŽIVOTOPIS.....	86

Ocjena rada
u tisku

1. UVOD

1.1. SARKOMI

1.1.1. Podjela sarkoma

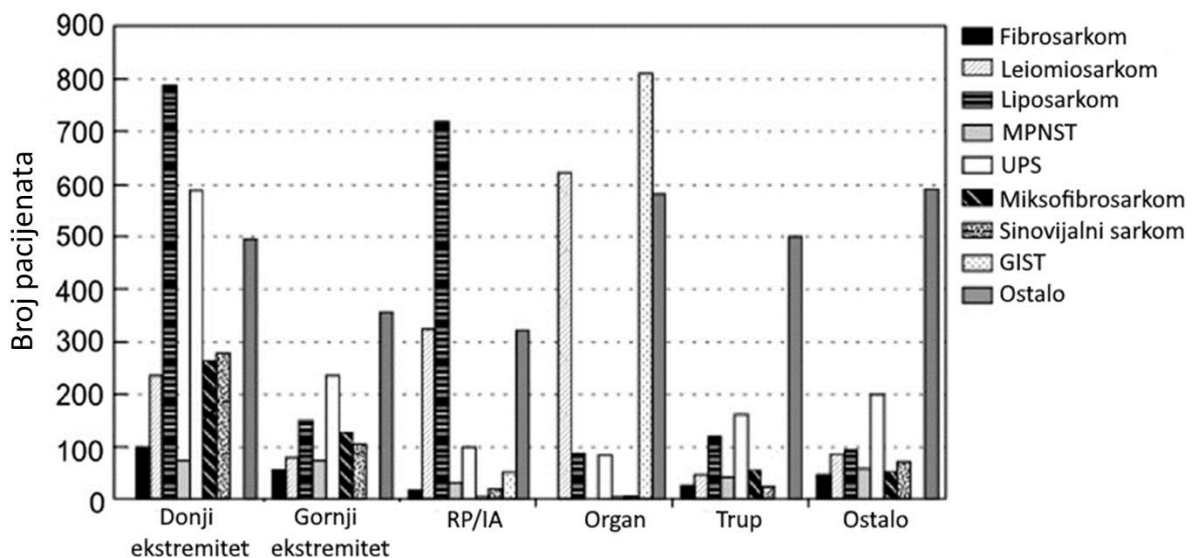
Sarkomi su heterogena grupa rijetkih tumora s velikim brojem histoloških podtipova (Pillozzi i sur., 2021). Ovisno o tkivnom porijeklu i mjestu nastajanja, dijele se na osteosarkome i sarkome mekih tkiva (STS). Osteosarkomi nastaju iz stanica koštanog sustava, dok su STS tumori s ishodištem u mezenhimalnom tkivu kao što su mišići, tetive i ligamenti, masno tkivo, krvne žile, sinovijalna ovojnica, ovojnice perifernih živaca te hrskavica (Pillozzi i sur., 2021). Histološki podtip Ewingov sarkom, može imati ishodište iz stanica kosti (80%), ali i mekih tkiva (20%) (Worch i sur., 2010). Prema tipu tkiva iz kojih sarkomi nastaju, svaki od njih ima svoj poseban naziv (**Tablica 1**).

Tablica 1. Osnovna podjela i nazivi sarkoma prema tkivnom porijeklu

Vrsta tkiva		Naziv tumora
Sarkomi koštanog sustava	Kost	Osteosarkom
Sarkomi mekih tkiva (STS)	Poprečnoprugasti mišić	Rabdomiosarkom
	Glatki mišić	Leiomyosarkom
	Tetive, ligamenti	Fibrosarkom
	Masno tkivo	Liposarkom
	Krvne žile	Angiosarkom
	Sinovijalna ovojnica	Sinovijalni sarkom
	Ovojnica perifernih živaca	MPNST
	Hrskavica	Hondrosarkom
	Kost / meko tkivo oko kostiju	Ewingov sarkom

Osim osnovne podjele prema tkivnom ishodištu, postoji više od 100 različitih histoloških podtipova sarkoma (prema mikroskopskim i imunohistokemijskim obilježjima te

molekularnim, odnosno genetskim markerima) što njihovu klasifikaciju čini iznimno zahtjevnom. Prema histološkoj podjeli najučestaliji STS su: leiomiosarkom (LMS) s 20% učestalosti, liposarkom s 20-25% učestalosti, miksofibrosarkom s 20% učestalosti od kojeg najčešće obolijevaju osobe starije dobi, nediferencirani pleiomorfni sarkom s 20% učestalosti te sarkom živčanih ovojnica (MPNST od engl. *Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*) i sinovijalni sarkom (SS) s učestalošću od 4-10%, odnosno 6% (Fletcher i sur., 2013; Hui, 2016). Sarkomi mogu nastati na bilo kojem anatomskom sijelu u organizmu. STS se u 75% slučajeva pojavljuju na ekstremitetima, od toga većinom na nogama i to najčešće na bedru s učestalošću od 44% od ukupnog broja ekstremitetnih sarkoma. Najzastupljeniji tip STS-a koji zahvaća ekstremitete je liposarkom (Brennan i sur., 2013). STS koji se pojavljuju u utrobi čine 22% svih STS, dok je retroperitoneum anatomsko sijelo gdje sarkomi mogu nastati s učestalošću od 16% i to najčešće liposarkom. STS s ishodištem u trupu i drugim dijelovima tijela čine 10% i 12% te imaju različitu distribuciju histoloških podtipova (**Slika 1**). Ewingov sarkom se najčešće pojavljuje na ekstremitetima (Worch i sur., 2010). Osteosarkom može nastati na bilo kojem dijelu tijela no najčešće nastaje na dugim kostima (Zhao i sur., 2021).



Slika 1. Učestalost sarkoma mekih tkiva prema histopatologiji i anatomskom mjestu nastanka. RP – retroperitoneum; IA – intrabdominalno; UPS – nediferencirani pleiomorfni sarkom; GIST – *gastrointestinal stromal tumors*. Istraživanje je obuhvatilo 10 000 bolesnika u periodu od trideset godina (preuzeto i prilagođeno od Brennan i sur., 2013).

1.1.2. Incidencija i etiopatogeneza sarkoma

U Europi je godišnja incidencija STS-a 4-6 slučajeva na 100 000 stanovnika, što je slično globalnoj razini od 5 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje (WHO, 2020). Osteosarkomi se javljaju s 5-10 puta nižom učestalošću od STS-a, odnosno u 0,3-0,9 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje (Misaghi i sur., 2018). S obzirom na nisku incidenciju (do 1% udjela među tumorima ukupno), sarkomi pripadaju rijetkim malignim bolestima što otežava sustavno prikupljanje i istraživanje podataka (Pillozzi i sur., 2021). Prema prikupljenim podacima iz 76 europskih registara za rak putem projekta RARECARE (od engl. *The Surveillance of Rare Cancers in Europe*), sarkomi se mogu pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, ali incidencija sarkoma raste s dobi (Stiller i sur., 2013). Neki histološki podtipovi poput primjerice Ewingovog sarkoma ili embrionalnog rhabdomiosarkoma se javljaju znatno češće u djetinjstvu, dok su drugi kao npr. mikrofibrosarkom učestaliji u starijoj dobi (Pillozzi i sur., 2021). Hondrogeni sarkom i GIST (od engl. *Gastrointestinal stromal tumors*) najčešće se javljaju u dobi iznad 65 godina (Stiller i sur., 2013). S obzirom na spol, učestalost sarkoma nije u potpunosti razjašnjena. Generalni stav je da postoji veći rizik nastanka sarkoma kod muškaraca primjerice 1,4:1 (Bauer i sur., 2001), ali postoje izvješća o višoj učestalosti kod žena poglavito zbog ginekoloških sarkoma (Stiller i sur., 2013; Trama i sur., 2019). Zbog visokog rizika za diseminaciju i relaps, oko 50% bolesnika razvije metastaze i umre. Petogodišnje preživljenje za bolesnike s lokaliziranim visokim stupnjem sarkoma je 80%, s lokalno napredovalom bolesti 50-60% te manje od 20% kod bolesnika s metastatskim stadijem IV (WHO, 2020; Wang i sur., 2019). Prema europskom registru karcinoma EUROCare-5 (od engl. *EUROpean Cancer Registry - 5*), prosječno petogodišnje preživljenje bolesnika sa STS u Europi je 60% (Baili i sur., 2015).

Etiopatogeneza nastanka, razvoja i širenja sarkoma još uvijek je relativno slabo poznata. Kao mogući čimbenici nastanka sarkoma navode se okolišni čimbenici poput zračenja, virusnih infekcija i izlaganja kemijskim agensima (pesticidi, dioksini) (Pillozzi i sur., 2021). Ionizirajuće zračenje je najčešći okolišni čimbenik koji se povezuje s patogeneзом sarkoma, osobito terapija zračenjem koja je dio medicinskih protokola liječenja (Hui, 2016). Od kemijskih agensa, utvrđeno je da izlaganje vinil kloridu, koji se koristi u industriji plastike od 1970. godine, povećava rizik za nastanak sarkoma pri čemu je najučestaliji histološki tip angiosarkom (Collins i sur., 2014).

Pojavnost sarkoma povezuje se i sa sindromima nasljedne predispozicije za rak. Prema podacima objavljenim u preglednom radu Penel i sur. (2008), otprilike 3% STS se povezuje s

genetičkim (nasljednim) sindromima. Medijan dobi postavljanja dijagnoze kod bolesnika s genetičkim sindromima je 37 godina, što je znatno niža dob u odnosu na bolesnike bez genetičke predispozicije i čiji je medijan dobi postavljanja dijagnoze 55 godine. Također, kod bolesnika s genetičkim sindromima manja je učestalost histološkog tipa liposarkoma u odnosu na bolesnike sa sporadičnim nastankom sarkoma (Penel i sur., 2008). Geni i sindromi koji se povezuju s visokim rizikom za nastanak sarkoma uključuju primjerice gen *RBI* (nasljedni retinoblastom), gen *NF1* (neurofibromatoza tip 1) te gen *TP53* čije su patogene varijante podloga Li-Fraumeni sindroma (Evans i sur., 2002; Kleinerman i sur., 2007).

1.1.3. Terapija sarkoma

Terapija STS-a i osteosarkoma uključuje kirurško odstranjivanje, zračenje i kemoterapiju, ovisno o anatomskom sijelu, histološkom podtipu i stupnju, a učinkovitost primijenjene terapije prvenstveno ovisi o stadiju bolesti i tumorskom opterećenju organizma. Metastatska bolest je u pravilu neizlječiva, osobito zbog rezistencije na kemoterapiju (Katz i sur., 2012). Osim toga, sarkomsku onkologiju obilježava nedostatak biomarkera za rano otkrivanje kao i razvoj bolesti te odgovor na liječenje, zbog čega su slikovne metode jedina dostupna metoda dijagnostike i praćenja (Pillozzi i sur., 2021). Još od 1970. godine za liječenje sarkoma se koriste antraciklini koji su i do danas ostali osnova kemoterapije kod adjuvantnog, neoadjuvantnog i metastatskog liječenja zbog njihovog antimitotičkog i citotoksičnog djelovanja (Casali i sur., 2010).

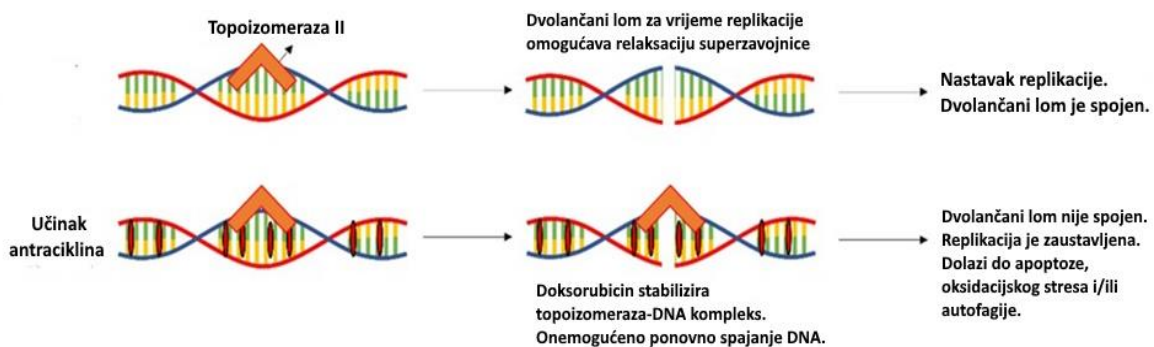
Antraciklini su antibiotici izolirani iz bakterije *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Doksorubicin (poznat i kao Adriamycin), epirubicin te daunorubicin su antraciklini koji se, osim u liječenju sarkoma, koriste u liječenju raznih vrsta malignih bolesti poput leukemija, limfoma te solidnih tumora dojke, jajnika, bubrega i pluća (Meyer i Seetharam, 2019). U liječenju sarkoma, doksorubicin se osim samostalno (monokemoterapija), primjenjuje i u kombiniranim kemoterapijskim protokolima zajedno s drugim citotoksičnim lijekovima (polikemoterapija) poput ifosfamida, dakarbazina, vinkristina i etopozida. Citotoksični i mutageni mehanizmi dodatnih lijekova povećavaju mogućnost boljeg antitumorskog djelovanja (Verschoor i sur., 2020).

1.1.4. Mehanizam djelovanja antraciklina

Mehanizam djelovanja antraciklina nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da postoji nekoliko procesa koji su vezani uz njihovo antitumorsko djelovanje poput interkalacije u molekulu DNA, inhibicije topoizomerazne aktivnosti, oštećenja mitohondrija te povećana proizvodnja slobodnih radikala i oksidacijski stres. Ovisno o dozi, antraciklini mogu potaknuti apoptozu putem mitohondrija, starenje i nekrozu tumorskih stanica (Kciuk i sur., 2023).

Antraciklini mogu potaknuti oštećenja DNA interkalirajući se preko vodikove veze gvanina koji su dio GC parova baza DNA što dovodi do stvaranja pozitivne superzavojnice molekule DNA (Howerton i sur., 2003). Na taj način inhibiraju DNA i RNA sintezu zaustavljajući dijeljenje stanica, osobito onih s visokim stupnjem diobe. Također, kroz primjenu kliničkih doza antraciklinske terapije, dolazi do stvaranja antraciklin-DNA kovalentnih kompleksa koji mogu aktivirati odgovor stanice na stanično oštećenje bez obzira na istovremeni utjecaj antraciklina na topoizomerazu II. Međutim, stvaranje kovalentnih kompleksa se ne smatra primarnim mehanizmom djelovanja antraciklina (Coldwell i sur., 2008).

Drugi, ujedno i najistraživaniji mehanizam djelovanja antraciklina je inhibicija topoizomerazne aktivnosti (Slika 2). Topoizomeraze su enzimi u jezgri koji relaksiraju superstrukturu nukleinskih kiselina uzrokujući lomove i prespajanja u molekuli DNA, omogućujući tako fiziološko odvijanje replikacije. Topoizomeraza I uzrokuje jednolančane lomove DNA što dovodi do prezavijanja molekule DNA, dok topoizomeraza II uzrokuje dvolančane lomove.



Slika 2. Prikaz inhibicije topoizomeraze II antraciklinima. Topoizomeraza II katalizira lomove oba lanca molekule DNA pri čemu dolazi do odmotavanja i relaksacije superzavojnice DNA, što omogućuje daljnu transkripciju i replikaciju DNA. Umetanje antraciklina između parova baza molekule DNA onemogućuje odvajanje topoizomeraze II koja ostaje kovalentno vezana za dvolančane lomove, uzrokujući nemogućnost ponovnog spajanja pocijepane molekule DNA. Zaustavlja se replikacija, što uzrokuje staničnu smrt (Mandapati i sur., 2023).

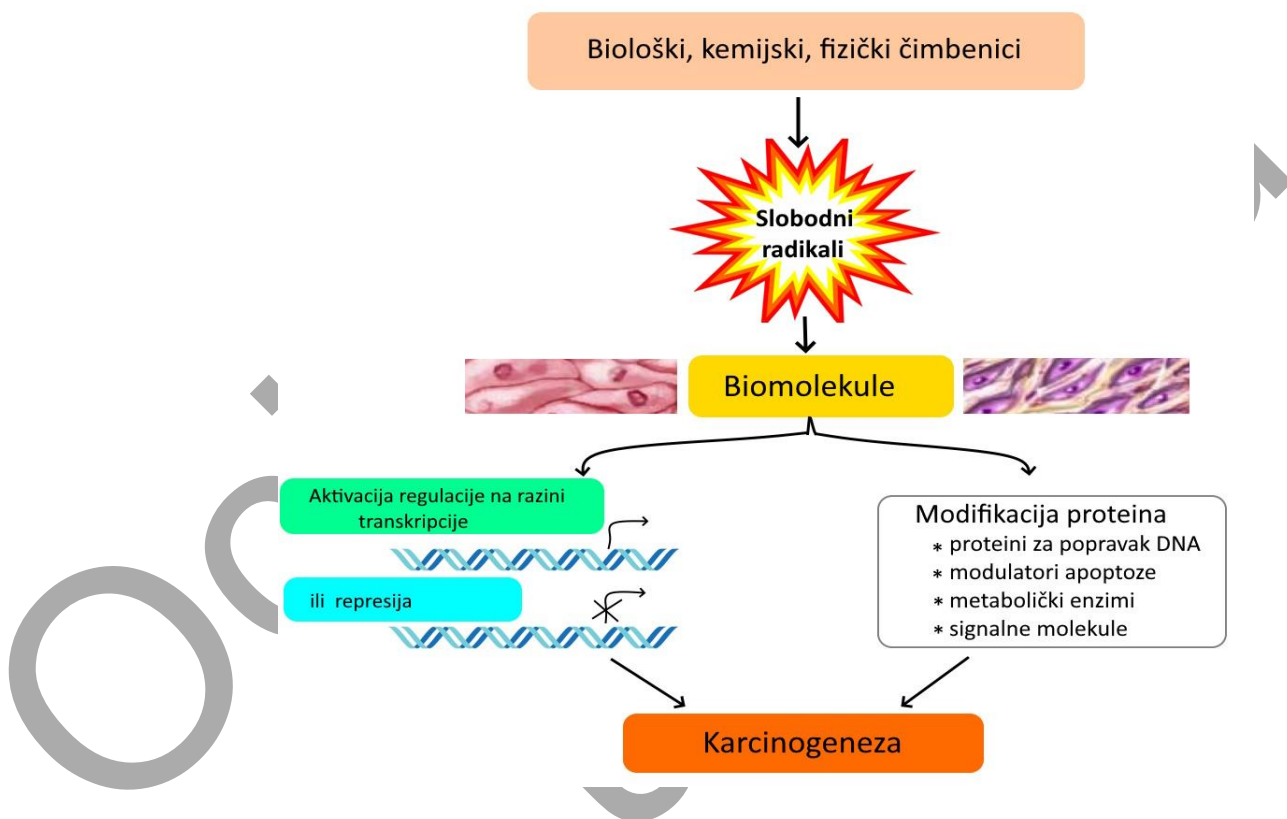
Za vrijeme DNA transkripcije i replikacije topoizomeraza II katalizira lomove oba lanca molekule DNA pri čemu dolazi do odmotavanja i relaksacije superzavojnice DNA koja time postaje kalup za transkripciju i replikaciju. Antraciklini uzrokuju da topoizomeraza II ostane kovalentno vezana za molekulu DNA što dovodi do nemogućnosti ponovnog spajanja izrezanih lanaca molekule DNA (Pommier i sur., 2010). Stoga se smatra da je enzim topoizomeraza II glavna ciljana molekula djelovanja antraciklina. Indukcija jednolančanih i dvolančanih DNA lomova onemogućava DNA replikaciju i utječe na proces transkripcije, zaustavljajući stanični ciklus u G1 i G2 fazi što stanične linije s visokim stupnjem diobe zbog nastale genomske nestabilnosti vodi prema apoptozi i oksidacijskom stresu u stanici (Kciuk i sur., 2023).

Treći mehanizam koji je odgovoran za antitumorsko djelovanje antraciklina je stvaranje slobodnih radikala koji kroz reduktivan proces ovisan o željezu oštećuju DNA i staničnu membranu, što pokreće starenje stanice te smrt, pri čemu se javljaju i upalni procesi (Kciuk i sur., 2023). Doksorubicin se direktno veže na molekule kardiolipina. Kardiolipin je glavna fosfolipidna komponenta na unutrašnjoj membrani mitohondrija koja sudjeluju u respiratornom lancu. Vezanje doksorubicina na kardiolipin rezultira povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, prema engl. *Reactive Oxygen Species*) i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS, prema engl. *Reactive Nitrogen Species*) (Kciuk i sur., 2023). Povećana proizvodnja ROS uzrokuje oštećenja i mutacije mitohondrijske DNA koja kodira proteine transportnog lanca elektrona (ETC, prema engl. *Electron Transport Chain*). Izmijenjene/oštećene komponente proteina ETC dovode do propuštanja elektrona pri čemu se nakupljaju veće količine ROS i RNS spojeva u stanici (Kciuk i sur., 2023). Povećana razina slobodnih radikala može potaknuti lipidnu peroksidaciju i oštećenje staničnih i mitohondrijskih membrana, oštećenje endoplazmatskog retikuluma i molekule DNA. Mehanizam djelovanja doksorubicina kao i utjecaj slobodnih radikala na signalne puteve apoptoze istraživan je na stanicama osteosarkoma Saos-2 (Tsang i sur., 2003). Dvodnevni tretman doksorubicinom rezultirao je akumulacijom stanica u pre-G1 fazi, što je karakteristika apoptoze. Doksorubicin je uzrokovao i povećanu koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2) te superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$), kao i depolarizaciju mitohondrijske membrane, otpuštanje citokroma c i aktivaciju enzima kaspaza-3. Činjenica da je pomoću antioksidacijskog enzima katalaze zaustavljeno nakupljanje slobodnih radikala potaknuto doksorubicinom, kao i otpuštanje mitohondrijskog citokroma c te je zaustavljena apoptoza u stanicama Saos-2 govori u prilog tome da ROS inducirani doksorubicinom imaju važnu ulogu u pokretanju stanične smrti tumorskih stanica (Tsang i sur., 2003). Osim povećanog stvaranja slobodnih radikala s direktnim citotoksičnim

utjecajem, doksorubicin može potaknuti imunološki odgovor CD8⁺ T-limfocitnim stanicama kojem je cilj ukloniti tumorske stanice (Kciuk i sur., 2023).

1.2. OKSIDACIJSKI STRES

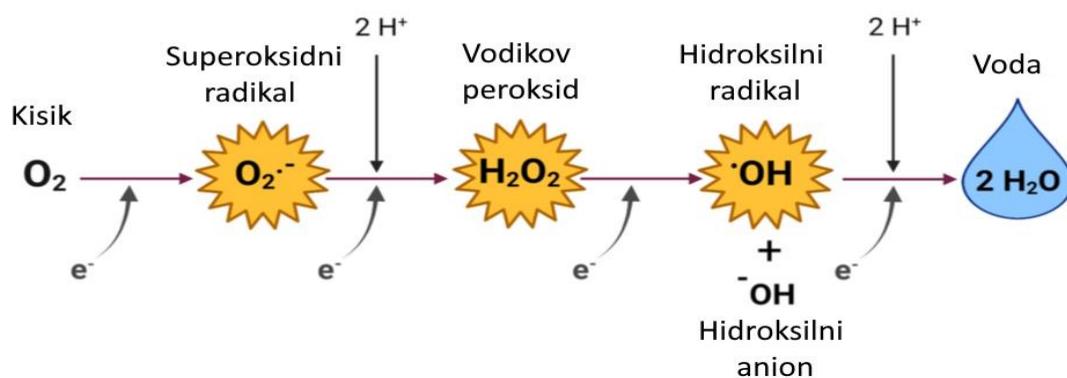
Oksidacijski stres posljedica je povećane razine slobodnih radikala koji uzrokuju oštećenja staničnih biomolekula koje pri tome mijenjaju i/ili gube svoje funkcije (Slika 3). Slobodni radikali su spojevi koji sadrže nespareni elektron što ih čini nestabilnim molekulama. Kako bi doseglye stabilnost takve molekule trebaju dodatni elektron koji oduzimaju drugim molekulama kako bi upotpunile svoj elektronski par. Takve reakcije uzimanja i davanja elektrona stvaraju nove slobodne radikale te uzrokuju daljnja oštećenja stanica (Valluru i sur., 2014).



Slika 3. Povećana proizvodnja slobodnih radikala posredovana biološkim, kemijskim i fizičkim čimbenicima oštećuje biomolekule prisutne u stanicama/tkivima. Oštećene biomolekule pokreću razvoj neoplastičnih stanica putem pojačane regulacije transkripcijskih čimbenika i inaktivacije gena supresora, mijenjaju funkcije proteina za popravak DNA, utječu na modulatore apoptoze, metaboličke enzime i signalne puteve koji dovode do karcinogeneze (preuzeto i prilagođeno prema Valluru i sur., 2014).

1.2.1. Reaktivni kisikovi spojevi

Proizvodnja ROS može biti uvjetovana unutarnjim i vanjskim čimbenicima. Unutarnji čimbenici su metaboličke biokemijske reakcije u aerobnim uvjetima. Takve kemijske reakcije se odvijaju u mitohondriju, peroksisomima, mikrosomima, aktiviranim neutrofilima potaknutim upalom te drugim enzimskim sustavima (Zaidieh i sur., 2019; Nolfi-Donagan i sur., 2020). Vanjske čimbenike čine ionizirajuće zračenje, ultraljubičaste zrake i teški metali. Aerobni organizmi koriste kisik (O_2) u različitim metaboličkim procesima kako bi proizveli dovoljne količine energije. Prilikom stvaranja energije u obliku adenozin trifosfata (ATP) kao završni primatelj elektrona u transportnom lancu elektrona je potreban O_2 (Holmström i sur., 2014). Specifična konfiguracija O_2 , najčešće u formi diatomske molekule, sadrži dva nesparena elektrona koja su smještena u različitim π orbitalama zbog paralelnih spinova elektrona. Iz tog razloga, O_2 može reagirati samo sa spojevima koji imaju jednako nesparene elektrone obrnutih spinova elektrona od molekule O_2 te primiti po jedan elektron u koracima redukcije do vode (Ho i sur., 1995).



Slika 4. Prikaz redukcije kisika do vode. Dodavanjem po jednog elektrona u reakciji nastaju slobodni radikali: superoksidni radikal, vodikov peroksid i hidroksilni radikal. Krajnji produkt su dvije molekule vode (preuzeto i prilagođeno Hernández-Cruz i sur., 2022).

Dodavanje elektrona dovodi do redukcije O_2 pri čemu nastaju međuproducti reakcije, reaktivniji derivati O_2 . Dodatkom prvog elektrona nastaje superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$); dodavanje drugog elektrona uz dva protona stvara vodikov peroksid (H_2O_2); trećim elektronom nastaje hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i hidroksilni anion (^-OH); redukcija četvrtim elektronom uz dva protona stvara dvije molekule vode (Di Meo i sur., 2020) (**Slika 4**). Reaktivni kisikovi spojevi sadrže kisik koji nije u potpunosti reduciran (npr. $\cdot OH$, H_2O_2) ili ima različitu distribuciju elektrona kao što je to prisutno u formi singletnog kisika.

Unutar stanice, homeostatska razina ROS ima važnu ulogu u staničnoj signalizaciji i staničnim procesima. Reaktivni kisikovi spojevi su u kontroliranim koncentracijama potrebni za normalno odvijanje fizioloških funkcija: stvaranje energije, sintezu hormona štitnjače, imunološku obranu (fagocitozu). Na taj način ROS omogućuju pravilan rad stanice i održavanje redoks ravnoteže (Zaidieh i sur., 2019).

Povećana razina ROS vodi prema strukturnim promjenama biomolekula poput lipida, proteina i DNA, pritom mijenjajući njihove funkcije. Takve povećane koncentracije mogu dovesti stanice do nekontrolirane proliferacije i stvaranja tumora te sudjeluju u patogenezi autoimunih, upalnih, degenerativnih i drugih bolesti (Wigner i sur., 2021; Nathan i sur., 2011).

1.2.2. Malondialdehid

Malondialdehid (MDA) je produkt lipidne peroksidacije. Kada slobodni radikali potaknu oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina u lipidnom dvosloju unutar staničnih membrana, nastaje lančana reakcija lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija se odvija u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Del Rio i sur., 2005; Ayala i sur., 2014). U fazi inicijacije slobodni radikali (kao npr. hidroksilni radikali) uklanjaju vodik iz višestruko nezasićenih masnih kiselina, formirajući lipidne radikale ($L\bullet$). Tijekom propagacije lipidni radikali reagiraju s molekulama O_2 u stanici, pri čemu nastaju lipidni peroksilni radikali ($LOO\bullet$). Peroksilni radikali mogu dalje reagirati s drugim lipidima, uzrokujući formiranje novih lipidnih radikala i lipidnih peroksida ($LOOH$), čime se nastavlja lančana reakcija. Terminacija nastupa kada se lipidni peroksidi ($LOOH$), koji su nestabilni, razgrade pri čemu nastaju različiti sekundarni produkti, poput 4-hidroksinoneala (4-HNE) i MDA. Raspadanje lipidnih peroksida može se dogoditi spontano ili pod utjecajem katalitičkih čimbenika kao što su metali (npr. željezo ili bakar) koji mogu ubrzati raspadanje lipidnih peroksida na reaktivnije spojeve (Perez-Matute i sur., 2009).

MDA je dokazano toksičan i mutagen. Može se kovalentno vezati za proteine i DNA, stvarati veze DNA-protein ili formirati adukte s proteinima ili s DNA (Marnett, 1999; Voitkun i sur., 1999). Kao rezultat takvog međudjelovanja, mogu nastati i različiti MDA epitopi koji djeluju na prirodni imunološki sustav, time što mogu potaknuti ekspresiju pro-upalnih gena i aktivirati nekoliko signalnih upalnih puteva koji uključuju proteine kinazu-C, p38-MAPK, ERK1/2 i NF- κ B (Busch i sur., 2017).

MDA se kao glavni i najistraživaniji produkt lipidne peroksidacije koristi kao biomarker oksidacijskog stresa u istraživanjima u različitim biološkim uzorcima poput krvi ili urina kod

bolesnika s malignim, kardiovaskularnim, plućnim, neurodegenerativnim te drugim bolestima (Del Rio i sur., 2005).

1.2.3. Glutation

Antioksidansi su molekule koje imaju važnu ulogu u redukciji oksidirajućih procesa i štetnih utjecaja slobodnih radikala u stanici (Gulcin, 2020). Uključuju molekule koje usporavaju, sprječavaju ili zaustavljaju oksidacijska oštećenja, direktno neutralizirajući ROS doniranjem elektrona ili regulirajući endogenu antioksidacijsku obranu na način da zaustavljaju stvaranje ROS (Christensen i sur., 2013).

Antioksidansi se dijele na enzimске i ne-enzimске. Među njima se nalaze spojevi s različitim načinom djelovanja, porijeklom (endogeni, egzogeni) i mjestom djelovanja (stanični, izvanstanični, membranski). S obzirom na različitost, svaki od njih ima posebnu ulogu u organizmu. Od enzimskih antioksidansa, dokazano je da međudjelovanje superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutacion peroksidaze (GPx) i glutacion reduktaze (GR) ima najbolji antioksidacijski obrambeni učinak za organizam (Sies, 1997). Ne-enzimski antioksidansi niske molekularne mase, također inaktiviraju reaktivne radikale. Neki od njih, poput glutaciona (GSH), ubikvina i albumina sintetiziraju se u organizmu (Shi i sur., 1999; Battisti i sur., 2008).

GSH je tripeptid koji se sastoji od aminokiselina glutamata, cisteina i glicina. Niske je molekularne mase te može izravno stupiti u interakciju s reaktivnim ROS i RNS ili može služiti kao kofaktor enzimima poput peroksidaza i transferaza (Foster i sur., 2009). Najvažnija biološka aktivnost GSH povezuje se sa sulfhidrilnom tj. tiolnom skupinom koja se nalazi na cisteinu i djeluje kao donor elektrona u reakciji sa slobodnim radikalima.

U stanici glutacion može postojati u dva oblika: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) (Pizzorno, 2014). Reakciju katalizira obitelj enzima glutacion peroksidaze (GPx) pri čemu dolazi do redukcije H_2O_2 s GSH, u vodu i GSSG (Ralat i sur., 2008).



Omjer GSH/GSSG određuje redoks status stanice jer GSSG može biti potencijalno toksičan za stanicu, ali zbog aktivnosti GR uz sudjelovanje NADPH kao kofaktora, većina GSH ostaje u reduciranom obliku (Huang i sur., 2002).

Unutarstanična koncentracija GSH se kreće u rasponu od 1 do 10 mM. U većini stanica koncentracija je oko 1 do 2 mM, dok u hepatocitima, u kojima se GSH sintetizira, koncentracija može biti i 10 mM (Meister, 1988). U različitim staničnim organelima GSH ima važnu ulogu. U mitohondrijima sudjeluje u regulaciji apoptoze, dok u jezgri regulira staničnu diobu (Yuan i sur., 2009; Pallardó i sur., 2009). Osim toga, GSH je uključen u regulaciju staničnog ciklusa, uklanjanje štetnih spojeva iz stanice, održavanje imunološkog sustava i regeneraciju drugih antioksidanasa kao što su vitamini C i E (Meister, 1992). Snižena koncentracija GSH u organizmu povezana je s povećanim rizikom od kroničnih bolesti, starenjem i smanjenom sposobnošću detoksikacije endogenih spojeva i ksenobiotika (Giustarini i sur., 2005; Holland i sur., 2011).

1.2.4. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza je široko rasprostranjena obitelj enzima koja učinkovito oksidacijom uklanja superoksidne radikale. SOD katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u vodikov peroksid i molekularni kisik (Zelko i sur., 2002).

SOD mogu u aktivnom mjestu sadržavati bakar (Cu), mangan (Mn), cink (Zn) i druge metalne ione. Mjesto vezanja metala nalazi se između dvije domene SOD, a bočni lanci uključuju aspartat, histamin i histidin. Metali u enzimu služe kao kofaktori u ciklusima oksidacije/redukcije te imaju tendenciju donirati elektrone $O_2^{\cdot-}$ i regenerirati se tijekom katalitičkog mehanizma. Na taj način omogućuju enzimu maksimalnu katalitičku aktivnost prilikom metaboliziranja toksičnih intermedijera superoksidnih radikala (Paksi i sur., 2008).

Obitelj enzima SOD kod eukariota obuhvaća tri klase ovisno o vezanim metalima i staničnoj lokalizaciji:

SOD1 je bakar-cink superoksid dismutaza (Cu/ZnSOD). To je homodimer prisutan praktički ubikvitarno unutar stanice (u citoplazmi, uz membrane te u jezgri, lizosomima i peroksiomima). Enzimska aktivnost SOD1 ovisi o prisutnosti Cu^{2+} i Zn^{2+} . Cink je uključen u održavanje strukture i stabilnosti SOD1 te nema katalitičku aktivnost. Bakar je potreban za enzimsku aktivnost uklanjanja $O_2^{\cdot-}$ te ne može biti zamijenjen drugim metalom, dok se cink može zamijeniti kobaltom i bakrom (Zelko i sur. 2002). Prekomjerna ekspresija SOD1 povezuje se s raznim oblicima malignih oboljenja poput karcinoma dojke, karcinoma pluća ne-malih stanica ili nazofaringealnim karcinomom te korelira s progresijom bolesti i lošom prognozom (Xu i sur., 2022).

SOD2 je mitohondrijski enzim koji sadrži mangan (Mn -SOD) i sastavom je homotetramer od 96 kDa, a prisutan je u mitohondrijskom matriksu. Mangan je povezan s katalitičkom aktivnošću enzima. SOD2 se sintetizira u citoplazmi i prenosi u mitohondrij preko signalnih peptida, čija koncentracija ovisi o kisiku. SOD2, kao i SOD1 prevodi unutarstanični superoksidni radikal u vodikov peroksid i vodu. Nalazi se u mitohondrijima svih stanica osim eritrocita, a njegova molekularna masa varira ovisno o distribuciji i izvoru (Zheng i sur., 2023). Većina ROS se stvara kroz transportni lanac elektrona u mitohondriju, stoga se smještaj SOD2 u mitohondriju smatra idealnim. Brojna istraživanja potvrdila su važnu ulogu SOD2 u nastanku tumora pri čemu može djelovati kao tumor supresor, ali i kao onkogen (Kim i sur., 2017).

EC-SOD ili SOD3 je izvanstanična superoksid dismutaza. SOD3 s $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ kao pomoćnom grupom metala koje se nalaze na aktivnom mjestu enzima pripada grupi Cu/Zn superoksid dismutaza. Nalazi se u krvi, limfi, sinovijalnoj tekućini te ostalim tkivima. SOD3 je homodimer sa 135 kDa koji se sastoji od dvije disulfidno vezane podjedinice. Uklanja ROS koji se nalaze u organizmu na način da pretvara izvanstanični superoksidni radikal u vodikov peroksid i vodu (Jung i sur., 2011). U tumorskom tkivu SOD3 može biti prisutan u visokim ili niskim koncentracijama. Niska koncentracija SOD3 vodi prema boljoj osjetljivosti na kemoterapiju kod bolesnika s karcinomom pluća, dok povišene koncentracije SOD3 mogu potaknuti imunološki odgovor što je usko povezano s mehanizmima imunoterapije (Zhang i sur., 2022).

1.2.5. Uloga oksidacijskog stresa u tumorigenezi i metilacijskim DNA procesima

Razvoj tumora posljedica je molekularnih promjena genetskog i/ili epigenetskog porijekla. One mogu biti potaknute nakupljanjem molekularnih promjena u DNA koje utječu na sekvencu DNA, kao što su mutacije i kromosomske promjene, ili modifikacijama koje ne mijenjaju izvornu sekvencu (epigenetske modifikacije). Takve modifikacije vode prema remodeliranju kromatina što može potaknuti ili ometati gensku ekspresiju. Postoje tri glavna mehanizma epigenetske regulacije od kojih je metilacija DNA najistraživaniji mehanizam (Moore i sur., 2013).

Promjene u metilaciji DNA koje može uzrokovati oksidacijski stres uglavnom nastaju zbog izmijenjene aktivnosti i funkcije metiltransferaza (DNMT), obitelji enzima koja katalizira proces metilacije kao i DNA demetilaza. DNMT3a i DNMT3b uspostavljaju novi metilacijski uzorak na DNA (*de novo*), dok DNMT1 održava uspostavljeni uzorak kopirajući metilacijski obrazac sa starog na novi DNA lanac. Nekoliko studija pokazalo je da oksidacijski stres

posredstvom hidrogen peroksidaze povećava aktivnost DNMT1 i njeno vezanje na promotore tumor supresorskih gena poput RUNX3 (Nishida i Kudo, 2013). Također, hidroksilni radikali mogu potaknuti sveukupnu hipometilaciju zbog njihovog utjecaja na vezanje DNMT na DNA (Franco i sur., 2008). Visoka razina oksidacijskog stresa također može promijeniti katalitički ciklus željeza te na taj način onemogućiti djelovanje DNA demetilaze iz obitelji TET što vodi prema povećanoj razini metilacije DNA (Kreuz i sur., 2016).

Osim promjena u metilaciji, više je načina na koje povišena razina slobodnih radikala može uzrokovati nestabilnost genoma i oštećenje genoma, a što za posljedicu može imati razvoj i propagaciju tumora (García-Guede i sur., 2020; Wigner i sur., 2021).

Slobodni radikali direktno oštećuju molekulu DNA pri čemu izostankom popravka mogu nastati mutacije. Najčešće oksidacijsko oštećenje DNA je oksidacijska modifikacija gvanina i nastajanje 8-OHdG. 8-OHdG sprječava vezanje DNMT na DNA što dovodi do konformacijskih promjena kromatina i utječe na metilaciju tumor supresorskih gena (García-Guede i sur., 2020). Osim toga, utvrđeno je da povišena razina slobodnih radikala može uzrokovati lomove DNA, križno povezivanje DNA, kao i DNA i proteina te aktivirati gene uključene u proliferaciju i preživljenje stanica i stimulirati stanice tumora na rast, ali i na njihovo metastaziranje (Wigner i sur., 2021).

Povišena razina oksidacijskog stresa kroz duže vrijeme može potaknuti upalu koja je patogenetski mehanizam velikog broja kroničnih kao i malignih bolesti (Reuter i sur., 2010). Pri tome oksidacijski stres može aktivirati veliki broj transkripcijskih faktora i regulirati ekspresiju preko 500 gena uključenih u poticanje, razvoj i održavanje upale, proliferacije stanica, angiogeneze, tkivne homeostaze i antiupalnih procesa. Takve promjene medijatora upale mogu kočiti apoptozu, stimulirati oštećenje molekule DNA te na taj način potaknuti rast tumora i procese metastaziranja.

1.3. UPALA

Upala je važan biološki adaptivni odgovor prirođenih obrambenih mehanizama kao i imunološkog sustava na različite štetne podražaje poput patogena, oštećenja tkiva ili toksičnih spojeva. Prema opsegu zahvaćanja, upala se dijeli na lokalnu i sistemsku upalu. Lokalna upala je ograničena na tkivo koje je zahvaćeno oštećenjem i/ili patogenom pri čemu ne nastaje širenje na susjedna tkiva i udaljene organske sustave. U klasične simptome lokalne upale ubrajaju se crvenilo, toplina, bol, oteklina i gubitak funkcije tkiva (Takeuchi i Akira, 2010). Za razliku od

lokalne upale, sistemska upala podrazumijeva pojačanje i pogoršanje upalnih procesa koji time zahvaćaju cijeli organizam.

Prema vremenskom trajanju upala se dijeli na akutnu i kroničnu. Akutna upala nastaje i razvija se unutar nekoliko sati od inicijalne ozljede odnosno zaraze, traje do nekoliko dana i prestaje procesima cijeljenja i rezolucije kad se uzrok poput patogena ili oštećenja tkiva ukloni i zahvaćeno tkivo se vrati u prethodno stanje homeostaze. Kada se ne može ukloniti uzrok, akutna upala prelazi u kroničnu.

Iako procesi upalnog odgovora ovise o prirodi i smještaju početnog podražaja, kao i očuvanosti upalnih i imunih mehanizama u tijelu, svi dijele zajedničku patofiziologiju inicijacije i razvoja: 1) receptori na površini stanica zahvaćenog tkiva prepoznaju štetni podražaj; 2) dolazi do aktivacije upalnih puteva; 3) otpuštaju se medijatori upale; 4) kemotaksija (kretanje stanica uzrokovano kemijskim podražajem i gradijentima) i njihovo nakupljanje u zahvaćenom području (Chen i sur., 2017). Pri tome važni procesi koji se događaju tijekom upale uključuju i promjene u vaskularnoj propusnosti (Chertov i sur., 2000).

1.3.1. Upala i tumorigeneza

Tkivni upalni odgovor sastoji se od barem tri glavna međuzavisna mehanizma. Prvo, tkivni makrofagi i dendritičke stanice lokalno proliferiraju i nakupljaju se u tkivu zahvaćenom oštećenjem i/ili patogenom. Aktivacijom makrofaga dolazi do otpuštanja citokina i kemokina. Citokini reguliraju stanice imunološkog sustava na lokalnoj razini dok kemokini procesom kemotaksije mobiliziraju stanice i šalju signale po cijelom tijelu. Otpuštanjem kemokina počinje migracija i nakupljanje imunoloških stanica iz koštane srži poput monocita i neutrofila (granuliranih leukocita) prema zahvaćenom tkivu. Potom dolazi do aktivacije i diferencijacije imunoloških stanica prema uputama iz tkivnog mikrookruženja (Okabe i sur., 2016) o čemu ovisi duljina trajanja, učinkovitost te način rezolucije upalnog procesa koji cijeljenjem mogu rezultirati povratkom na prethodno stanje odnosno ozdravljenjem. Ukoliko inicijalni patogeni proces postoji i dalje, upala može perzistirati i prijeći u kronični proces. Upravo to se može desiti kod tumorskih bolesti.

Jedan od pokazatelja (biomarkera) nastanka i trajanja upale je i C-reaktivni protein (CRP). To je reaktant akutne upale koji nastaje u hepatocitima te njegovu proizvodnju stimulira nekoliko citokina, osobito interleukin (IL) 6 i IL-1 beta. Povišene razine CRP-a se javljaju kod bolesnika s različitim vrstama bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, artritisa, ali i u tumora. Kod različitih tipova karcinoma bubrega, želuca, dojke, prostate, gušterače i jednjaka,

povišena razina CRP-a povezana je s lošijom prognozom razvoja bolesti (Nakamura i sur., 2012).

Postoji nekoliko mehanizama koji objašnjavaju vezu između CRP-a i tumora. Prvo, rast tumora može potaknuti prirodenu i stečenu imunost te uzrokovati tkivnu upalu i povećati razinu CRP-a (Siemes i sur., 2006). Drugo, stanice tumora mogu povećati proizvodnju upalnih proteina, čime je objašnjena povećana razina CRP-a kod bolesnika s tumorom (Nozoe i sur., 2003). Pokazano je da je povišena razina CRP-a prije liječenja prisutna kod bolesnika s tumorom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu te se općenito povezuje s nižom stopom preživljenja kod bolesnika bez znakova bolesti, ali s prisutnim tumorom visokog stupnja (Nakamura i sur., 2012).

Istraživanje Rutkowski i sur. (2002) utvrdilo je povišenu koncentraciju IL-6 u serumu kod više od 50% bolesnika sa STS te je ona korelirala s veličinom i stupnjem tumora. Cirkulirajući IL-6 koji može biti i nezavisni prognostički faktor razvoja bolesti, tada stimulira proizvodnju CRP-a u hepatocitima (Rutkowski i sur., 2002). Upala stoga može biti prognostički faktor i za bolesnike sa STS. Nedavno objavljena meta-analiza koja je analizirala rezultate 9 znanstvenih članaka (ukupno 1655 bolesnika sa sarkomom), zaključila je da povišena razina CRP-a u serumu upućuje na lošiju prognozu bolesnika sa sarkomom (Wang i sur., 2019).

1.4. EPIGENETIKA

Epigenetika je grana znanosti koja proučava mitotičke i mejotičke nasljedne promjene u funkciji gena, koje se ne mogu objasniti promjenama u DNA sekvenci, a mijenjaju ekspresiju pojedinih gena i posljedično fenotip. Glavni epigenetski mehanizmi su metilacija DNA, modifikacija histona procesima acetilacije i deacetilacija histona te RNA interferencija. Svi oni djeluju zajedno kao jedinstven sustav u regulaciji ekspresije gena (Strachan i sur., 2014).

Najistraživaniji epigenetski proces je DNA metilacija kojeg katalizira obitelj enzima metiltransferaza DNMT dodavanjem metilne skupine na peti ugljikov atom citozina, a donor metilne skupine je univerzalni stanični metil donor S-adenozil metionin (SAM). Tim dodavanjem se mijenja funkcija DNA. Dva tipa DNMT-a su uključena u *de novo* metilaciju DNA za vrijeme razvoja organizma odnosno diferencijacije stanica tijekom embriogeneze DNMT3A i DNMT3B. DNMT1 je pak odgovoran za očuvanje uspostavljenog metilacijskog uzorka na način da ga prenosi na nove replicirajuće lance. Jedan enzim DNMT koji nema katalitičko mjesto veže se s *de novo* DNMT kako bi bio uključen u remodeliranje kromatinskih

kompleksa. Metilacijski uzorak DNA je odgovoran za diferencijaciju stanica te njegova deregulacija dovodi do razvoja mnogih bolesti, uključujući i tumore (Zampieri i sur., 2015).

DNA metilacija je važna za normalan razvoj i povezana je s mnogim ključnim procesima uključujući genomski utisak (engl. *genomic imprinting*), inaktivaciju X kromosoma, represiju repetitivnih elemenata, reguliranje tkivno specifične genske ekspresije, starenje i tumorigenezu (Moore i sur., 2013).

Najveći dio DNA metilacije događa se na nukleotidima citozina koji prethode gvaninu odnosno onih koji su sastavni dio CG dinukleotida, a ako su prisutni u više od 55% ukupnog broja nukleotida nazivaju se CpG otocima. Iako se citozin-gvanin (CpG) otoci nalaze posvuda u ljudskom genomu, njih oko 70% prisutni su u područjima 5' kraja ljudskih gena odnosno promotorskim regijama gena i ovisno o stanju metiliranosti imaju važnu ulogu kao regulatori genske transkripcije (Saxonov i sur., 2006). Primjerice, „*housekeeping*“ geni zaduženi za osnovno funkcioniranje stanice, u promotorskoj regiji imaju veliki broj CpG otoka koji su uglavnom nemetilirani i čiji je redoslijed evolucijski konzerviran kod velikog broja sisavaca (Illingworth i sur., 2010).

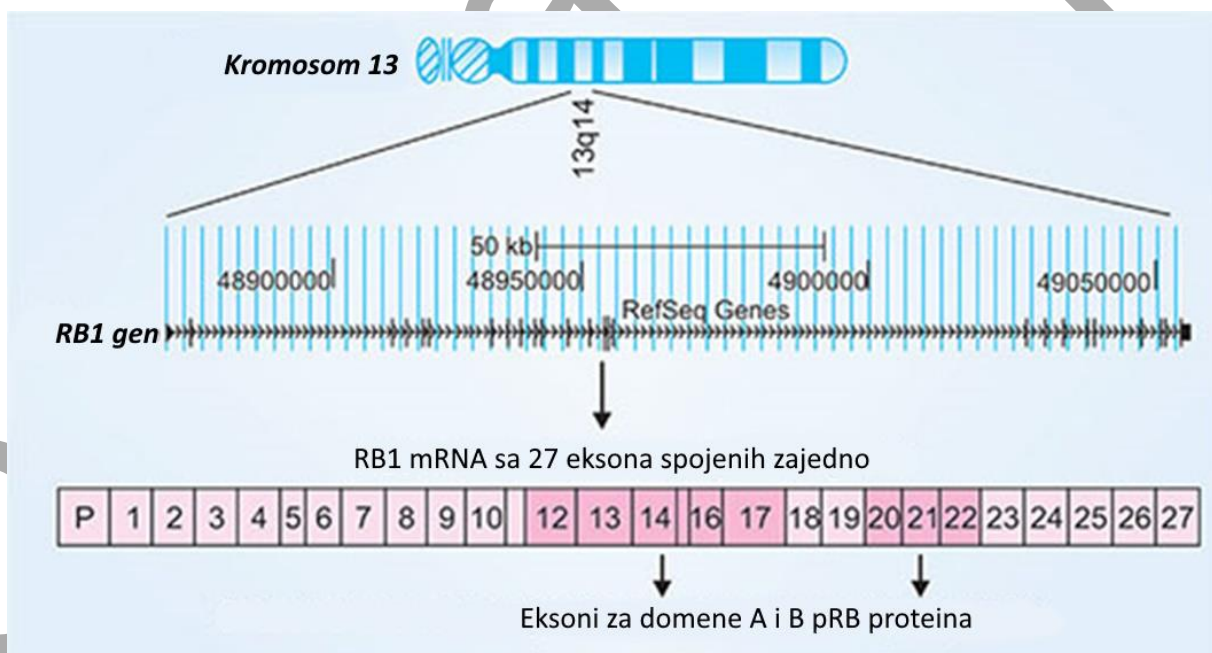
Metilacijom CpG otoka geni se utišavaju (Mohn i sur., 2008). Za vrijeme gametogeneze i ranog embrionalnog razvoja, u CpG otocima dolazi do najintenzivnijih promjena u metilaciji (Kantor i sur., 2004). Mogućnost regulacije genske ekspresije kroz metilaciju CpG otoka osobito je važna kod genomskog utiska (Wutz i sur., 1997). Utisnuti geni ekspimiraju se sa samo jednog kromosoma, odnosno aktivnost gena ovisi o roditeljskom porijeklu kromosoma na kojem se nalazi. Kod takve monoalelne ekspresije koja se nalazi u funkcionalno haploidnom stanju dovoljna je samo jedna mutacija ili epimutacija koja može dovesti do patoloških stanja. Kada se promjena dogodi u ranoj fazi razvoja nastaju razvojni poremećaji, primjerice sindrom Angelman/ Prader-Villi (Kantor i sur., 2004). Kada se promjene u utisnutim regijama dogode kasnije u životu, manifestiraju se kao tumori.

Danas se smatra da su epigenetske promjene (uključujući deacetilaciju histona i metilaciju DNA) odgovorne za nastanak i razvoj malignih promjena barem u jednakoj mjeri kao i mutacije. Ukupna genomska hipometilacija ili hipometilacija/hipermetilacija određenih lokusa povezuje se s razvojem tumora (Starzer i sur., 2021). Promjena u metilaciji može aktivirati onkogene, deaktivirati tumor supresorske gene, što je povezano i s kromosomskom nestabilnošću te pridonosi tumorigenezi (Li i sur., 2020). Hipermetilacija CpG dinukleotida unutar promotorske regije također može dovesti do utišavanja gena i razvoja tumora (Sakai i sur., 1991). Posljednjih desetljeća istraživanja karcinoma na molekularno-genetičkoj razini uključuju i analize DNA metilacije, najčešće u tumorskom tkivu i slobodnim cirkulirajućim

tumorskim stanicama u plazmi. Također, raste i broj istraživanja koja povezuju promjene metilacije u molekuli DNA izdvojene iz limfocita s karcinomima različitih sijela, poput crijeva, mjehura, želuca, dojke te karcinomom glave i vrata (Dunnet i sur., 2022).

1.5. GEN *RB1*

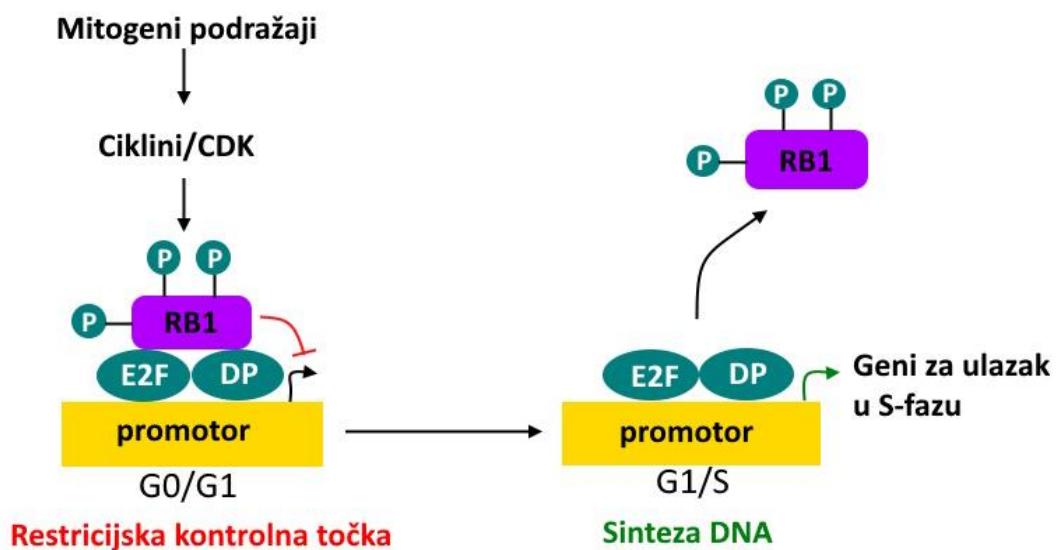
Gen *RB1* (retinoblastomski gen ili transkripcijski korepresor 1) nalazi se na kromosomu 13 u regiji 13q14.2. Veličine je 183 kb genomske DNA te se sastoji od 27 eksona, 26 introna, promotorske (CpG106) i utisnute (engl. *imprinting*) regije (CpG85) (Slika 5). On je prvi opisani tumorski onkosupresor. *RB1* gen kodira retinoblastomski protein (pRB) koji se sastoji od 928 aminokiselina i nalazi se u svim staničnim jezgrama u organizmu. pRB ima važnu regulatornu ulogu u napretku G1 faze prema S fazi staničnog ciklusa. Protein pRB strukturno sadrži domene "džepa" koje su ključne za njegovu funkciju te njihove mutacije mogu uzrokovati inaktivaciju proteina pRB (Slika 5) (Ramasubramanian i sur., 2012; Pillozzi i sur., 2021).



Slika 5. Shematski prikaz kromosomske lokacije i strukture gena *RB1*. Gen *RB1* nalazi se u kromosomskoj regiji 13q14 i veličine je 183 kb genomske DNA, sastoji se od 27 eksona koji kodiraju protein pRB s 928 aminokiselina. Posebno su označeni eksoni koji kodiraju domene "džepa" A i B za koje se vežu E2F i DP transkripcijski faktori (preuzeto i prilagođeno od Ramasubramanian i sur., 2012).

Regulatorna aktivnost pRB ispoljava se u tome što veže i na taj način inhibira E2F i DP transkripcijske faktore koji reguliraju gene uključene u ulazak stanice u S fazu staničnog ciklusa (engl. *checkpoint*). Protein pRB može biti u tri oblika: nefosforiliranom, hipofosforiliranom i

hiperfosforiliranom. Hipofosforilacija pRB proteina se odvija za vrijeme G0/G1 faze staničnog ciklusa, pri čemu se fosforiliraju regije domene "džepa" i na taj se način inaktiviraju E2F/DP kromatin remodelirajući kompleksi koji omogućuju i aktiviraju gene koji sudjeluju u procesu ulaska stanice u S fazu staničnog ciklusa (Friend i sur., 1986). Hiperfosforilirana forma (14 fosforilacijskih mjesta) uvjetovana mitogenim stimulansima koji protein kinaze ovisne o ciklinu (CDK4) potiču na fosforilaciju, predstavlja inaktivnu formu pRB proteina koja otpušta E2F/DP transkripcijske faktore i omogućuje transkripciju i aktivaciju gena za faktore rasta nužne za nastavak staničnog ciklusa i diobu (kasna G i S faza) (**Slika 6**) (Friend i sur., 1986).



Slika 6. Pojednostavljeni model funkcije pRB koji pripada obitelji proteina s domenom "džepa" (engl. *pocket protein family*). pRB protein je hipofosforiliran za vrijeme G0/G1 faze staničnog ciklusa i za to vrijeme je u interakciji sa E2F/DP transkripcijskim faktorima koji u tom stadiju interakcije inhibiraju gensku ekspresiju gena uključenih u ulazak stanice u S fazu staničnog ciklusa. Mitogenim stimulansom CDK4 kinaze fosforiliraju pRB pri čemu dolazi do otpuštanja E2F/DP transkripcijskih faktora nakon čega se nastavlja ciklus prema S fazi staničnog ciklusa (preuzeto i prilagođeno od Ramasubramanian i sur., 2012).

Različite vrste konstitucijskih i stečenih mutacija koje se povezuju s genom *RB1* poput delecija, insercija i točkastih mutacija mogu utjecati na fenotipsku ekspresiju gena *RB1* te se povezuju s nastankom retinoblastoma kod djece kao i drugih tumora, uključivo sarkome (Dries i sur., 2003). Balansirane i nebalansirane translokacije koje su povezane s drugim kromosomima također mogu poremetiti kodirajuće sekvence gena *RB1* (Dries i sur., 2003). Inaktivacija proteina pRB uzrokovana mutacijama *RB1* gena i epigenetskim mehanizmima dovodi do nekontroliranog umnažanja stanice i tumorigeneze (Ramasubramanian i sur., 2012).

Nasljedni retinoblastom nastaje kao posljedica mutacija gena *RBI* s visokom penetrantnošću, a nasljeđuje se autosomno dominantno. Otprilike 80 do 90% nositelja mutacija razviju tumor oka (retinoblastom) (Bonaïti-Pellié i sur., 1981). Patogeneza retinoblastoma povezana je s mutacijskom inaktivacijom oba alela gena *RBI*. U nasljednom obliku mutacija gena *RBI* prisutna je na jednom alelu u svim stanicama, dok se na drugom alelu javlja kasnija stečena mutacija u stanicama mrežnice dovodeći do razvoja tumora (Knudson, 1996).

Osobe s dijagnozom nasljednog retinoblastoma imaju visok rizik za razvoj novih oblika tumora poput osteosarkoma i STS-a (Chaussade i sur., 2019). Otprilike 8% slučajeva s nasljednim retinoblastomom u kasnijoj dobi razviju sarkom, najčešće histološki tip LMS (Kleinerman i sur., 2007). Uzrok tome najčešće je genetička sklonost (mutacije gena *RBI*), ali i citotoksična terapija retinoblastoma kemoterapijom i zračenjem (Kleinerman i sur., 2007). Zabilježeno je da se zbog visokih akumulativnih doza kemoterapije za liječenje retinoblastoma osteosarkomi javljaju u 25-30% slučajeva kao sekundarni tumori kod osoba s nasljednim retinoblastomom. Drugi histološki podtipovi koji se najčešće javljaju u spomenutoj populaciji su hondrosarkom i Ewingov sarkom i to u razmaku od 10 do 50 godina nakon dijagnoze nasljednog retinoblastoma. U istraživanju Hu i sur. (2021) koje se zasnivalo na analizi povezanosti patoloških varijanti gena s razvojem STS-a, utvrđena je povezanost gena *RBI* s nastankom STS, osobito s LMS i SS podtipovima sarkoma. Osim toga, baza podataka '*The Cancer Genome Atlas*' koja obuhvaća i sekvencirane genome sarkoma pokazuje da se u tumorskom tkivu sarkoma vrlo često mogu detektirati stečene promjene gena *RBI* (Tsuyoshi i Yoshida, 2018).

1.5.1. Metilacijska mjesta gena *RBI*

Gen *RBI* sadrži dva metilacijski aktivna mjesta, promotorsku (CpG106) i genomski utisnutu (CpG85) regiju (Surani i sur., 1984). Genomsko utiskivanje je epigenetska pojava koja utječe na gensku ekspresiju, a nastaje zbog specifične metilacije alela koja je uvjetovana roditeljskim porijeklom kromosoma (Kanber i sur., 2009). U tjelesnim stanicama diploidnih organizama postoje dvije kopije genoma, jedan je naslijeđen od oca, drugi od majke. Geni u tjelesnim stanicama dolaze u paru (aleli) pri čemu se kod genomskog utiskivanja eksprimira samo jedan gen ovisno o tome od kojeg je roditelja naslijeđen. Navedena pojava uspostavlja se za vrijeme gametogeneze i održava se dalje kroz mitotsko dijeljenje somatskih stanica. Kod ljudi je do danas otkriveno najmanje 80 gena s mehanizmom genomskog utiskivanja, a za neke od njih je poznato da reguliraju staničnu proliferaciju i rast fetusa (Peters, 2014). Geni mogu biti i parcijalno genomski utisnuti. Tada se aleli smanjeno ili povećano ekspimiraju u različitim

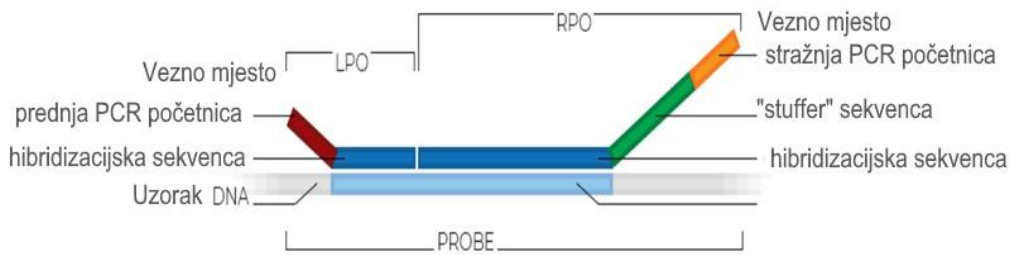
stanicama, za razliku od potpune ekspresije ili potpune supresije jednog od roditeljski naslijeđenog alela u svim stanicama (Morcos i sur., 2011).

CpG otok veličine 1.2 kb na intronu 2 gena *RBI* (CpG85) nalazi se između eksona 2 i eksona 3 i metiliran je na kromosomu majčinog porijekla te djeluje kao slabi promotor alternativnog *RBI* transkripta koji se nalazi na očevom kromosomu. Utišavanje navedene komponente ukazuje na jaku evolucijsku selekciju majčinske inhibicije stanične proliferacije (Kanber i sur., 2009). Također, smatra se da bi kompletno monoalelno utišavanje gena *RBI* dovelo do povećanog rizika za nastanak retinoblastoma. Podaci o utjecaju roditeljskog porijekla mutacija gena *RBI* na fenotip povezane su s različitom penetrantnošću i dobi pojave bolesti kod retinoblastoma. Somatske mutacije alela očevog porijekla povezuju sa sporadičnim nastankom osteosarkoma (Toguchida i sur., 1989; Schüller i sur., 2005).

1.5.2. Metilacijsko specifična metoda višestrukog umnažanja vezanih proba (MS – MLPA)

Metilacijsko specifična metoda višestrukog umnažanja vezanih proba (engl. *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MS-MLPA), prvi puta je opisana 2002. godine te se pokazala pouzdanom metodom za metilacijsko profiliranje promotora i kvantifikaciju promjena broja kopija ciljanih sekvenci DNA. MS-MLPA je metoda koja se temelji na umnažanju probe, a ne DNA uzorka na način koji omogućuje istovremenu hibridizaciju do 60 MLPA proba. Umnažanje probe ovisi isključivo o hibridizaciji probe, odnosno o komplementarnosti probe s uzorkom u svim nukleotidima.

Općenito, MS-MLPA probe se sastoje od dva dijela, lijevog (LPO) i desnog oligonukleotida (RPO), koji sadrže ciljane sekvence za vezanje na DNA komplement i par početnica jedinstvenih za sve probe. Početnica na LPO je fluorescentno obojena zbog vizualizacije amplikona tijekom fragmentarnog odvajanja kapilarnom elektroforezom. RPO, osim navedenog, sadrži i „*stuffer*“ sekvencu varijabilne dužine (19 do 370 nukleotida) koja se ne veže na DNA uzorka te daje probi specifičnu dužinu i na taj način omogućava prepoznavanje te istovremenu hibridizaciju više različitih MLPA proba (Slika 7).

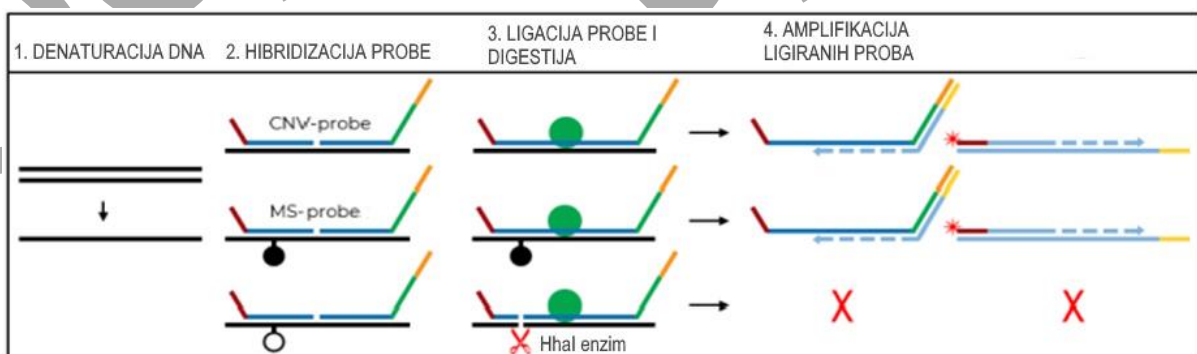


Slika 7. Dizajn MLPA probe (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa>)

Setovi proba MS-MLPA sadrže i metilacijsko-specifične probe, dizajnirane da se ciljano vežu za DNA sekvence koje sadrže restriksijsko mjesto za HhaI, enzim čije je digestijsko djelovanje ovisno o metilaciji ciljane sekvence DNA.

Ukoliko postoji komplementarnost MLPA proba s uzorkom u svim nukleotidima moguća je hibridizacija probe na DNA uzorka, nakon čega slijedi ligacija dva dijela probe termostabilnim enzimom (Ligase-65), što omogućuje umnažanje MLPA proba i na kraju njihovu kvantifikaciju. Uz promjene u broju kopija, metodom MS-MLPA moguće je i kvantitativno odrediti metilacijski status. Nakon hibridizacije proba, MS-MLPA reakcija se dijeli na dva dijela. U prvom se određuju promjene u broju kopija te uključuje ligaciju hibridiziranih proba te njihovo umnažanje i kvantifikaciju.

U drugoj reakciji, nakon hibridizacije i ligacije proba, djelovanjem HhaI enzima dolazi do digestije proba s restriksijskim mjestom, ukoliko se proba veže na nemetiliranu sekvencu. Na taj način se mjeri metilacijski status ciljane sekvence DNA (**Slika 8**).



Slika 8. Prikaz MS MLPA reakcije (preuzeto i prilagođeno iz <https://www.mrcholland.com/technology/mlpa>)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. utvrditi promjene u broju kopija i metilacijskom statusu gena *RB1* u DNA leukocita periferne krvi te ih povezati s tumorskim opterećenjem bolesnika sa sarkomom prije terapije
2. utvrditi razinu oksidacijskog stresa i upale u perifernoj krvi te ih povezati s tumorskim opterećenjem bolesnika sa sarkomom prije terapije
3. utvrditi učinak terapije antraciklinima na metilacijski status gena *RB1* u bolesnika sa sarkomom
4. utvrditi učinak terapije antraciklinima na oksidacijski stres i upalu u bolesnika sa sarkomom

Hipoteze istraživanja:

- promjene u broju kopija i metilacijskom statusu gena *RB1* te razina oksidacijskog stresa i upale u bolesnika sa sarkomom prije terapije antraciklinima će biti ovisne o tumorskom opterećenju organizma
- kemoterapija antraciklinima utjecat će na metilacijski status gena *RB1* i na razinu oksidacijskog stresa i upale

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

U istraživanje su uključeni bolesnici koji su u periodu od studenog 2021. godine do svibnja 2023. godine zbog dijagnostičke obrade i liječenja kemoterapijom antraciklinima zaprimljeni na Kliniku za onkologiju, KBC Zagreb. U istraživanju je sudjelovao ukupno 51 bolesnik s dijagnosticiranim STS ili osteosarkomom.

Prije početka istraživanja za sakupljanje i analizu uzoraka periferne krvi pribavljena je potvrda Etičkog povjerenstva KBC Zagreb No 8.1-22/125-4 02/013 AG. Bolesnici su dobrovoljno sudjelovali u ovom istraživanju, nakon potpisivanja informativnog pristanka. Na početku istraživanja, a nakon potpisivanja informiranog pristanka, prikupljeni su osnovni podaci o ispitanicima (dob, spol, dijagnoza/karakteristika tumora i terapija).

Kriteriji za uključivanje u istraživanje bili su: bolesnik stariji od 18 godina, kliničko-patohistološka dijagnoza sarkoma i indikacija za liječenje kemoterapijom antraciklinima (monoterapija ili polikemoterapija). U istraživanje nisu uključeni: bolesnici koji su prethodno kemoterapijski liječeni zbog sarkoma ili drugog malignog oboljenja, bolesnici s infektivnom upalom i drugim kontraindicirajućim medicinskim ili psihijatrijskim stanjem.

Dijagnoza bolesnika se zasnivala na kliničkom pregledu te radiološkom i patohistološkom nalazu. Za procjenu uznapredovalosti bolesti i praćenje bolesnika koristile su se kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonancija (MR). Na osnovu podataka o zahvaćenosti regija organizma tumorom prije kemoterapije (na početku istraživanja) bolesnici su grupirani u tri grupe ovisno o tumorskom opterećenju: (1) tumorsko tkivo nije detektabilno (operacijski je uklonjeno); (2) primarno tumorsko tkivo < 7 cm i/ili metastaze na jednom organu; (3) primarno tumorsko tkivo > 7 cm i/ili metastaze na dva ili više organa (**tablica 2**).

Tablica 2. Podjela prema tumorskom opterećenju

Tumorsko opterećenje	Zahvaćenost regija
1	tumorsko tkivo nije detektabilno (operacijski je uklonjeno)
2	primarno tumorsko tkivo < 7 cm i/ili metastaze na jednom organu
3	primarno tumorsko tkivo > 7 cm i/ili metastaze na dva ili više organa

Protokol kemoterapije za sve bolesnike određen je odlukom Multidisciplinarnog tima KBC Zagreb za liječenje sarkoma sukladno međunarodnom smjernicama za liječenje sarkoma i principu dobre kliničke prakse. U prosjeku, pacijenti su primili 3-5 ciklusa kemoterapije s antraciklinima (monoterapija ili polikemoterapija) sukladno onkološkom protokolu liječenja. Uzorci periferne krvi bolesnika sakupili su se prije početka kemoterapije s antraciklinima te 25. dana (+/- 1 dan) nakon zadnjeg ciklusa kemoterapije. Naime, utvrđeno je da je 25 dana po završetku kemoterapije lijek u potpunosti izlučen iz organizma i nema njegovog izravnog kemijskog učinka (Methaneethorn i sur., 2023; LactMed, 2024). Stoga je uzorak krvi nakon terapije s antraciklinima sakupljen 25. dan (+/- 1 dan) nakon zadnjeg ciklusa. Uz rutinsko uzimanje uzoraka periferne krvi u svrhu praćenja bolesnika, prikupljene su još dvije dodatne epruvete pune krvi s EDTA kao antikoagulansom (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, SAD). Jedna je epruveta odmah centrifugirana te je plazma odvojena i pohranjena na -80 °C do biokemijskih analiza. Druga epruveta pune krvi je pohranjena na 4 °C do postupka izdvajanja DNA za potrebe MS-MLPA analize.

3.2. METODE

3.2.1. Metilacijsko profiliranje i kvantifikacija promjena broja kopija (CNV) unutar gena *RBI* metodom MS-MLPA

Izdvajanje DNA

Za potrebe MS-MLPA analize iz periferne krvi ispitanika izdvajana je DNA upotrebom komercijalnog seta FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Njemačka). Puna krv s EDTA antikoagulansom bila je pohranjena na 4 °C do postupka izdvajanja DNA (maksimalno 4 dana). Prema uputama proizvođača, pri sobnoj temperaturi, u epruvetu od 15 mL se dodaje 2,5 mL pufera za liziranje stanica, nakon čega se u epruvetu prebacuje 1 mL krvi i centrifugira tijekom 5 minuta na 2700 g. Supernatant se odlije, pri čemu se višak nadsloja pažljivo uklanja s upijajućom trakom filter papira. Na talog se dodaje 505 µL pufera za denaturaciju i Qiagen proteaze (za jedan uzorak se pomiješa 500 µL pufera za denaturaciju i 5 µL Qiagen proteaze) te se resuspendira na vrtložnoj miješalici. Nakon toga se sadržaj epruvete inkubira u vodenoj kupelji na 65 °C tijekom 10 minuta. Zatim se dodaje 500 µL izopropanola pri čemu se miješanjem izdvaja DNA u obliku bijele niti. Reakcijska smjesa se centrifugira tijekom 3 minute na 2700 g, supernatant se odlije te se višak nadsloja uklanja trakom filter papira. Talog

DNA se ispere s 500 μL 70% etanola te se ponavlja postupak centrifugiranja od 3 minute na 2700 g. Nadsloj se odlije, a višak tekućine sa stijenke epruvete se uklanja trakom filter papira. Zatim se na talog DNA dodaje 200 μL pufera za hidrataciju te se DNA otopi inkubacijom u vodenoj kupelji na 65 °C tijekom noći.

Mjerenje koncentracije DNA

Koncentracija DNA mjerena je Qubit 2.0 (Life Technologies Invitrogen, SAD), stolnim fluorometrom koji se koristi za mjerenje DNA, RNA i proteina. Iz vrijednosti fluorescencije, koncentracija DNA se izračunava prema zadanim parametrima u $\text{ng}/\mu\text{L}$. Prema uputama proizvođača, uređaj je potrebno kalibrirati s dva različita standarda (Qubit dsDNA standard 1 i standard 2). Standardi za kalibriranje se pripremaju na način da se u sterilnu mikroeprevetu stavi 398 μL Qubit dsDNA pufera i 2 μL Qubit dsDNA reagensa, koji se razdijeli po 190 μL u svaku od dvije pripremljene Qubit tubice. U prvu tubicu se dodaje 10 μL standarda 1, a u drugu 10 μL standarda 2. Nakon uključivanja Qubit 2.0 fluorometra odabire se opcija *Read Standards* pri čemu se umetanjem tubica prvo očitava fluorescencija standarda 1, a nakon toga standarda 2. Nakon toga, uređaj je spreman za mjerenje koncentracije dsDNA. Uzorci za mjerenje koncentracije DNA se pripremaju na način da se prvo napravi jedna radna otopina od 199 μL Qubit dsDNA pufera i 1 μL Qubit dsDNA reagensa, a volumen radne otopine ovisi o broju uzoraka DNA koji se mjere. Radna otopina se dobro izmiješa na vrtložnoj miješalici te se razdjeljuje po 197 μL u tubice za mjerenje koncentracije DNA. U svaku se tubicu dodaje 3 μL DNA, izmiješa se na vrtložnoj miješalici te se ostavi 2 minute na sobnoj temperaturi. Tubica s uzorkom za mjerenje se stavlja u aparat, potom se na zaslonu Qubit 2.0. fluorometra namjesti volumen uzorka DNA koji je dodan u radnu otopini (3 μL) i mjerna jedinica u kojoj će biti izražena koncentracija ($\text{ng}/\mu\text{L}$). Na zaslonu se ispisuje vrijednost koncentracije izračunate prema zadanim parametrima.

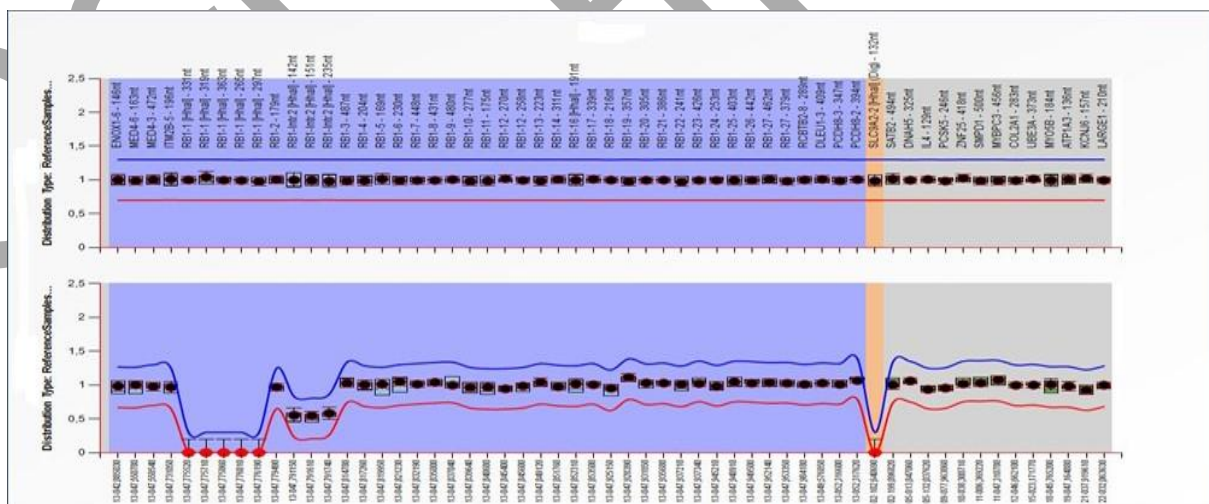
Mjerenje čistoće DNA

Čistoća izdvojene DNA iz uzorka određena je mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru (Nanodrop Lite Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, SAD). Prije određivanja čistoće DNA uzorka, izmjerena je apsorbancija pufera za hidrataciju DNA, sastavnog dijela komercijalnog seta FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Njemačka) koji je korišten prilikom izdvajanja DNA. Pufer za hidrataciju DNA ima ulogu slijepe probe. Nakon toga mjerena je apsorbancija DNA uzorka pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm. Omjer valnih duljina 260/280

nm u rasponu od 1,8 i 2,0 pokazatelj je visoke čistoće izdvojene DNA iz uzorka. Do MS-MLPA postupka izdvojena DNA je pohranjena na -20 °C.

Set proba SALSА MLPA

Metilacijsko profiliranje promotora i genetski utisnutog mjesta te kvantifikacija promjena broja kopija (CNV) unutar gena *RBI*, kod svih ispitanika (prije početka i nakon kemoterapije antraciklinima) određivana je setom proba SALSА MLPA Probemix P047 RB1 (MRC Holland, Nizozemska). Set se sastoji od 57 (MS-) MLPA proba s produktima umnažanja duljine od 129 do 500 nukleotida, uključujući 35 proba koje se ciljano vežu za eksonе *RBI* gena. Pet proba specifičnih za slijed nukleotida koji su prisutni u *RBI* promotorskoj regiji (CpG106) i tri koje pokrivaju intron 2 (CpG85) s utisnutim CpG otokom sadrže restriksijsko mjesto za HhaI enzim (Slika 9). Set proba P047 RB1 sadrži i 13 referentnih proba koje se ciljano vežu za relativno stabilne regije različitih tipova tumora te jednu digestijsku kontrolnu probu kojom se određuje uspješnost restriksijske endonukleazne digestije u reakciji. U setu se nalazi devet kontrolnih fragmenata, stvarajući produkte umnažanja od 64 do 105 nukleotida: četiri Q fragmenta za kontrolu količine DNA i uspješnost ligacije u reakciji; dva D fragmenta za kontrolu denaturacije; jedan mjerni fragment od 92 nukleotida za kontrolu kvalitete ostalih fragmenata; X i Y fragmenti specifični za spolne kromosome koji služe kao kontrola potencijalne zamjene uzoraka. SALSА MLPA set sadrži još SALSА MLPA pufer, pufer Ligase A, pufer Ligase B, enzim SALSА Ligase-65 i SALSА Polymerase te početnice SALSА PCR Primer Mix FAM.



Slika 9. Prikaz konačnog udjela proba (engl. *final probe ratio*) referentnog uzorka nakon komparativne analize za svaku probu u svakom uzorku.

Postupak MS-MLPA

MS-MLPA metoda omogućuje istovremeno određivanje metilacijskog statusa i promjene u broju kopija (CNV) analizirane regije. Za svaku pojedinu reakciju korišteno je 5 μL uzorka DNA koncentracije 150 ng/5 μL . Preporuka proizvođača (MRC Holland, Nizozemska) je 50 - 250 ng humane DNA u 5 μL uzorka. Ukoliko je koncentracija DNA bila veća od navedene, uzorak je nakon izračuna bilo potrebno razrijediti puferom TE (1X TE Buffer, Invitrogen, SAD). Svi uzorci napravljeni su u duplikatu.

Prvi korak reakcije je denaturacija, pri čemu se kod analize koriste PCR tubice volumena 0,2 mL. Uzorci se denaturiraju pri temperaturi od 98 °C kroz 5 minuta u PCR uređaju (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) te se ohlade na 25 °C. U ohlađene uzorke se dodaje 3 μL hibridizacijske smjese koja se sastoji od 1,5 μL SALSА MLPA pufera i 1,5 μL MLPA seta proba, nakon čega se uzorci inkubiraju pri 95 °C kroz 1 minutu i hibridiziraju s MLPA probama preko noći (16 do 20 sati) na 60 °C.

Nakon toga slijedi ligacija i ligacijsko-digestijska reakcija hibridiziranih proba. Uzorci se ohlade na 20 °C, izvade se iz PCR uređaja te se pri sobnoj temperaturi u svaki uzorak dodaje 3 μL pufer Ligase A i 10 μL UltraPure H₂O. Cijeli uzorak se dijeli na dva dijela tako da se 10 μL ukupnog sadržaja prebacuje iz primarne u sekundarnu PCR tubicu, koje se potom stavljaju u PCR uređaj na 48 °C. U uređaju se u primarnu tubicu dodaje 10 μL ligacijske smjese (8,25 μL UltraPure H₂O + 1,5 μL pufer Ligase B + 0,25 μL enzim Ligase-65), dok se u sekundarnu tubicu dodaje ligacijsko-digestijska smjesa (7,75 μL UltraPure H₂O + 1,5 μL pufer Ligase B + 0,25 μL enzim SALSА Ligase-65 + 0,5 μL enzim SALSА HhaI). Reakcije se odvijaju pri temperaturi od 48 °C kroz 30 minuta, nakon čega slijedi inaktivacija enzima na 98 °C kroz 5 minuta. Uzorci se potom ohlade na temperaturu od 20 °C.

Treći korak je reakcija amplifikacije MLPA proba. Za reakciju je potrebno pripremiti smjesu za umnažanje hibridiziranih proba (3,75 μL UltraPure H₂O + 1 μL SALSА PCR Primer Mix + 0,25 μL enzim SALSА Polymerase). Pri sobnoj temperaturi se u svaku tubicu dodaje 5 μL smjese, uzorci se stavljaju u PCR uređaj prema programu umnažanja opisanom u **tablici 3**.

Tablica 3. PCR program za MS-MLPA reakciju

Denaturacija DNA	
1. 98 °C	5 minuta
2. 25 °C	<i>Pauza</i>
Reakcija hibridizacije	
3. 95 °C	1 minuta
4. 60 °C	16 – 20 sati

5. 20 °C	<i>Pauza</i>
Ligacijska i ligacijsko – digestijska reakcija	
6. 48 °C	<i>Pauza</i>
7. 48 °C	30 minuta
8. 98 °C	5 minuta
9. 20 °C	<i>Pauza</i>
PCR reakcija	
10. 35 ciklusa	95 °C 30 sekundi
	60 °C 30 sekundi
	72 °C 60 sekundi
11. 72 °C	20 minuta
12. 15 °C	<i>Pauza</i>

Na kraju se uzorci pripremaju za automatiziranu elektroforezu na način da se u epruveti od 1,5 mL pripremi smjesa od 9 μ L formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, SAD) i 0,2 μ L molekularnog standarda LIZ-500 (GeneScan-500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems, SAD) za sve uzorke istovremeno. U bunarić mikrotitarske pločice odvoji se 9,2 μ L smjese te se dodaje 0,7 μ L PCR produkta. Pločica se stavi u PCR uređaj gdje se uzorci denaturiraju na temperaturi 86 °C kroz 3 minute, a potom se ohlade 2 minute na 4 °C. Nakon toga, uzorci su spremni za analizu u genetičkom analizatoru.

Analiza i interpretacija rezultata

Razdvajanje i detekcija MLPA proba provedena je na uređaju za automatiziranu kapilarnu elektroforezu (AB Genetic Analyzer 3130xl, Applied Biosystems, SAD). Uređaj sadrži 16 kapilara dužine 36 cm. Polimer (POP-7 Polymer, Applied Biosystems, SAD) služi kao medij za razdvajanje MLPA proba s FAM obilježenim početnicama, a pufer s EDTA (EDTA Running buffer 10X, Applied Biosystems, SAD) za elektroforezu.

Prikupljeni podaci elektroforeze se potom prebacuju i analiziraju u računalnom programu Coffalyser.Net, koji je dostupan na web-stranici (<https://www.mrcholland.com/technology/software/coffalyser-net>) proizvođača MRC Holland (Nizozemska).

MS-MLPA je relativna metoda koja se temelji na usporedbi podataka te je u analizu potrebno uključiti i tri referentna uzorka, kao i slijepu probu (No DNA uzorak). MLPA probe se razlikuju prema dužini PCR produkta, a intenzitet fluorescentnog signala svake probe određuje količinu umnoženih fragmenata probe. Molekularni standard GeneScan-500 LIZ dimenzionira dužinu probe, dok je za mjeru fluorescencije svake probe potrebna normalizacija podataka jer za određivanje broja kopija i metilacijskog statusa nije moguće koristiti apsolutnu fluorescenciju

dobivenu kapilarnom elektroforezom. Intenzitet fluorescentnog signala svakog uzorka normalizira se usporedbom pikova proba unutar uzorka i između uzoraka.

MS-MLPA analiza sastoji se od dva koraka, fragmentarne analize i komparativne analize uzoraka. Fragmentarna analiza sastoji se od vizualnog pregleda kvalitete razdvajanja fragmenata kapilarnom elektroforezom u usporedbi s korištenim molekularnim standardom (FRSS, engl. *fragment run separation score*), provjere količine DNA u uzorku (DNA) i uspješnosti denaturacije DNA (DD) te određivanje kvalitete izvedbe reakcije MS-MLPA (FMRS, engl. *fragment MLPA reaction score*). Početnom analizom se također utvrđuje prisutnost fragmenata spolnih kromosoma X i Y (**Slika 10**).

	sample name	sample type	bin smpl	FRSS	FMRS	probes	DNA	DD	DIG	X	Y	Pos
1	B3_Ref	reference	<input type="checkbox"/>			57/57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	B3
2	B4_Dig	digested sample	<input type="checkbox"/>			51/51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	B4
3	F3_Ref	reference	<input type="checkbox"/>			57/57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	F3
4	F4_Dig	digested sample	<input type="checkbox"/>			51/51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	F4
5	H3_NoDNA	no DNA	<input type="checkbox"/>			0/0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	H3
6	H4_NoDNA	no DNA	<input type="checkbox"/>			0/0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	H4
7	D3_Ref	reference	<input type="checkbox"/>			57/57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	D3
8	D4_Dig	digested sample	<input type="checkbox"/>			51/51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	D4
9	C3_Sam	sample	<input type="checkbox"/>			57/57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	C3
10	C4_Dig	digested sample	<input type="checkbox"/>			51/51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	C4
11	E3_Sam	sample	<input type="checkbox"/>			57/57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	E3
12	E4_Dig	digested sample	<input type="checkbox"/>			51/51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	E4
13	G3_Sam	sample	<input type="checkbox"/>			57/57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	G3
14	G4_Dig	digested sample	<input type="checkbox"/>			51/51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	G4
15	A3_Sam	sample	<input type="checkbox"/>			57/57	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A3
16	A4_Dig	digested sample	<input type="checkbox"/>			51/51	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A4

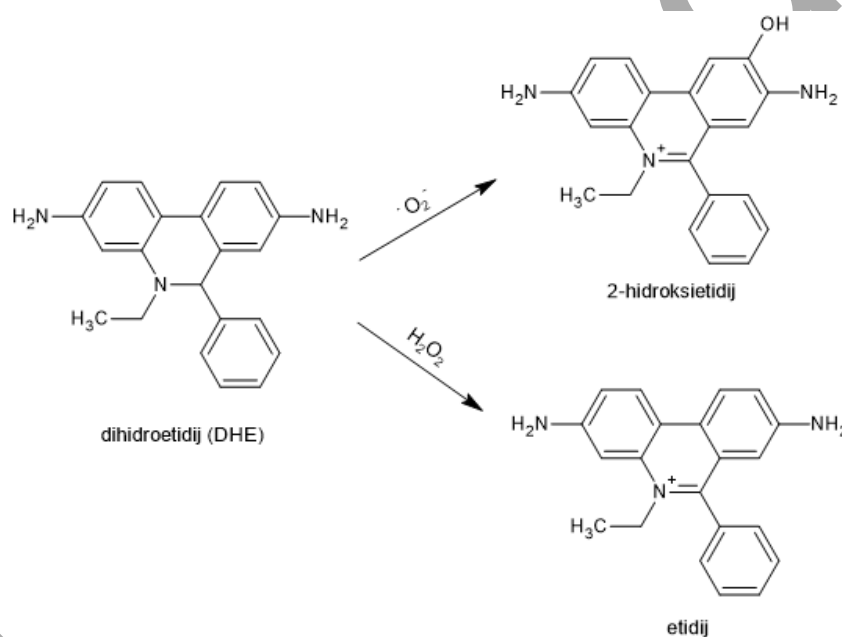
Slika 10. Pregled fragmentarne analize u računalnom programu Coffalyser.Net

Komparativnom analizom određuje se promjena u broju kopija te metilacijski status ciljanih regija genoma mjerenjem omjera relativne visine pika probe u uzorku u odnosu na onu u referentnim DNA. Na temelju intenziteta signala proba Coffalyser.Net izračunava konačni udio (engl. *final probe ratio*) za svaku probu u svakom uzorku (**Slika 9**).

3.2.2. Određivanje koncentracije ROS

Koncentracija ROS određena je upotrebom fluorescentne probe dihidroetidij. Dihidroetidij je redoks-osjetljiva difuzijska fluorescentna proba koja se koristi za detekciju superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet-}$). Superoksidni radikal iz uzorka oksidira dihidroetidij, a kao produkt nastaje 2-hidroksietidij koji fluorescira crveno (**Slika 11**). Stoga je porast crvene fluorescencije mjera razine superoksidnog radikala. Dihidroetidij specifično reagira sa superoksidnim radikalom, no mogu ga oksidirati i drugi ROS kao što je vodikov peroksid te pritom kao produkt nastaje etidij

koji također fluorescira. Podešavanjem specifičnih valnih duljina može se izmjeriti samo koncentracija superoksidnog radikala. Za mjerenje 2-hidroksietidija (odnosno superoksidnog radikala) valne duljine je potrebno namjestiti: λ eksitacija 500-530 nm i λ emisija 590-620 nm, a za mjerenje etidija (odnosno drugih ROS) valne duljine je potrebno namjestiti: λ eksitacija 480 nm i λ emisija 576 nm. Prednosti korištenja dihidroetidija za detekciju i kvantifikaciju ROS je ta što fluorescencija produkata polako opada te time omogućava široki vremenski okvir za analizu (Wojtala i sur., 2014).



Slika 11. Reakcija dihidroetidija sa superoksidnim radikalom i prijelaz u 2-hidroksietidij te reakcija dihidroetidija s vodikovim peroksidom i prijelaz u etidij.

Ova metoda određivanja ROS, prvenstveno superoksidnog radikala, temelji se na mjerenju intenziteta fluorescentnog produkta koji nastaje kada superoksidni radikal oksidira fluorescentnu probu dihidroetidij pri čemu nastaje 2-hidroksietidij. Veći intenzitet crvene fluorescencije uzorka odgovara većoj koncentraciji superoksidnog radikala. Intenzitet fluorescencije mjeri se pri uvjetima valnih duljina ekscitacije od 520 nm i emisiji od 600 nm i pri temperaturi od 22 °C (Wojtala i sur., 2014; Radić Brkanac i sur., 2015). Intenzitet fluorescencije mjeri su u crnim neprozirnim miktotitarskim pločicama s 96-bunarića. Dobiveni rezultat izražava se kao relativna jedinica fluorescencije, RFU (engl. *relative fluorescence unit*).

Priprema otopine

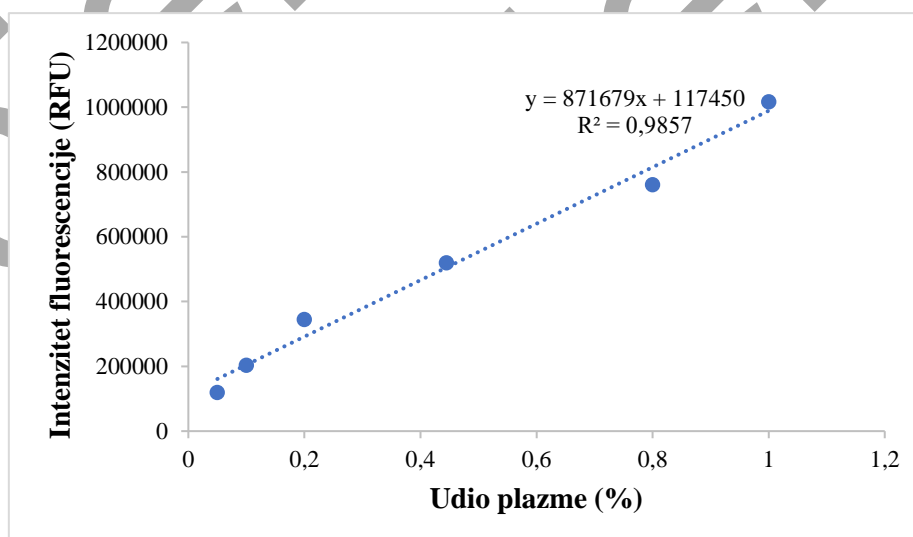
Za pripremu otopine 50 μM dihidroetidija (Sigma Chemicals, St Louis, MO, SAD) u epruvetu se stavlja 1,4 mL otopine 1 mM dihidroetidija te doda 26,6 mL deionizirane vode. Otopina se

promiješa na vrtložnoj miješalici, a epruveta omota aluminijskom folijom kako bi se reagens zaštitio od svjetlosti.

Za ispitivanje linearnosti metode pribavljen je jedan kontrolni (pool) uzorak ljudske plazme. Uzorak ljudske plazme prvo je centrifugiran (7000 g, 10 minuta) te su pripravljena razrjeđenja uzorka plazme s fiziološkom otopinom što predstavlja padajuću koncentraciju mjenog superoksidnog radikala. Priprema razrjeđenja uzorka plazme prikazana je **tablicom 4**. Potom su uzorci razrijeđene plazme pripremljeni prema opisanom protokolu te im je izmjerena koncentracija ROS. Iz dobivenog baždarnog pravca vidljivo je da je metoda linearna te se može koristiti za mjerenje koncentracije ROS u plazmi (**Slika 12**).

Tablica 4. Postupak pripreme koncentracijskog niza uzorka plazme za ispitivanje linearnosti metode

Ukupno razrjeđenje	Plazma (μL)	Fiziološka otopina (μL)	Udio plazme u otopini
0 x	200	0	1,00
1,25 x	160	40	0,80
2,25 x	100	125	0,44
5 x	40	160	0,20
10 x	20	180	0,10
20 x	10	190	0,05



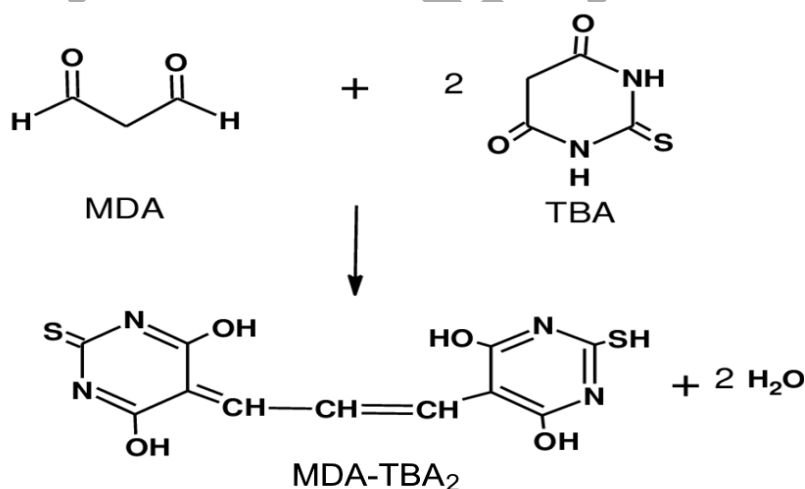
Slika 12. Baždarni pravac ovisnosti udjela plazme u uzorku i odgovora detektora (intenzitet fluorescencije).

Postupak mjerenja ROS

Nakon odležavanja, uzorci plazme su prvo centrifugirani (7000 g, 10 minuta) kako bi se uklonile moguće interferencije. Potom je plazma razrijeđena 1:1 (80 μ L plazme + 80 μ L fiziološke otopine) kako bi izmjerena vrijednost bila u ispitanom linearnom području. 50 μ L uzorka razrijeđene plazme stavlja se u tri replike (u tri bunarića) crne neprozirne mikrotitarske pločice s 96-bunarića. Na mikrotitarsku pločicu se u tri replike stavlja i slijepa proba (50 μ L destilirane vode). U svaki uzorak i slijepu probu potom se doda 50 μ L fluorescentne sonde dihidroetidij u koncentraciji 50 μ M. Kako bi u svim bunarićima krenula reakcija istovremeno, dihidroetidij je dodavan višekanalnom automatskom pipetom. Fluorescencija je izmjerena odmah nakon stavljanja mikrotitarske pločice u čitač pločica. Čitač pločica je podešen na λ ekscitacija: 520 nm i λ emisija: 600 nm, 20 bljeskova (engl. *flash*) i čitanje s gornje strane. Za mjerenja korišten je čitač pločica (Spectra i3x, Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

3.2.3. Određivanje koncentracije MDA

Koncentracija MDA kao biomarkera lipidne peroksidacije u plazmi određena je u reakciji s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA). U uvjetima niskog pH i povišene temperature, molekula MDA stupa u reakciju s TBA dajući kromogeni produkt. Reakcija se odvija u omjeru 1:2 (MDA : TBA) te pritom nastaje adukt MDA-(TBA)₂ koji je crvene boje (Slika 13) (Del Rio i sur., 2005; Domijan i sur., 2015). Intenzitet obojenja nastalog kompleksa koji odgovara koncentraciji MDA mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 532 nm s obzirom da na toj valnoj duljini postiže maksimum apsorpcije.



Slika 13. Reakcija između MDA i TBA uz nastanak crvenog adukta MDA-(TBA)₂.

Priprema otopina

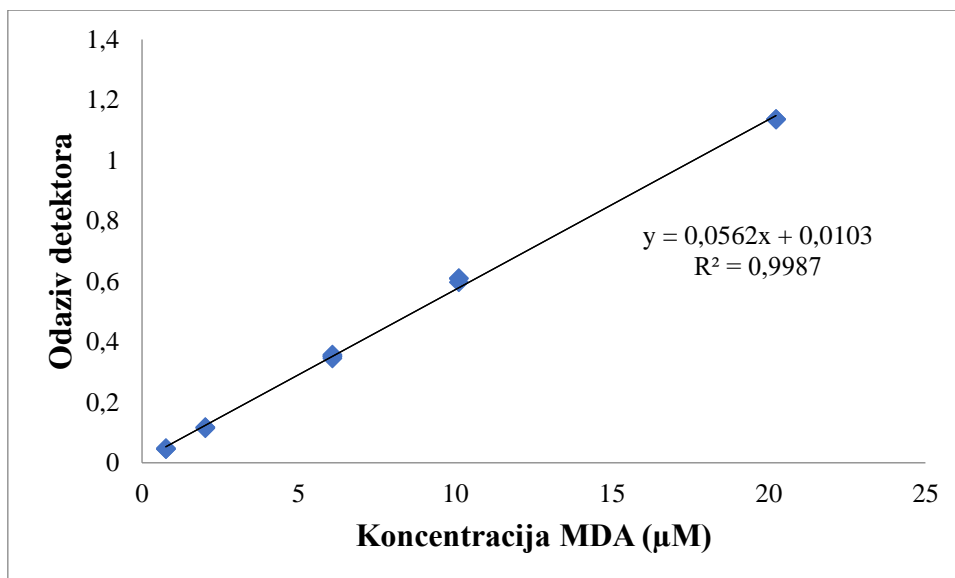
Prvo je pripremljena 0,6% otopina TBA. Za to je bilo potrebno odvagati 0,6 g TBA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, SAD), a odvaga je potom otopljena u 100 mL destilirane vode. S obzirom da se TBA teško otapa, otapanje se vršilo uz blago zagrijavanje na grijaču/mješalici. Dobivena otopina je korištena kao kromogeni reagens za reakciju s MDA. Potom je pripremljena 1 % otopina H_3PO_4 iz 85 % o- H_3PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Za to je uzeto 1,18 mL 85 % o- H_3PO_4 te je razrijeđeno u odmjernoj tikvici nadopunjavanjem do 100 mL s destiliranom vodom. Dobivena otopina je korištena u svrhu postizanja kiselih uvjeta u reakcijskoj smjesi.

Kako bi se odredila nepoznata koncentracija MDA u plazmi bilo je potrebno pripremiti standarde MDA poznate koncentracije. Kao standard MDA korišten je 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma Chemicals, St Louis, MO, SAD) koji hidrolizom daje MDA. Prvo je pripremljena osnovna matična otopina MDA iz komercijalno pribavljene otopine 1,1,3,3-tetraetoksipropan koncentracije 6,07 M. Potom je 25 μ L otopine koncentracije 6,07 M prebačeno u odmjernu tikvicu od 50 mL te je nadopunjeno destiliranom vodom. Dobivena je osnovna matična otopina koncentracije 3,035 M uz razrjeđenje od 2000x. U svrhu izrade baždarnog pravca pripremljen je niz standardnih otopina određenih koncentracija MDA razrjeđivanjem osnovne matične otopine. Izrada standardnih otopina MDA prikazana je **tablicom 5**.

Tablica 5. Koncentracije i priprema standardnih otopina MDA

Standardne otopine MDA (μ M)	Postupak pripreme standarda	Razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu
20,23	0,333 mL matične otopine se nadopuni destiliranom vodom do 50 mL	150 x
10,11	0,167 mL matične otopine se nadopuni destiliranom vodom do 50 mL	300 x
6,07	0,1 mL matične otopine se nadopuni destiliranom vodom do 50 mL	500 x
2,02	66,5 μ L matične otopine se nadopuni destiliranom vodom do 100 mL	1500 x
0,76	25 μ L matične otopine se nadopuni destiliranom vodom do 100 mL	4000 x

Standardne otopine MDA su potom pripremljene kako je opisano u postupku za pripremu uzoraka za određivanje koncentracije MDA. Dobiven je baždarni pravac (**Slika 14**) iz kojega je vidljivo da je metoda linearna te da se može koristiti za određivanje MDA u ljudskoj plazmi.



Slika 14. Baždarni pravac ovisnosti koncentracije standarda MDA i odaziva detektora.

Postupak mjerenja koncentracije MDA

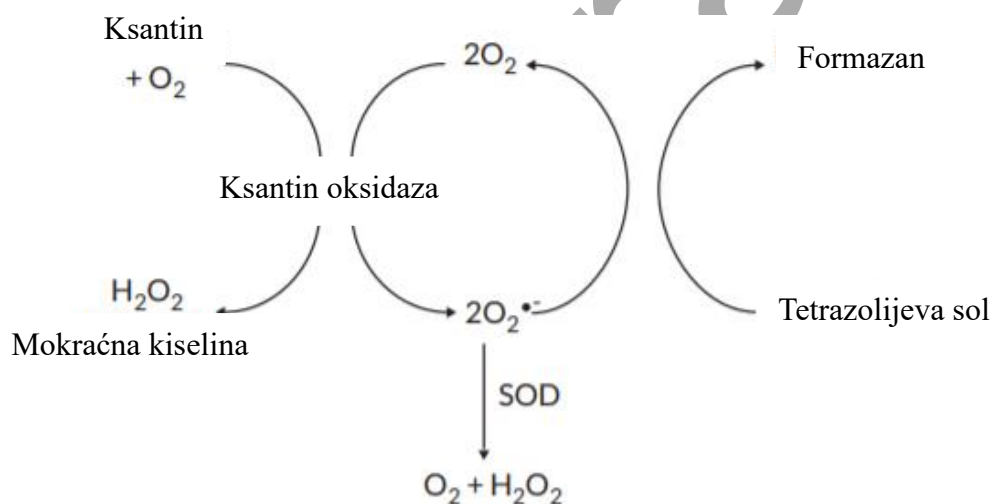
Uzorci plazme prvo su centrifugirani (7000 g, 10 minuta). U plastične tubice je stavljeno ili 50 µL destilirane vode (slijepa proba) ili 50 µL uzorka plazme ili 50 µL standarda MDA. Slijepa proba, standardi MDA i uzorci plazme napravljeni su u triplikatu. Potom je u sve tubice dodano 50 µL TBA (0,6 %) i 50 µL o-H₃PO₄ (1 %). Reakcijska smjesa je kratko promiješana. Tubice s reakcijskom smjesom su zagrijavane na temperaturi od 90 °C kroz 30 minuta u grijaćem bloku (G-Term 035, Fratelli Galli, Milano, Italija). Nakon zagrijavanja tubice su stavljene na led kako bi se zaustavila reakcija. Prije mjerenja, tubice su centrifugirane, a 100 µL supernatanta je prebačeno u mikrotitarske pločice s 96-bunarića. Apsorbancija je izmjerena na čitaču pločica (Spectra i3x, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) pri valnoj duljini od 532 nm.

Koncentracija MDA u nepoznatom uzorku je izračunata pomoću baždarnog pravca i izražena u µM.

3.2.4. Određivanje aktivnosti SOD

Za određivanje aktivnost enzima SOD u uzorcima plazme korišten je komercijalni set (Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman Chemicals, An Arbor, MI, SAD). Aktivnost SOD određuje se pomoću tetrazolijeve soli koja se koristi za utvrđivanje prisutnosti superoksidnog radikala koji nastaje preko enzima ksantin oksidaze i hipoksantina. Shematski prikaz te reakcije prikazan je na **slici 15**.

Ksantin oksidaza pretvara supstrat (ksantin) i molekularni kisik u mokraćnu kiselinu i vodikov peroksid. Prilikom reakcije, kisik drugih molekula sudjeluje u reakciji te prima po jedan elektron po reakciji pri čemu nastaju molekule superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet-}$). SOD superoksidni radikal pretvara u vodikov peroksid i molekularni kisik. Superoksidni radikal kojeg SOD ne pretvori u kisik i peroksid se oksidira natrag do molekularnog kisika pri čemu se tetrazolijeva sol reducira u formazan te se prilikom toga mijenja boja reakcijske smjese u žutu. Intenzitet žutog obojenja (apsorbancija uzorka) može se izmjeriti pri valnoj duljini u rasponu od 440 do 460 nm te je proporcionalna s aktivnosti enzima SOD. Jedna jedinica aktivnosti enzima SOD (U/mL) je definirana kao količina enzima potrebnog da prevede 50% superoksidnog radikala u molekularni kisik i peroksid.



Slika 15. Reakcije nastajanja superoksidnog radikala (preuzeto i prilagođeno iz protokola proizvođača komercijalnog seta, Cayman Chemicals).

Priprema otopina

Otopine su pripremljene prema uputstvima proizvođača seta. Pojačivač za ispitivanje (*Assay buffer*) pripremljen je na način da je 3 mL koncentriranog pojačivača iz komercijalnog seta razrijeđeno s 27 mL destilirane vode. Pojačivač za ispitivanje je 50 mM Tris HCl pH 8,0 koji sadrži 0,1 mM DTPA i 0,1 mM hipoksantina. Pojačivač za uzorke (*Sample buffer*) pripremljen je razrijeđivanjem 2 mL koncentriranog pojačivača iz komercijalnog seta s 18 mL destilirane vode. Pojačivač uzorka je 50 mM Tris HCl, pH 8,0. Detektor radikala (*Radical detector*), tetrazolijeva sol, priređen je tako da je u epruvetu preneseno 50 μ L koncentriranog detektora radikala iz seta te je dodano 19,95 mL razrijeđenog pojačivača za ispitivanje, a epruveta je

poslije zaštićena aluminijskom folijom, stoga što je spoj fotoosjetljiv. Detektor radikala je stabilan 2 sata. Ksantin oksidaza (XO) je pripremljena zadnja, na način da je 50 μL ksantin oksidaze iz seta razrijeđeno s 1,95 mL pojačivačem za uzorke (*Sample buffer*). Tako pripremljen enzim je stabilan 1 sat.

Za izračunavanje aktivnosti enzima bilo je potrebno pripremiti i standarde SOD poznate aktivnosti. Standard SOD sastavni je dio komercijalnog seta. Koncentrirana otopina standarda (engl. „stock“) SOD pripremljena je tako da je 20 μL standarda SOD iz komercijalnog seta razrijeđeno s 1,98 mL pojačivača za uzorke. Iz te otopine pripremljeni su standardi SOD potrebni za izradu baždarnog pravca razrjeđivanjem s pojačivačem za uzorke na način prikazan u **tablici 6**. Uzorak koji ne sadrži temeljnu otopinu standarda SOD (slijepa proba) je SD0. Vrijednosti apsorbancija pripremljenih standarda izmjerene su prije mjerenja samih uzoraka kako bi se provjerila linearnost metode, a standardi SOD su također pripremljeni i uz uzorke.

Tablica 6. Priprema standarda SOD za izradu baždarnog pravca razrjeđivanjem iz štok otopine standarda SOD

Standard broj	Volumen štok otopine SOD standarda (μL)	Volumen pojačivača za uzorke (μL)	Aktivnost SOD (U/mL)
SD0	0	1000	0
SD1	20	980	0,005
SD2	40	960	0,010
SD3	80	920	0,020
SD4	160	840	0,040

Postupak mjerenja aktivnosti SOD

Uzorci plazme prethodno su centrifugirani (7000 g, 10 minuta). Potom su, prema uputstvu iz komercijalnog seta uzorci plazme razrijeđeni 5x s pojačivačem za uzorke kako bi se mogla odrediti aktivnost SOD. Uzorci plazme razrijeđeni su na način da je u tubicu dodano 50 μL plazme i 200 μL pojačivača za uzorke te je tubica promiješana na vrtložnoj mješalici.

Na mikrotitarsku pločicu s 96-bunarića u bunariće za slijepu probu (SD0), standarde SOD i razrijeđene uzorke plazme prvo je nanešeno 200 μL detektora radikala. U bunariće predviđene za standarde dodano je 10 μL standardne otopine SOD, a svaka je standardna otopina SOD dodana u triplikatu. Za slijepu probu (standardna otopina SD0) dodano je 10 μL otopine pojačivača za uzorke. U bunariće za uzorke dodano je 10 μL razrijeđene plazme. Svi uzorci

stavljani su na pločicu u triplicatu, a prilikom punjenja bunarića pazilo se da se vrhom nastavka pipete ne dodirne reakcijska smjesa.

U bunarićima koji su sadržavali slijepu probu, standardne otopine SOD i razrijeđene uzorke plazme, reakcija je započeta dodavanjem 20 µL otopine ksantin oksidaze. Bunarići su pažljivo punjeni s ksantin oksidazom. Vrijeme kada je započeto dodavanje ksantin oksidaze (vrijeme početka reakcije) je zapisano. Kako bi u svim bunarićima reakcija započela istovremeno, koristila se višekanalna automatska mikropipeta. Nakon što su popunjeni svi bunarići, pločica je poklopljena te lagano promiješana par sekundi. Zatim je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi (inkubacija). Nakon 30 minuta inkubacije očitana je apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm na sobnoj temperaturi. Mjerenje apsorbancije napravljeno je na čitaču pločica (Spectra i3x, Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Za izračunavanje aktivnosti SOD enzima u uzorcima korištena je slijedeća jednadžba:

$$SOD \left(\frac{U}{mL} \right) = \left[\frac{(LR \text{ uzorka} - b)}{a} \times \frac{0,23 (mL)}{0,01 (mL)} \right] \times \text{razrjeđenje uzorka}$$

gdje je:

LR uzorka – stupanj linearnosti uzorka (apsorbancija SD0 /apsorbancija uzorka)

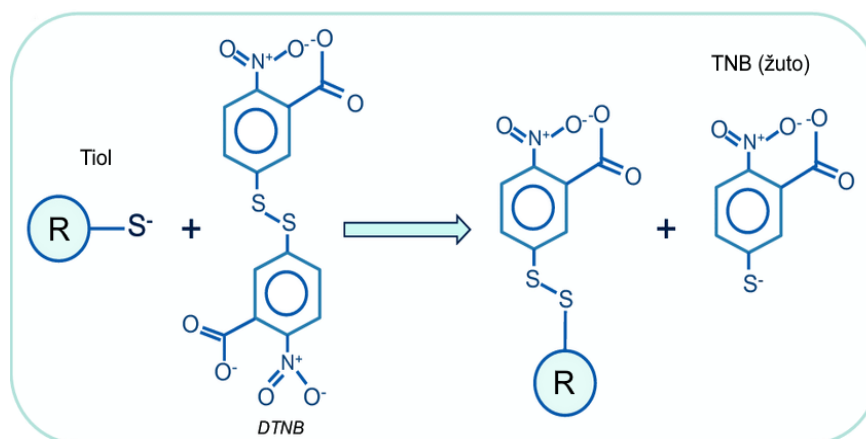
b – odsječak na y osi baždarnog pravca

a – nagib baždarnog pravca

0,23/0,01 – korekcija za volumen; 0,01 je volumen uzorka, a 0,230 je ukupni volumen reakcijske smjese.

3.2.5. Određivanje koncentracije GSH

Određivanje koncentracije GSH temelji se na reakciji GSH s DTNB-om (5,5-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina)). U blago alkalnim uvjetima (pH 7-8) DTNB reagira s tiolnom skupinom (-SH) pri čemu nastaje 2-nitro-5-benzoatni anion (TNB²⁻) (**Slika 16**). Nastali produkt žute je boje, a intenzitet obojenja moguće je izmjeriti spektrofotometrijski na valnoj duljini od 412 nm. Koncentraciju GSH u uzorku može se izračunati prema Beer-Labertovom zakonu i poznatom apsorpcijskom koeficijentu, $\epsilon=14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Eyer i sur., 2003; Duka i sur., 2019).



Slika 16. Reakcija GSH i DTNB (preuzeto i prilagođeno iz Rudyk i Eaton, 2014).

Priprema otopina

Prvo je pripremljen 0,3 M kalij-fosfatni pufer pH 7,4. Za pripremu 0,3 M otopine KH₂PO₄ bilo je potrebno odvagati 10,2 g KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i otopiti u 250 mL destilirane vode. Potom je pripremljena 0,3 M otopina K₂HPO₄ vaganjem 13,06 g K₂HPO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i njegovim otapanjem u 250 mL destilirane vode. 0,3 M kalij-fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen je tako da su 0,3 M otopina KH₂PO₄ i 0,3 M otopina K₂HPO₄ pomiješane do tražene pH vrijednosti na pH metru (Hanna Instruments, Bedfordshire, UK). Kako bi otopina sadržavala 0,1 mM EDTA, u 100 mL pufera dodano je 0,0037 g EDTA (Sigma Chemicals, St Louis, MO, SAD). EDTA kao kelator metala sprečava autooksidaciju GSH u uzorku. Pripremljeni 0,3 M kalij-fosfatni pufer pH 7,4 korišten je kao otapalo te općenito medij za izvođenje reakcije.

Potom je pripremljena otopina 10 mM DTNB. Na analitičkoj vagi odvagano je 0,0396 g DTNB-a (Sigma Chemicals, St Louis, MO, SAD). Odvaga je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopunjena s 0,3 M kalij-fosfatnim puferom pH 7,4. Otopina DTNB-a koncentracije 1 mM pripremila se razrjeđivanjem 10x otopine 10 mM DTNB-a. Otopina je korištena kao reagens za određivanje koncentracije GSH.

Postupak mjerenja koncentracije GSH

Uzorci plazme prvo su centrifugirani (7000 g, 10 minuta). Potom se u mikrotitarsku pločicu s 96-bunarića stavlja 50 μL 0,3 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4 (slijepa proba) ili po 50 μL supernatanta plazme. Uzorci i slijepa proba pipetirani su u triplikatu na mikrotitarsku pločicu. Potom je u sve bunariće dodano 50 μL 0,3 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7,4 i 50 μL DTNB-a

(1 mM). Intenzitet nastalog obojenja izmjeren je odmah na čitaču pločica (Spectra i3x, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) pri valnoj duljini 412 nm.

Koncentracija GSH u uzorku plazme izračunata je pomoću Beer-Lambertovog zakona iz izmjerene apsorbancije i poznatog apsorpcijskog koeficijenta TNB-a. Molarni apsorpcijski koeficijent, ϵ (mjerna jedinica je $M^{-1}cm^{-1}$) je konstantan za određeni spoj i valnu duljinu pri kojoj se mjeri. Prema Beer-Lambertovom zakonu, koncentracija tvari u otopini izračuna se kao omjer izmjerene apsorbancije i apsorpcijskog koeficijenta pomnoženog s duljinom puta svjetlosti kroz otopinu.

$$A = \epsilon \times l \times c$$

$$\text{Koncentracija GSH} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l} [\mu M]$$

gdje je:

ΔA – razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe pri 412 nm

ϵ – apsorpcijski koeficijent ($14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.2.6. Određivanje hematoloških parametara

Iz uzorka pune krvi prema standardnom protokolu KBC Zagreb određen je ukupni broj leukocita (WBC) ($\times 10^9/L$) te udio neutrofila (%) koristeći automatiziranu metodu na hematološkom analizatoru Sysmex XN-3100 (Sysmex, Kobe, Japan).

3.2.7. Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina

Koncentracija CRP-a (mg/L) u serumu određena je standardiziranom imunoturbidimetrijskom metodom na automatiziranom biokemijskom analizatoru Alinity C (Abbott Diagnostics, Abbot Park, SAD) koristeći originalne reagense proizvođača.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišten je programski paket STATISTICA 11.0. Za svaku kategorijsku varijablu izračunate su tablice frekvencije izražene kao cijeli brojevi i postotci. Za svaku kontinuiranu varijablu (vrijednosti upalnih parametara, pokazatelja oksidacijskog oštećenja, aktivnost antioksidansa) izračunati su osnovni statistički parametri (srednja vrijednost, standardna devijacija, medijan, minimalna i maksimalna vrijednost) za ukupnu populaciju te obzirom na spol i tumorsko opterećenje organizma. Rezultati su prikazani tablično i grafički. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli je provjerena Kolmogorov-Smirnov testom. Za potvrđivanje potencijalne razlike u vrijednostima parametara između dviju skupina korišten je t test, a za 3 i više skupina *One-way Anova* test. Prije provođenja navedenih testova vrijednosti parametara koje odstupaju od normalne raspodjele su logaritamski transformirane. Utjecaj upalnih parametara, pokazatelja oksidacijskog oštećenja te aktivnost antioksidansa na veličinu tumorske mase ispitan je višestrukom regresijskom analizom i generalnim regresijskim modelom, a rezultati su prikazani tablično te grafički u formi pareto dijagrama t-vrijednosti. Utjecaj prediktorskih varijabli na vrijednosti upalnih parametara, pokazatelja oksidacijskog oštećenja, aktivnost antioksidansa ispitan je generalnim regresijskim modelom, a rezultati su prikazani u formi pareto dijagrama t-vrijednosti. Statistička značajnost je određena na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

U istraživanje su uključeni bolesnici zaprimljeni na odjelu Klinike za onkologiju, KBC Zagreb kojima je na osnovu kliničko-patohistološkog nalaza dijagnosticiran sarkom te su liječeni kemoterapijom antraciklinima. Ukupno je uključen 51 bolesnik kojem je dijagnosticiran STS ili osteosarkom.

Od 51 bolesnika koji je sudjelovao u istraživanju, 23 su bila muškarci, a 28 žene (**tablica 7**). Dob bolesnika bila je u rasponu od 20 do 74 godine, a razlika u dobi između žena (23-74 godina) i muškaraca (20-67 godina) nije zabilježena ($p = 0,8480$). Do kraja istraživanja 7 bolesnika je preminulo (14 %).

Tablica 7. Spol i dob bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje

Spol / n (%)	Muškarci	28 (55 %)
	Žene	23 (45 %)
Dob / medijan (raspon)	50 godina (20-74 godina)	
	Muškarci	52 godine (20-67 godina)
	Žene	48 godina (23-74 godina)
Umrli / n	7	

Histološki podtipovi sarkoma bolesnika uključenih u istraživanje prikazani su u **tablici 8**. Najčešća dijagnoza bio je leiomiosarkom koji je dijagnosticiran u 13 bolesnika, od čega 5 muškaraca i 8 žena. Kod osam bolesnika dijagnosticiran je dediferencirani liposarkom i to 2 muškarca i 6 žena. Sinovijalni sarkom dijagnosticiran je kod 5 bolesnika (M: 2, Ž: 3), kao i osteosarkom (M: 4, Ž: 1). Po tri bolesnika imala su ekstraskeletni osteosarkom (M:1, Ž:2) i miksofibrosarkom (M:2, Ž:1). Po dva bolesnika imali su slabo diferencirani sarkom (Ž:2), clear cell sarkom (Ž:2), angiosarkom (Ž:2) i nediferencirani pleomorfni sarkom (M:1, Ž:1). Ewingov sarkom, hondrosarkom, epiteloidni sarkom, desmoplastični tumor malih stanica, dobro diferencirani liposarkom i miksoidni sarkom dijagnosticirani su samo po jednom bolesniku. Bolesnici kojima je dijagnosticiran osteosarkom bili su najmlađi (raspon godina: od 20 do 50). Grupa bolesnika kojima je dijagnosticiran ekstraskeletni osteosarkom bila je najstarija (raspon godina: od 57 do 60). Najmlađa ženska bolesnica imala je 23 godine i dijagnozu osteosarkoma. Najmlađi muški bolesnik imao je 20 godina i Ewingov sarkom. Iako su od različitih histoloških podtipova sarkoma podjednako obolijevali i muškarci i žene ipak je više muškaraca ($n=4$) u

usporedbi sa ženama (n=1) imalo osteosarkom. S druge strane više je žena (n=6) u usporedbi s muškarcima (n =2) imalo dediferencirani liposarkom.

Tablica 8. Učestalost histološki podtipovi sarkoma bolesnika uključenih u istraživanje

Dijagnoza (Histološki podtip)	n (%)
Leiomyosarkom	13 (25%)
Dediferencirani liposarkom	8 (16%)
Osteosarkom	5 (10%)
Sinovijalni sarkom	5 (10%)
Ekstraskeletni osteosarkom	3 (6%)
Miksofibrosarkom	3 (6%)
Angiosarkom	2 (4%)
Clear cell sarkom	2 (4%)
Nediferencirani pleomorfni sarkom	2 (4%)
Slabodiferencirani+ sarkom	2 (4%)
Desmoplastični tumor malih stanica (DSRCT)	1 (2%)
Dobrodiferencirani liposarkom	1 (2%)
Epiteloidni sarkom	1 (2%)
Ewingov sarkom	1 (2%)
Hondrosarkom	1 (2%)
Miksoidni liposarkom	1 (2%)

4.2. PROTOKOL KEMOTERAPIJA BOLESNIKA UKLJUČENIH U ISTRAŽIVANJE

Tablicom 9 prikazana je učestalost protokola kemoterapija kojega su primili bolesnici uključeni u istraživanje. Najučestaliji protokol liječenja je bio doksorubicin sa ifosfamidom zastupljen s 54%. Zatim doksorubicin u monoterapiji (13%) te doksorubicin s dakarbazinom (10%).

Tablica 9. Učestalost protokola kemoterapije kojega su primili bolesnici sa sarkomom uključeni u istraživanje

Protokol kemoterapije	%	n
doksorubicin + ifosfamid	53	27
doksorubicin	12	6
doksorubicin + dakarbazin	10	5
epirubicin + ifosfamid	10	5
doksorubicin + cisplatin	7	4
doksorubicin + ifosfamid + dakarbazin	4	2
vinkristin + ifosfamid + doksorubicin + etopozid	4	2

Bolesnici su primili od 3 do 8 ciklusa kemoterapije sukladno planu onkološkog liječenja. Najviše bolesnika primilo je 5 ciklusa kemoterapije (30% njih) dok je 8 ciklusa kemoterapije primio samo jedan bolesnik (**tablica 10**).

Tablica 10. Učestalost i broj ciklusa kemoterapije s antraciklinima kojega su primili bolesnici sa sarkomom uključeni u istraživanje

Broj ciklusa kemoterapije	%	n
3	20	10
4	25	13
5	30	15
6	10	5
7	13	7
8	2	1

4.3. TUMORSKO OPTEREĆENJE BOLESNIKA UKLJUČENIH U ISTRAŽIVANJE

Prije kemoterapije temeljem zahvaćenosti organizma tumorom, bolesnici su grupirani u tri grupe ovisno o tumorskom opterećenju: (1) tumorsko tkivo nije detektabilno (operacijski je uklonjeno); (2) primarno tumorsko tkivo < 7 cm i/ili metastaze na jednom organu; (3) primarno tumorsko tkivo > 7 cm i/ili metastaze na dva ili više organa. Najviše bolesnika, 15 muškaraca i 16 žena imalo je malo do srednje tumorsko opterećenje. Veliko tumorsko opterećenje imalo je 13 bolesnika (8 žena i 5 muškaraca), dok je nedektabilno opterećenje imalo 7 ispitanika, od toga 4 žene i 3 muškarca (**tablica 11**).

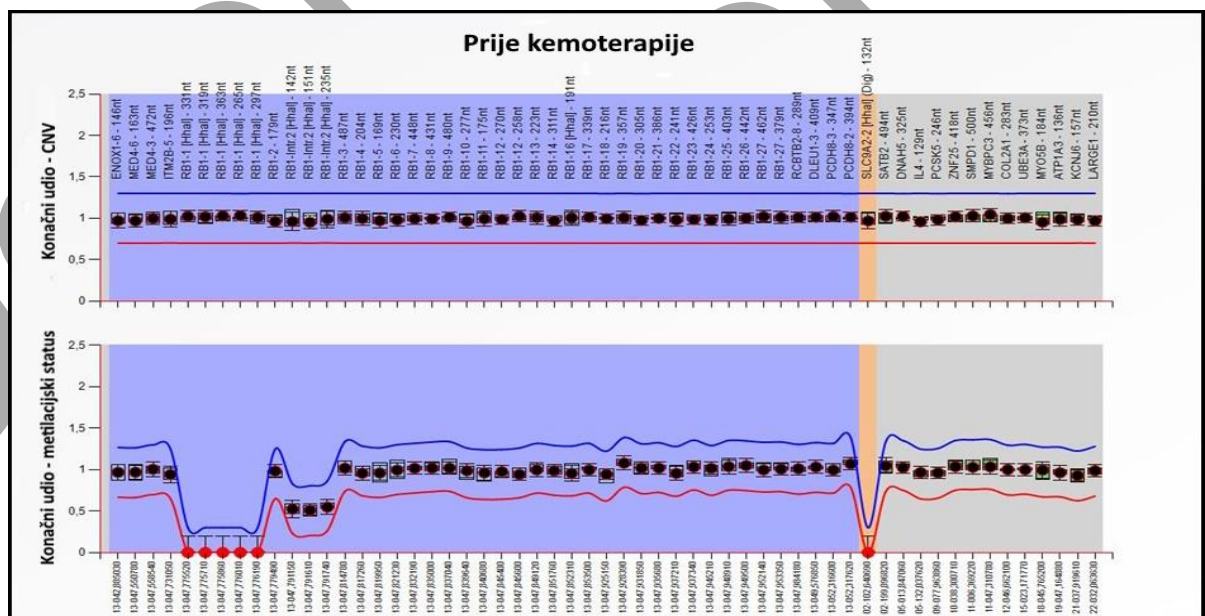
Tablica 11. Tumorsko opterećenje bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje

tumorsko tkivo nije detektabilno	7 (M: 3, Ž: 4)
primarno tumorsko tkivo < 7 cm i/ili metastaze na jednom organu	31 (M: 15, Ž: 16)
primarno tumorsko tkivo > 7 cm i/ili metastaze na dva ili više organa	13 (M: 5, Ž: 8)

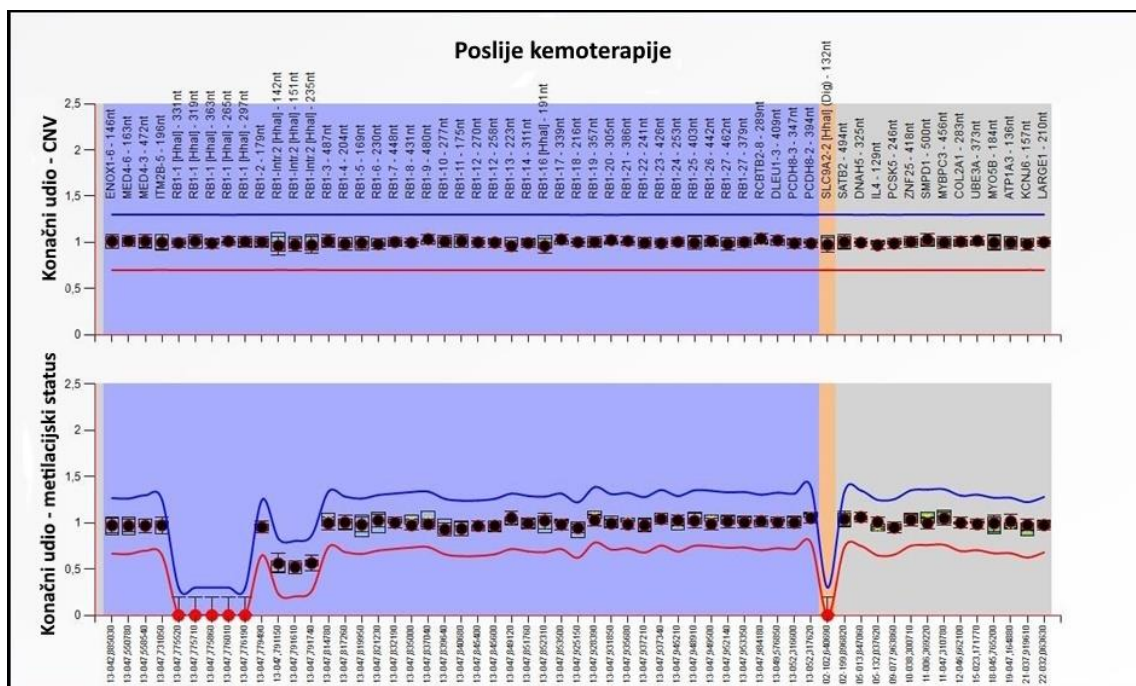
4.4. KVANTIFIKACIJA PROMJENA U BROJU KOPIJA (CNV) I METILACIJSKI STATUS GENA *RB1*

U uzorcima DNA izdvojene iz leukocita periferne krvi bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje prije i nakon kemoterapije antraciklinima kvantitativno je određen metilacijski status promotorske regije CpG106 i introna 2 s utisnutim CpG otokom (CpG85) gena *RB1*. Dodatno, kvantitativno su određene promjene u CNV svih eksona, osim eksona 15 gena *RB1*. Kod svih bolesnika sa sarkomom bez obzira na dob, spol, histološki podtip sarkoma i tumorsko opterećenje, promotorska regija CpG106 bila je demetilirana prije i nakon kemoterapije antraciklinima. Također, kod svih bolesnika nije nađena promjena CNV gena *RB1*. Kod 50 bolesnika sa sarkomom prije i nakon kemoterapije antraciklinima utvrđena je metilacija introna 2 (CpG85) na razini od 50%, što predstavlja normalnu razinu metilacije budući da je regija CpG85 metilirana na alelu naslijeđenom od majke, dok je na očevom alelu demetilirana. Normalan rezultat analize gena *RB1* prije (A) i nakon kemoterapije antraciklinima (B) bez utvrđenih promjena u broju kopija gena *RB1*, demetiliranom regijom CpG106 i metilacijskim statusom CpG85 na razini od 50% prikazan je na slici 17.

A

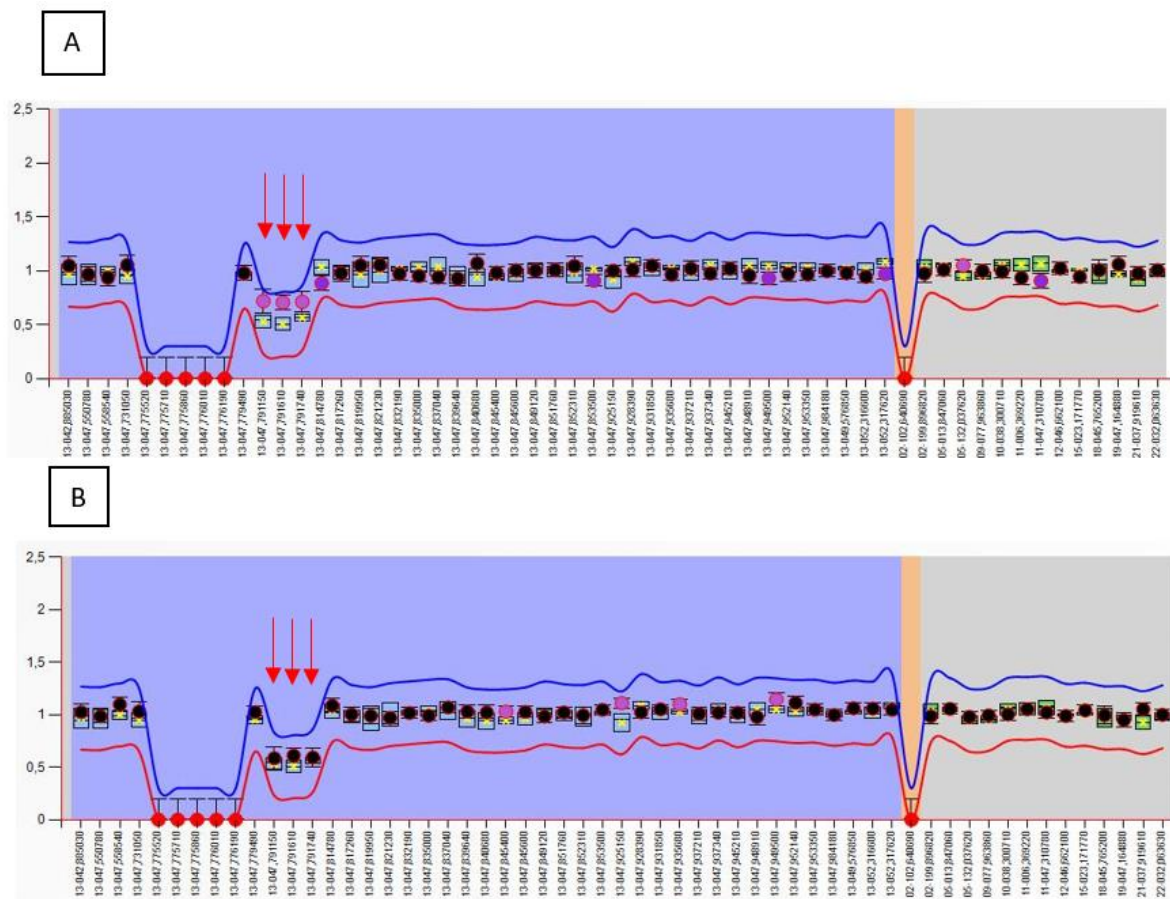


B



Slika 17. Primjer normalnog rezultata analize gena *RBL* metodom MS MLPA s prisutnom demetilacijom promotorske regije CpG106 i razinom metilacije od 50% introna 2 CpG85 prije (A) i nakon (B) kemoterapije antraciklinima, bez prisutnih promjena u broju kopija gena *RBL*. Bolesnica (38 godina) s dijagnozom dediferenciranog liposarkoma (tumorska opterećenost mala do srednja) prije kemoterapije i nakon petog ciklusa kemoterapije protokolom adriamicin/ifosfamid.

Promjena metilacije u regiji introna 2 (CpG85) prije i nakon kemoterapije antraciklinima nađena je kod bolesnice (dob 48 godina) s dijagnozom dediferenciranog liposarkoma (tumorska opterećenost mala do srednja). Prije kemoterapije u regiji CpG85 utvrđeno je povećanje metilacije za otprilike 10%. Budući da se radi o genetski utisnutoj regiji, sveukupna metilacija je iznosila 60% (**Slika 18A**). Nakon četvrtog ciklusa monoterapije doksorubicinom hipermetilacija od 10% regije CpG85 snižena je na normalnu razinu te je iznosila 50% (**Slika 18B**).



Slika 18. MS MLPA analiza metilacijskog statusa gena *RBI* bolesnice s dijagnozom dediferenciranog liposarkoma i aberantnom metilacijom regije introna 2 CpG85. A - prikaz prije kemoterapije s 10% povećanom metilacijom i B - prikaz normalne metilacije nakon četvrtog ciklusa kemoterapije.

4.5. POVEZANOST PARAMETARA OSIDACIJSKOG STRESA I UPALE S TUMORSKIM OPTEREĆENJEM BOLESNIKA

Rezultati vrijednosti parametara oksidacijskog stresa i upale u bolesnika sa sarkomom ovisno o tumorskom opterećenju prikazane su u **tablici 12**. Bolesnici s većim tumorskim opterećenjem imali su nižu koncentraciju antioksidansa GSH i nižu aktivnost SOD u usporedbi s bolesnicima s nedektabilnim tumorskim opterećenjem. Međutim, značajano niža koncentracija s porastom tumorskog opterećenja zabilježena je samo za GSH. Koncentracija GSH kod bolesnika s velikim tumorskim opterećenjem bila je $34,0 \pm 9,2 \mu\text{M}$, što je statistički značajno niže od koncentracije GSH kod bolesnika s nedektabilnim tumorskim opterećenjem $66,1 \pm 12,4 \mu\text{M}$ ($p < 0,001$; **tablica 12**). Značajnija razlika u koncentraciji ROS i MDA između grupe bolesnika s

nedetektabilnim tumorskim opterećenjem i grupe bolesnika s velikim tumorskim opterećenjem nije zabilježena.

S porastom tumorskog opterećenja rasle su vrijednosti parametara upale (CRP, leukociti, udio neutrofila) (**tablica 12**). Koncentracija CRP kod bolesnika s velikim tumorskim opterećenjem bila je $127,3 \pm 64,5$ mg/L što je statistički značajno više u odnosu na grupu bolesnika s nedetektabilnim tumorom kod kojih je koncentracija CRP bila $1,0 \pm 0,1$ mg/L ($p < 0,001$; **tablica 12**). Iako je s porastom tumorskog opterećenja zabilježen porast i broja leukocita i udio neutrofilnih granulocita taj porast nije bio statistički značajan (**tablica 12**).

Višestrukom regresijskom analizom (**tablica 13**) nađena je vrlo dobra, statistički značajna korelacija ($R=0,80$; $p<0,0000$) između tumorskog opterećenja i odabranih prediktorskih varijabli (parametri upale i parametri oksidacijskog stresa). Iz Pareto dijagrama (**slika 19**) te β koeficijenata i njihove značajnosti je vidljivo da jedino CRP ($\beta=0,74$; $p=0,0000$) i GSH ($\beta= -0,43$; $p=0,0332$) statistički značajno pokazuju povezanost s tumorskim opterećenjem.

Tablica 12. Parametri oksidacijskog stresa i upale grupirani na osnovu tumorskog opterećenja prije kemoterapije u bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje

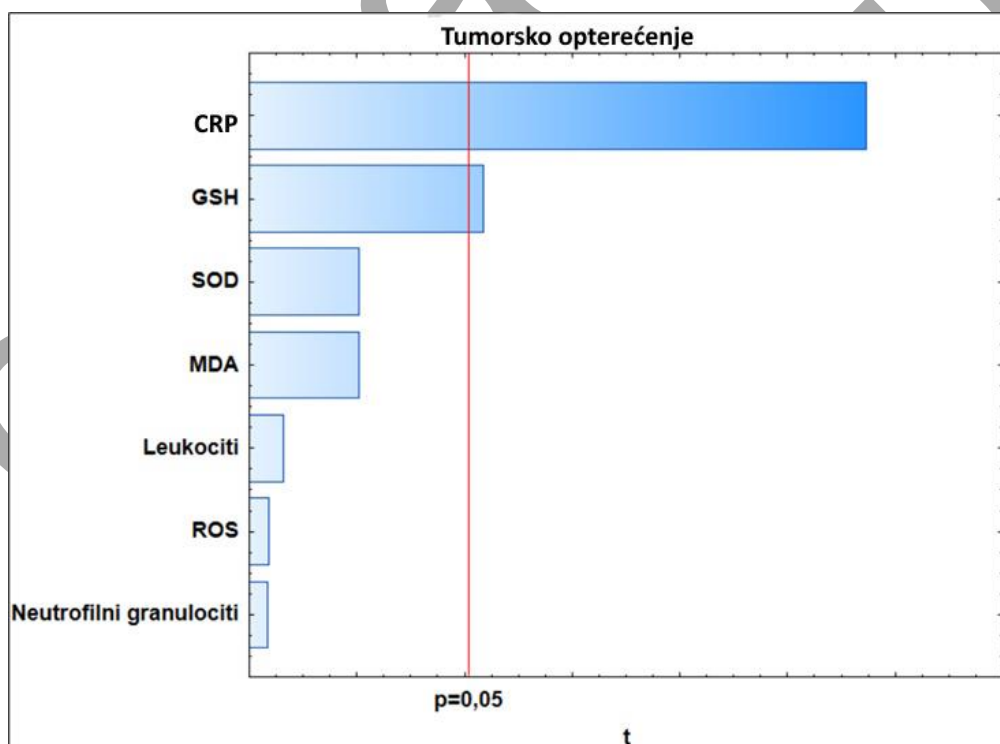
Tumorsko opterećenje	CRP (mg/L)	Leukociti ($\times 10^9/L$)	neutrofilni granulociti (%)	SOD (U/mL)	ROS (RFU)	MDA (μM)	GSH (μM)
Nedektabilno	1,0 \pm 0,1 ^c	8,7 \pm 3,3	67,1 \pm 15,0	158,3 \pm 23,9	686728,2 \pm 234823,1	1,7 \pm 0,3	66,1 \pm 12,4 ^c
Malo do srednje	6,5 \pm 4,6 ^c	7,9 \pm 2,1	62,7 \pm 15,6	140,6 \pm 26,1	799508,2 \pm 205433,7	1,8 \pm 0,3	59,0 \pm 23,8 ^c
Veliko	127,3 \pm 64,5 ^{a,b}	9,3 \pm 3,3	71,9 \pm 6,3	129,2 \pm 24,5	637669,5 \pm 164573,3	1,6 \pm 0,1	34,0 \pm 9,2 ^{a,b}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Vrijednosti unutar pojedinog stupca označene različitim slovom statistički se značajno međusobno razlikuju ($p < 0,05$).

Tablica 13. Rezultati višestruke regresijske analize utjecaja odabranih prediktorskih varijabli na stupanj tumorskog opterećenja bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje

Prediktorska varijabla	B	P
CRP	0,74	0,0000*
Leukociti	0,13	0,3153
neutrofilni granulociti	0,04	0,7551
SOD	-0,22	0,0790
ROS	-0,12	0,3153
MDA	-0,22	0,0790
GSH	-0,43	0,0332*
		R=0,80; p<0,0000*

R-koeficijent korelacije; β -pojedinačni utjecaj svake prediktorske varijable ukupnoj korelaciji; p-razina značajnosti; *-statistički značajno p<0,05



Slika 19. Pareto dijagram t-vrijednosti povezanosti odabranih prediktorskih varijabli sa stupnjem tumorskog opterećenja bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje. Varijable koje prelaze crvenu liniju imaju statistički značajan utjecaj na zavisnu varijablu (stupanj tumorskog opterećenja).

4.6. PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA I UPALE PRIJE I NAKON KEMOTERAPIJE

Osnovni statistički podaci za parametre oksidacijskog stresa (ROS, MDA, SOD i GSH) i parametre upale (CRP, leukociti i neutrofilni granulociti) bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje prije i nakon kemoterapije prikazani su **tablicom 14** i **slikama 20 i 21**. Parametri su izmjereni u uzorcima krvi sakupljenima prije kemoterapije te nakon kemoterapije. Parametri nakon kemoterapije izmjereni su u uzorcima krvi sakupljenima oko 25. dana (+/- 1 dan) po završetku ciklusa kemoterapije stoga što je utvrđeno da je tada lijek u potpunosti izlučen iz organizma i nema njegovog izravnog utjecaja, odnosno vrijednosti mjerenih parametara pokazatelj su bioloških posljedica farmakološkog tretmana po planu i protokolu onkološkog liječenja, a ne direktnog kemijskog utjecaja lijeka.

Kako je vidljivo iz **tablice 14** parametri oksidacijskog stresa (ROS, MDA) bili su statistički značajno niži u uzorcima krvi bolesnika sa sarkomom sakupljenima nakon kemoterapije u odnosu na vrijednosti u uzorcima krvi prije kemoterapije. Vrijednosti ROS-ova prije kemoterapije bile su $651406,5 \pm 195713,3$ RFU, a nakon kemoterapije $566068,0 \pm 111990,0$ RFU ($p = 0,0184$). Koncentracija MDA u uzorcima krvi prije kemoterapije bila je $1,7 \pm 0,2$ μM , a nakon kemoterapije $1,2 \pm 0,2$ μM ($p = 0,0248$).

U uzorcima krvi sakupljenima nakon kemoterapije zabilježen je blagi trend porasta aktivnosti antioksidacijskog enzima SOD. Aktivnost SOD porasla je s $140,3 \pm 26,2$ U/mL prije kemoterapije na $141,0 \pm 28,7$ U/mL nakon kemoterapije, ali ta razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,9029$). Koncentracija GSH kao neenzimskog antioksidansa pokazuje trend smanjenja, ali ne statistički značajno ($p = 0,7530$) u uzorcima krvi nakon kemoterapije ($50,9 \pm 13,7$ μM) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije ($52,2 \pm 22,2$ μM).

U uzorcima krvi bolesnika sa sarkomom sakupljenima prije kemoterapije koncentracija CRP bila je u rasponu od <1,0 do 209,2 mg/L ($40,0 \pm 63,7$ mg/L; medijan: 7,9 mg/L). Prije kemoterapije svega je 11 bolesnika imalo koncentraciju CRP u referentnom intervalu (referentni interval: < 5 mg/L). U uzorcima krvi sakupljenima nakon kemoterapije koncentracija CRP je bila niža u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije. Točnije, nakon kemoterapije koncentracija CRP je bila $15,7 \pm 30,4$ mg/L što je statistički značajno niže od koncentracije CRP prije kemoterapije ($40,0 \pm 63,7$ mg/L; $p = 0,0321$). S obzirom da je uzorak nakon kemoterapije sakupljen 25. dana po završetku ciklusa kemoterapije, može se reći da je došlo do smanjenja razine upale u bolesnika.

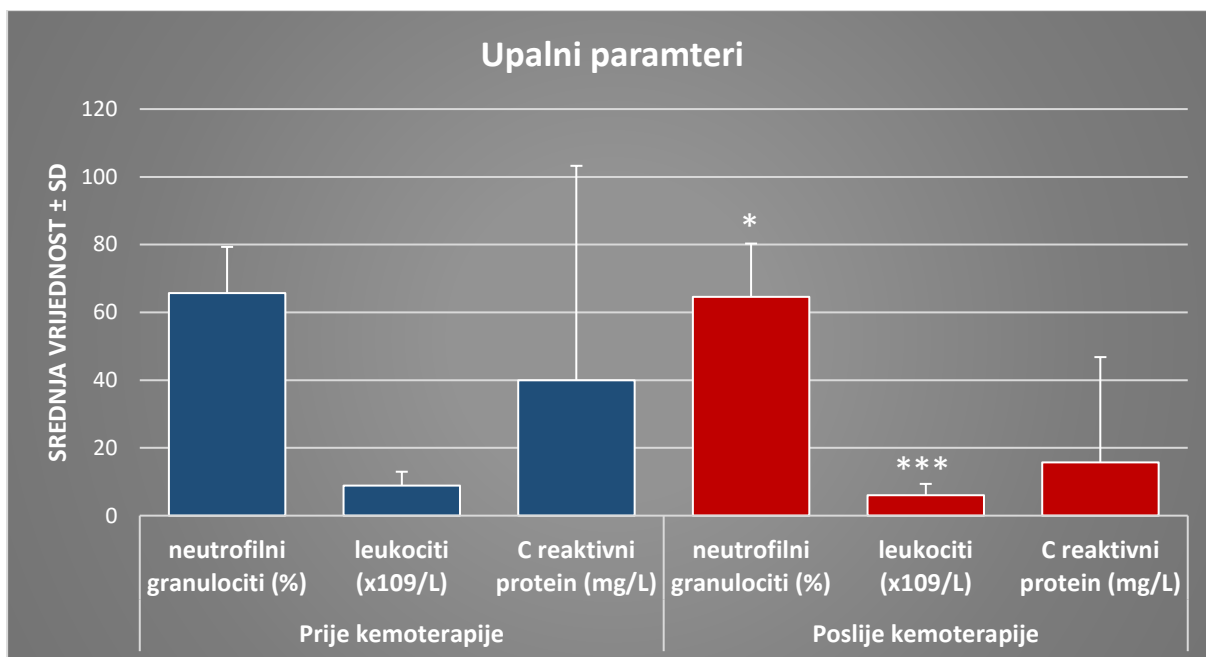
U uzorcima krvi bolesnika sa sarkomom prije kemoterapije broj leukocita bio je između 4,7 i $29,6 \times 10^9/L$ ($8,9 \pm 4,2 \times 10^9/L$; medijan: $8,1 \times 10^9/L$). Povišen broj leukocita iznad referentnog raspona ($3,4 - 9,7 \times 10^9/L$) prije kemoterapije imalo je 11 bolesnika, 6 žena i 5 muškaraca. U odnosu na broj leukocita prije kemoterapije, u uzorcima krvi sakupljenima nakon kemoterapije zabilježen je statistički značajno niži broj leukocita ($6,1 \pm 3,3 \times 10^9/L$; $p = 0,0009$).

Prije kemoterapije u uzorcima krvi bolesnika sa sarkomom postotak neutrofilnih granulocita bio je u rasponu od 8,7 do 91,2%. Izvan referentnog intervala 44 - 72%, odnosno postotak neutrofilnih granulocita veći od 72% imalo je 15 bolesnika, od toga 7 muškaraca i 7 žena. Nakon kemoterapije postotak neutrofilnih granulocita bio je niži ($64,4 \pm 15,2\%$) u odnosu na postotak prije kemoterapije ($66,3 \pm 14,3\%$) ali ta razlika nije bila i statistički značajna ($p = 0,5695$).

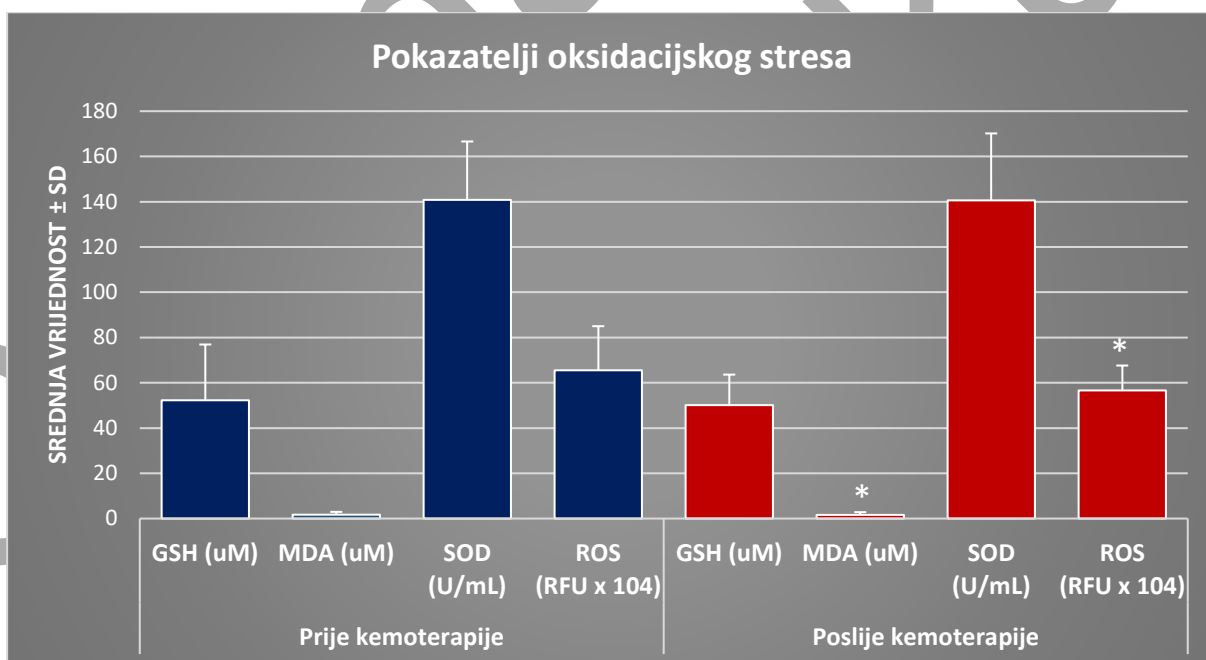
Tablica 14. Osnovni statistički podaci za parametre oksidacijskog stresa i upale u uzorcima periferne krvi bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje prije i nakon kemoterapije

Skupina	Parametar	Srednja vrijednost	SD	M	Minimum	Maksimum
Prije kemoterapije	CRP (mg/L)	40,0	63,7	7,9	<1,0	209,2
	leukociti (x10 ⁹ /L)	8,9	4,2	8,1	4,7	29,6
	neutrofilni granulociti (%)	66,3	14,3	67,1	8,7	91,2
	ROS (RFU)	651406,5	195713,3	589864,5	372905,8	1106227,0
	SOD (U/mL)	140,3	26,2	135,6	90,8	199,2
	MDA (μM)	1,7	0,2	1,8	1,2	2,3
	GSH (μM)	52,2	22,2	50,8	23,1	115,3
Nakon kemoterapije	CRP (mg/L)	15,7*	30,4	3,6	0,1	131,0
	leukociti (x10 ⁹ /L)	6,1***	3,3	5,4	1,1	18,8
	neutrofilni granulociti (%)	64,4	15,2	66,4	16,0	92,0
	ROS (RFU)	566068,0*	111990,0	531215,1	421692,0	917980,0
	SOD (U/mL)	141,0	28,7	139,6	84,5	246,3
	MDA (μM)	1,6*	0,2	1,6	1,3	2,1
	GSH (μM)	50,9	13,7	48,0	30,6	86,0

SD-standardna devijacija, M-medijan. * statistički značajno (p < 0,05); *** statistički značajno (p < 0,0001).



Slika 20. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara upale u uzorcima periferne krvi bolesnika sa sarkomom prije i nakon kemoterapije. * statistički značajno ($p < 0,05$); *** statistički značajno ($p < 0,0001$).



Slika 21. Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara oksidacijskog stresa u uzorcima periferne krvi bolesnika sa sarkomom prije i nakon kemoterapije. * statistički značajno ($p < 0,05$); *** statistički značajno ($p < 0,0001$).

Ako se promatraju parametri upale obzirom na spol (**tablica 15**) u uzorcima krvi prije kemoterapije statistički značajno više vrijednosti CRP su nađene kod žena $44,5 \pm 69,6$ mg/L u

odnosu na muškarce $29,3 \pm 54,7$ ($p = 0,0471$). Nakon kemoterapije nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima CRP između muškaraca i žena. Kod ostala dva parametra upale nije nađena statistički značajna razlika obzirom na spol kako u vrijednostima prije tako ni u vrijednostima nakon terapije.

Od antioksidacijskih/oksidacijskih pokazatelja statistički značajna razlika obzirom na spol je nađena jedino za vrijednosti MDA prije terapije ($p = 0,0000$) koje su kod muškaraca ($1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$) bile statistički značajno više u odnosu na žene ($1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$).

Ocjena rada
u tijeku

Tablica 15. Parametri oksidacijskog stresa i upale u uzorcima periferne krvi bolesnika sa sarkomom prije i nakon kemoterapije grupirani po spolu

Spol	Kemoterapija	CRP (mg/L)	Leukociti ($\times 10^9/L$)	Neutrofilni granulociti (%)	SOD (U/mL)	ROS (RFU)	MDA (μM)	GSH (μM)
Žene	prije	44,5 \pm 69,6 ^{b,c,d}	8,5 \pm 2,7	65,9 \pm 10,2	135,3 \pm 25,9	693472,9 \pm 199361,5 ^b	1,6 \pm 0,2 ^c	48,8 \pm 17,9
	poslije	14,7 \pm 33,1 ^a	6,2 \pm 4,1	64,0 \pm 17,8	147,3 \pm 31,4	565654,7 \pm 97336,2 ^a	1,6 \pm 0,2 ^c	52,1 \pm 11,7
Muškarci	prije	29,3 \pm 54,7 ^a	8,2 \pm 2,6	65,4 \pm 18,4	145,9 \pm 26,3	598971,1 \pm 185932,9	1,8 \pm 0,3 ^{a,b,d}	59,3 \pm 27,7
	poslije	16,3 \pm 29,3 ^a	5,7 \pm 2,1	64,4 \pm 13,2	131,8 \pm 26,6	559712,2 \pm 121370,9 ^a	1,6 \pm 0,3 ^c	53,3 \pm 15,4

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Vrijednosti unutar pojedinog stupca označene različitim slovima statistički se značajno međusobno razlikuju ($p > 0,05$).

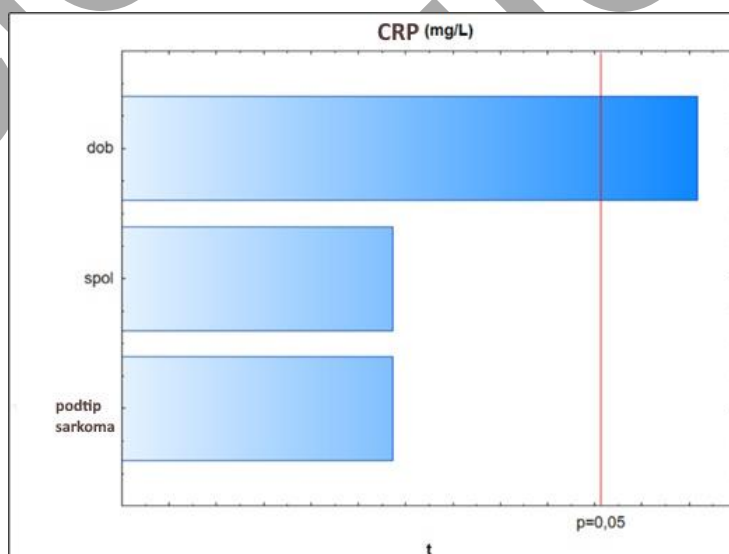
4.7. REGRESIJSKA ANALIZA UČINAKA KEMOTERAPIJE NA PARAMETRE OKSIDACIJSKOG STRESA I UPALE

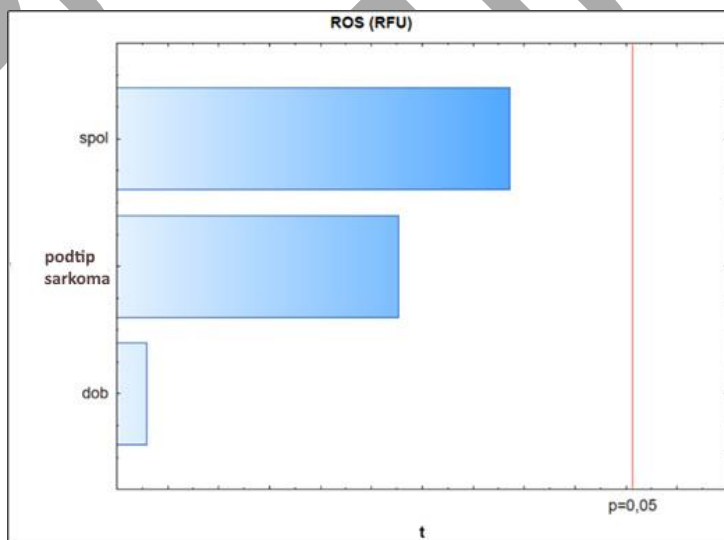
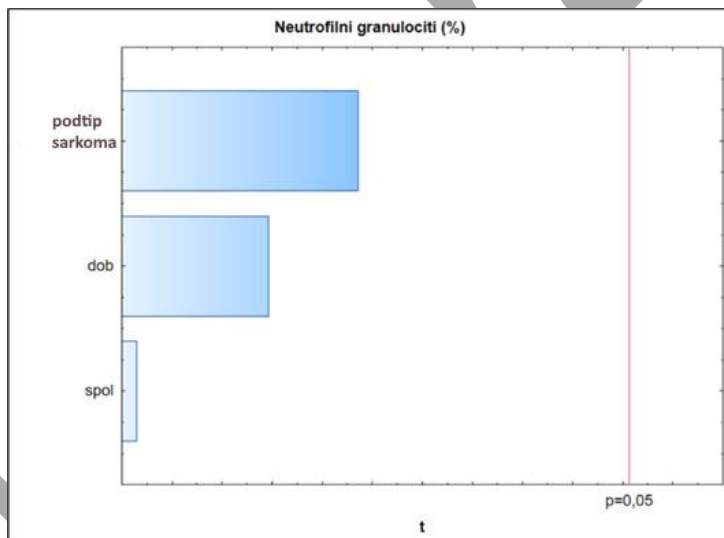
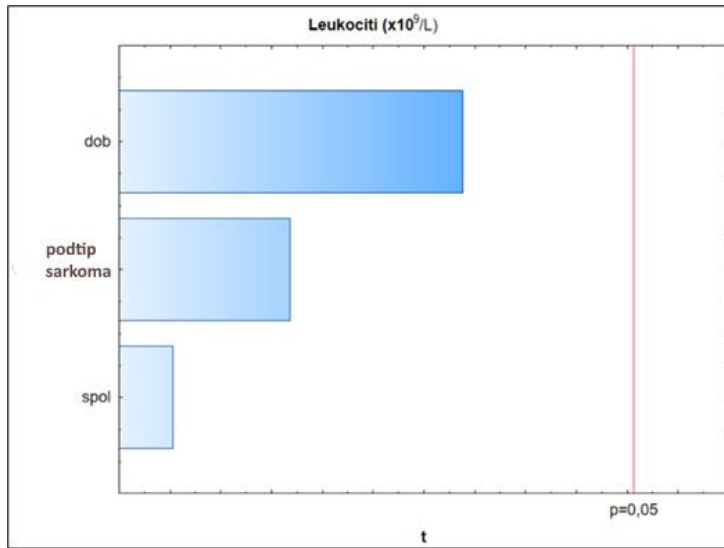
Dodatno testiranje veze između izmjerenih parametara oksidacijskog stresa i upale prije kemoterapije i odabranih prediktorskih varijabli (dob, spol, podtip sarkoma) provedena je regresijska analiza.

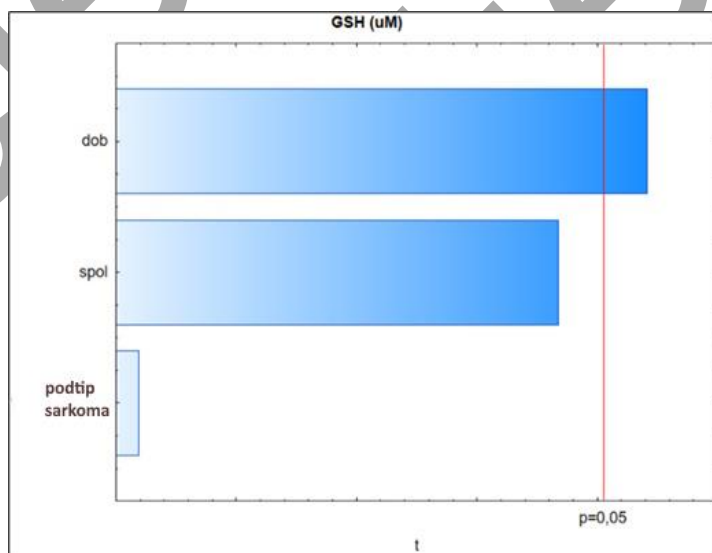
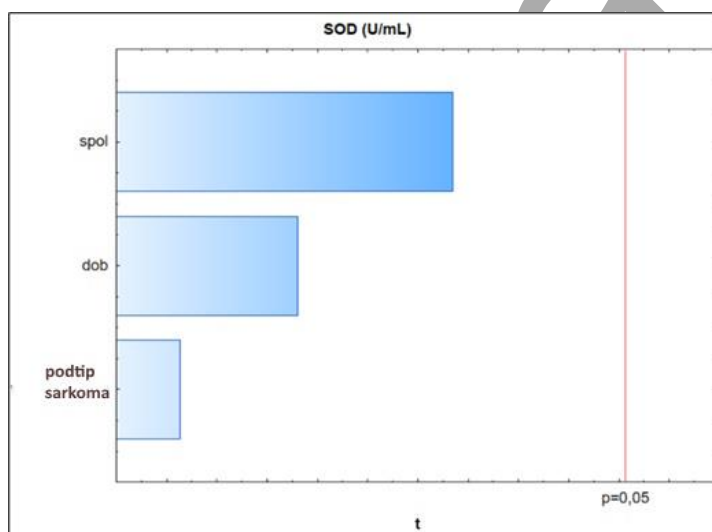
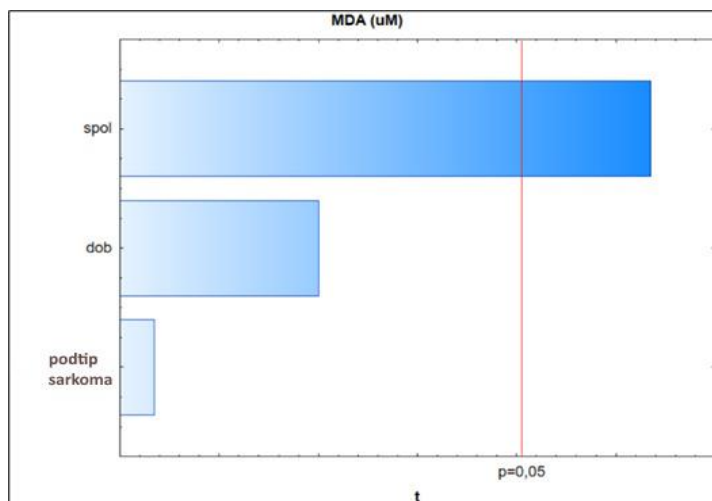
Generalnim regresijskim modelom potvrđena je umjerena, statistički značajna povezanost između odabranih prediktorskih varijabli i vrijednosti CRP u uzorcima krvi bolesnika sa sarkomom prije terapije ($R=0,42$; $p=0,0309$; **Slika 22**). Od tri prediktorske varijable (dob, spol, podtip sarkoma) samo dob je imala statistički značajan utjecaj. Broj leukocita ($R=0,34$; $p=0,5131$) te udio neutrofilnih granulocita ($R=0,34$; $p=0,5002$) pokazali su slabu povezanost s prediktorskim varijablama od kojih ni jedna statistički značajno ne pridonosi ukupnoj korelaciji.

Slaba povezanost je također nađena između prediktorskih varijabli i aktivnosti SOD ($R=0,31$; $p=0,6032$) te razine ROS ($R=0,34$; $p=0,4320$).

Generalnim regresijskim modelom je potvrđena umjerena, statistički značajna povezanost između odabranih prediktorskih varijabli i koncentracije MDA ($R=0,40$; $p=0,0385$), a jedini statistički značajan prediktor je spol. Umjerena, statistički značajna povezanost je također potvrđena između odabranih prediktorskih varijabli i koncentracije GSH ($R=0,45$; $p=0,0481$).





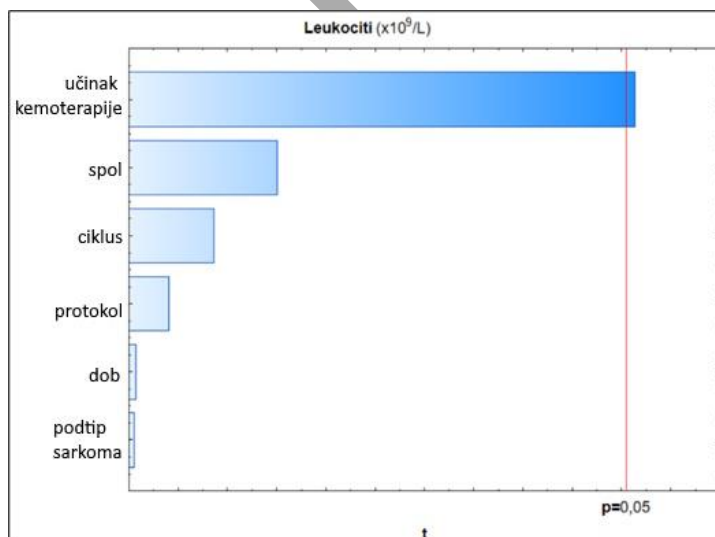
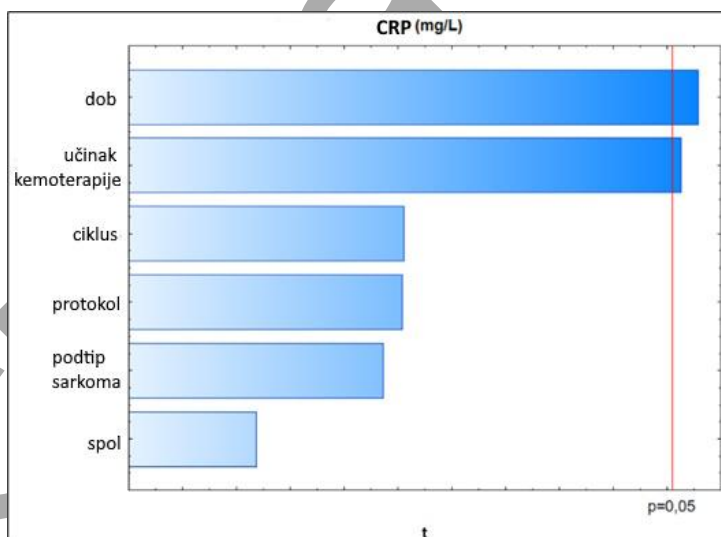


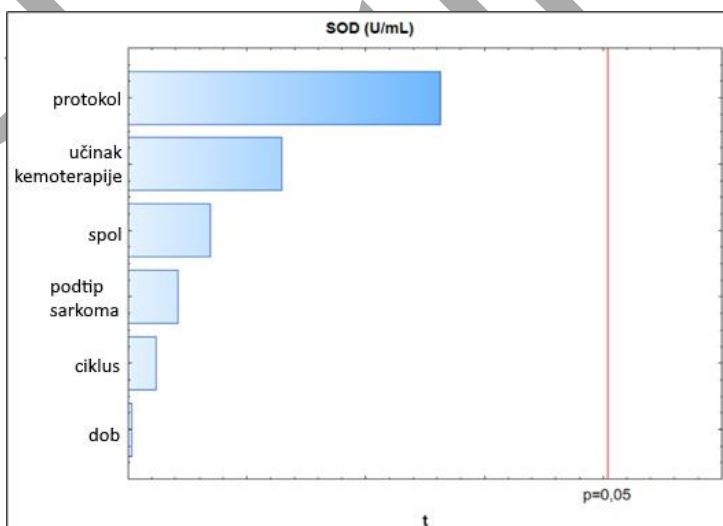
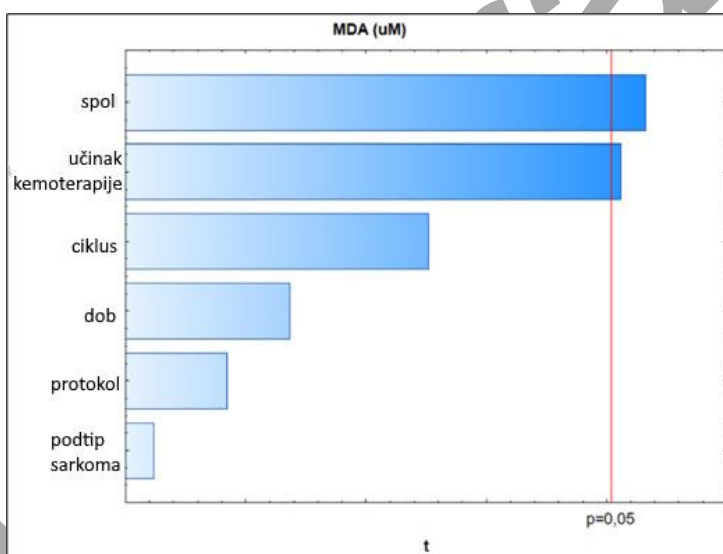
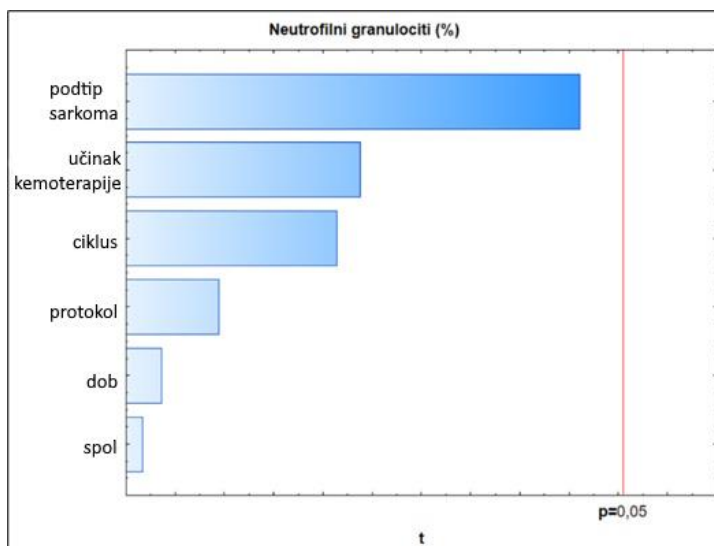
Slika 22. Pareto dijagrami t-vrijednosti povezanosti dobi, spola i podtipa sarkoma s vrijednostima parametara oksidacijskog stresa i upale izmjerenih u uzorcima periferne krvi bolesnika sa sarkomom prije terapije. Varijable koje prelaze crvenu liniju imaju statistički značajnu povezanost sa zavisnom varijablom

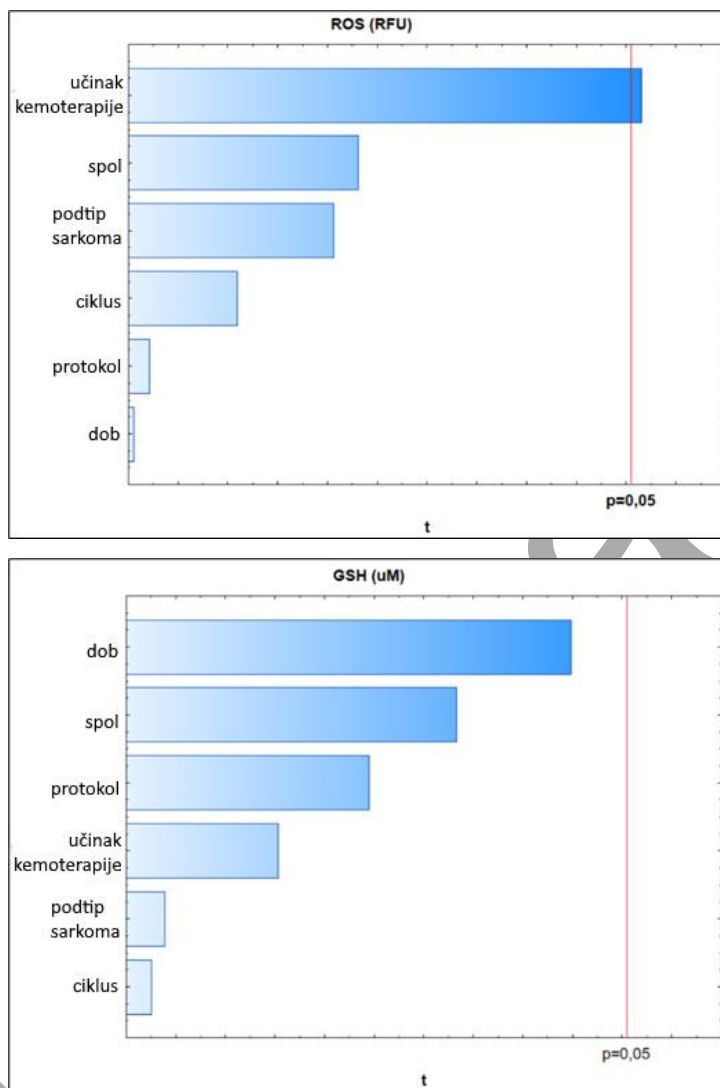
Kad se u obzir uzmu uzorci krvi sakupljeni prije i poslije kemoterapije iz Pareto dijagrama t-vrijednosti je vidljiva umjerena, statistički značajna korelacija između odabranih prediktorskih varijabli (dob, učinak kemoterapije, ciklus, protokol, vrsta sarkoma, spol) i vrijednosti CRP u uzorcima krvi bolesnika sa sarkomom prije terapije ($R=0,49$; $p=0,0464$) a varijable sa statistički značajnim doprinosom su jedino dob i učinak kemoterapije (**Slika 23**).

Statistički značajna korelacija je također utvrđena za leukocite ($R=0,43$; $p=0,0451$) te ROS ($R=0,52$; $p=0,0361$) i MDA ($R=0,57$; $p=0,0327$). Učinak kemoterapije je jedina statistički značajna prediktorska varijabla koja značajno korelira s brojem leukocita i razinom ROS-a dok za koncentraciju MDA, osim učinka kemoterapije, spol također ima statistički značajan doprinos. Za ostala tri mjerena parametra nije nađena statistički značajna povezanost s prediktorskim varijablama.

Ovi rezultati su u suglasju s rezultatima osnovne statistike gdje koncentracija CRP, broj leukocita, razina ROS-a i koncentracija MDA statistički značajno padaju nakon terapije.







Slika 23. Pareto dijagrami t-vrijednosti povezanosti odabranih prediktorskih varijabli s vrijednostima parametara upale i oksidacijskog stresa izmjerenih u uzorcima periferne krvi bolesnika sa sarkomom sakupljenima prije i poslije kemoterapije. Varijable koje prelaze crvenu liniju imaju statistički značajan utjecaj na zavisnu varijablu.

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj kemoterapije antraciklinima na metilacijski status gena *RBI*, oksidacijski stres i upalu u bolesnika sa sarkomom. Prema dostupnoj literaturi, ovo istraživanje je prvo koje je ispitalo epigenetske promjene gena *RBI* DNA izdvojene iz leukocita periferne krvi u bolesnika sa sarkomom zajedno s parametrima oksidacijskog stresa i upale.

Bolesnici uključeni u istraživanje prema tumorskom opterećenju grupirani su u tri grupe: tumorsko tkivo nije detektabilno (1), tumorsko opterećenje je malo do srednje veliko (2) te veliko tumorsko opterećenje (3). Kako bi se odredio mogući utjecaj kemoterapije antraciklinima na mjerene parametre, uzorci krvi sakupljeni su prije i poslije kemoterapije antraciklinima. Točnije, uzorci periferne krvi prikupljali su se prije primjene kemoterapije te 25. dan (+/- 1 dan) nakon zadnjeg ciklusa kemoterapije jer je tada lijek u potpunosti izlučen iz organizma, a njegovi metaboliti su zanemarivi.

Prilikom uključivanja bolesnika u istraživanje prikupljeni su podaci vezani uz spol bolesnika te dob. Od 51 bolesnika koji je sudjelovao u ovom istraživanju 55% je bilo muškaraca, dok je 45% bilo žena. Prema rezultatima RARECARE projekta, muškarci imaju nešto veću incidenciju sarkoma nego žene, što je u skladu s podacima ovog istraživanja (Stiller i sur., 2013). Prosječna dob bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje bila je za žene 48 godina, a za muškarce 52 godine. Raspon godina za žene bio je od 23 do 74 godine, a za muškarce od 20 do 67 godina. Taj je podatak u skladu s literaturnim podacima prema kojima rizik za pojavu STS i osteosarkoma raste s dobi (Stiller i sur., 2013). Najmlađi bolesnik muškog spola imao je 20 godina te mu je dijagnosticiran Ewingov sarkom. Najmlađa ženska bolesnica imala je 23 godine i dijagnozu osteosarkoma. Prema literaturnim podacima upravo od Ewingovog sindroma i osteosarkoma najčešće oboljevaju bolesnici u dobi od 15 do 24 godine (Stiller i sur., 2013). Ekstraskoletni osteosarkom se najčešće javlja u starijoj životnoj dobi te je i u ovom istraživanju grupa bolesnika s tim podtipom bila najstarija s rasponom godina od 57 do 60.

U skladu s očekivanom patohistološkom heterogenosti (WHO, 2020; Italiano i sur., 2021), u kohorti bolesnika uključenih u ovo istraživanje dijagnosticirano je 16 različitih podtipova sarkoma. Najčešće dijagnosticirani podtip među STS bio je leiomiosarkom, a sljedeći po učestalosti bio je dediferencirani liposarkom. Jednaka incidencija je uočena i u populacijskoj studiji na području Europe, u kojoj je među podtipovima drugi po pojavnosti bio liposarkom, a najčešće dijagnosticirani podtip upravo je bio dediferencirani liposarkom (Stiller i sur., 2013). Ostali dijagnosticirani podtipovi STS, osim sinovijalnog sarkoma (10%) koji se prema literaturi globalno pojavljuje u 5-10% svih STS (Eliason i sur., 2022) nisu prelazili 6%. Udio incidencije

ispod 5% za većinu podtipova STS objavljen je u literaturi (Stiller i sur., 2013). Prema objavljenim podacima, morfološki tipovi osteosarkoma javljaju se s 5-10 puta nižom učestalošću od STS (Misaghi i sur., 2018; Burningham i sur., 2012). U ovom istraživanju potvrđena je niska incidencija osteosarkoma budući da je od 51 bolesnika sa sarkomom, 5 bolesnika imalo dijagnosticiran osteosarkom.

U DNA izdvojenoj iz leukocita periferne krvi bolesnika sa sarkomom određen je CNV gena *RBI* istovremeno s metilacijskim statusom promotora CpG106 i introna 2 CpG85 metodom MS MLPA. CNV gena *RBI* nije nađena. Prethodna istraživanja pokazala su da se kod nasljednog retinoblastoma koji uključuje deleciju gena *RBI* sarkomi javljaju u 25-30% slučajeva kao sekundarne maligne bolesti. Kod takvih slučajeva najčešće dolazi do razvoja osteosarkoma, a rjeđe Ewingovog sarkoma, a bolest se pojavljuje u vrlo ranoj dobi, točnije u dobi bolesnika od 10 do 20 godina (Kleinerman i sur., 2007).

U ovom istraživanju prije kemoterapije promotorska regija CpG106 kod svih bolesnika bila je demetilirana, što je normalna razina metilacije kod zdravih osoba budući da gen *RBI* kodira protein pRB koji je prisutan u svim stanicama organizma. Metilacija introna 2 CpG85 prije kemoterapije antraciklinima bila je kod 50 bolesnika na razini od oko 50% što je u populaciji zdravih osoba normalna razina budući da je CpG85 intragenetski utisnuta regija metilirana na alelu majčinog porijekla, dok je na alelu očevog porijekla nemetilirana. Međutim, kod jedne bolesnice je prije kemoterapije antraciklinima u perifernoj krvi nađena povišena metilacija CpG85 za otprilike 10% te je kod analize prije kemoterapije antraciklinima ukupno iznosila 60%. Nakon liječenja kemoterapijom antraciklinima kod svih bolesnika metilacijski status regija CpG106 i CpG85 bio je na normalnoj razini, odnosno regija CpG106 bila je demetilirana, a metilacijski status CpG85 iznosio je otprilike 50%.

Bolesnica s aberantnom metilacijom regije CpG85 bila je ženskog spola u dobi od 48 godina te joj je dijagnosticiran dediferencirani liposarkom s ishodištem u području retroperitoneuma. Članovi obitelji bolesnice nisu obolijevali od malignih bolesti, osim oca kojem je dijagnosticiran rak želuca u dobi od 60 godina. Prema literaturnim podacima, roditeljsko porijeklo mutacija gena *RBI* povezuje sa sporadičnim nastankom osteosarkoma. Upravo zbog mutacija na alelu naslijeđenom od oca može doći do razvoja bolesti koja može biti različite penetrantnosti, a može se pojaviti u različitoj dobi bolesnika (Toguchida i sur., 1989). Metilacijski status *RBI* gena oca bolesnice nije određen te se ne može utvrditi da li je hipermetilacija od 10% genetski utisnutog otoka CpG85 roditeljskog porijekla. Bolesnica je imala malo do srednje tumorsko opterećenje (primarno tumorsko tkivo < 7 cm i/ili metastaze na jednom organu) te je sukladno planu onkološkog liječenja primala protokol kemoterapije

doksorubicinom u monoterapiji. Nakon četiri ciklusa kemoterapije doksorubicinom hipermetilacija CpG85 je bila snižena na normalnu razinu od 50%.

Podaci pojedinih istraživanja govore da imunološki procesi koji se povezuju s upalom kod razvoja tumora dovode do promjena subpopulacija leukocita i mogućih promjena metilacijskih obrazaca u stanicama periferne krvi (Teschendorff i sur., 2009; Li i sur., 2012). Međutim, mjereni parametri upale (CRP, leukociti, neutrofili) kod bolesnice s promijenjenom metilacijom CpG85 u uzorcima prije i nakon kemoterapije antraciklinima bili su u okviru referentnih vrijednosti. Stoga upala nije mogla imati utjecaja na izmjerenu hipermetilaciju gena *RBI*. I prijašnje studije koristile su DNA izdvojenu iz leukocita periferne krvi za praćenje epimutacija. Primjerice u istraživanju u kojem je praćena metilacija tumor supresorskih gena u DNA izdvojenoj iz leukocita periferne krvi u 80 bolesnica s rakom dojke nisu nađene epimutacije gena *RBI* koje bi imale utjecaj na nastanak tumora (Böck i sur., 2018).

Mutacije i epimutacije gena *RBI* često se javljaju u tumorskim stanicama retinoblastoma i osteosarkoma. Međutim, u ovom istraživanju upotrebom metode MS MLPA isključena je mogućnost da su analizirane promjene CNV-a i metilacijskog statusa gena *RBI* tumorskih cirkulirajućih stanica jer ih zbog njihove niske koncentracije u perifernoj krvi ovom metodom nije moguće detektirati. Stoga, analiza uzoraka DNA izdvojenih iz stanica periferne krvi isključuje detektiranje epigenetskih promjena koje bi mogle biti sastavni dio promjena u tumorskim stanicama (Friend i sur., 1986; Kvastad i sur., 2015).

Vezano uz terapiju antraciklinima do sada je istraživana metilacija gena koji su povezani kardiomiopatijom te je istraživanje Singh i sur. (2023) pokazalo da bi promijenjena metilacija pojedinih gena mogla igrati ulogu u patogenezi kardiomiopatija potaknutih antraciklinima.

U ovom istraživanju analizom DNA izolirane iz periferne krvi nađen je prvi slučaj hipermetilacije regije CpG85. Navedena promjena genetski utisnute regije CpG85 mogla bi se opisati kao konstitucijska epimutacija u formi niskog mozaika koja je nakon kemoterapije doksorubicinom snižena na razinu metilacijskog statusa zdrave osobe. Nađena promjena naglašava mogućnost utjecaja kemoterapije antraciklinima na metilacijski status gena *RBI* međutim potrebna su dodatna istraživanja koja bi odredila ulogu navedene epigenetske promjene u liječenju sarkoma. Bolesnica je do završetka ovog istraživanja bila bez znakova bolesti koji se povezuju sa dijagnozom dediferenciranog liposarkoma.

Dosadašnja brojna istraživanja naglasila su ulogu i povezanost sistemske upale i oksidacijskog stresa s progresijom malignih bolesti (Reuter i sur., 2010). Prema nekim studijama, parametri upale u perifernoj krvi kod pacijenata sa sarkomom povezuju se s lošijom prognozom razvoja bolesti (Cheng i sur., 2019; García-Ortega i sur., 2022). Meta-analiza Li i sur. (2016) pokazala

je da bolesnici čija je razina CRP-a u krvi prije liječenja bila viša imaju i veći rizik od lošijih ishoda bolesti. Također, to istraživanje je povezalopovišenu razinu CRP-a s nižim preživljenjem bolesnika sa STS i osteosarkomom. Meta-analiza koja je uključila 1655 bolesnika sa sarkomom utvrdila je da povišena razina CRP-a prije liječenja može poslužiti kao nezavisni faktor rizika za preživljenje ili ponovnu pojavu bolesti kod bolesnika sa STS (Wang i sur., 2019). Istraživanje Cheng i sur. (2019) u koje je uključeno 103 bolesnika sa sinovijalnim sarkomom pokazalo je da omjer neutrofila i leukocita te omjer limfocita i monocita mogu poslužiti kao nezavisni prognostički pokazatelji razvoja bolesti.

Oksidacijski stres je također uključen u razvoj malignih bolesti, uključujući karcinome poput melanoma, limfoma, leukemija, jajnika, bubrega i prostate (Reuter i sur., 2010). Stoga bi razumijevanje uloge oksidacijskog stresa u razvoju malignih bolesti dovelo do razvoja učinkovitih terapija u borbi protiv malignih bolesti. Povišene razine ROS dovode do poremećaja homeostaze u stanicima i pridonose gubitku normalnih staničnih funkcija, a koje su povezane s nastankom i progresijom raznih vrsta tumora. Važno je napomenuti da iako je oksidacijski stres povezan s razvojem tumora, također je uključen u razne fiziološke procese, uključujući imunološke odgovore i stanično signaliziranje (Iqbal i sur., 2024).

Na osnovu navedenih podataka iz literature, u ovom istraživanju je ispitivana povezanost razine oksidacijskog stresa (ROS, MDA, SOD i GSH) i upalnih parametara (CRP, leukocita i neutrofila) u uzorcima periferne krvi sakupljenima prije kemoterapije s tumorskim opterećenjem bolesnika sa sarkomom. Kako je već navedeno, bolesnici su prema tumorskom opterećenju grupirani u tri skupine: tumorsko tkivo nije detektabilno, tumorsko opterećenje je malo do srednje veliko te veliko tumorsko opterećenje. U uzorcima krvi sakupljenim na početku istraživanja primijećen je veliki raspon vrijednosti upalnih parametara (CRP, broj leukocita, udio neutrofila) te je samo 11 bolesnika imalo vrijednost CRP u referentnom intervalu. Usprkos velikom rasponu vrijednosti utvrđeno je da su vrijednosti upalnih parametara rasle s tumorskim opterećenjem. Koncentracija CRP kod bolesnika s velikim tumorskim opterećenjem bila je statistički značajno viša u odnosu na grupu bolesnika s nedektabilnim tumorom. Takvi rezultati su u skladu s objavljenim literaturnim podacima koji povišenu razinu upalnih parametara povezuju s lošijom prognozom bolesnika sa sarkomom (Cheng i sur. 2019; Wang i sur., 2019). Prema dostupnoj literaturi ovo istraživanje je prvo u kojem su parametri oksidacijskog stresa uspoređeni s tumorskim opterećenjem kod bolesnika sa sarkomom. Prethodno istraživanje Nathan i sur. (2011) uspoređivala je razinu oksidacijskog stresa u bolesnika sa sarkomom sa zdravim osobama. U tom istraživanju u pacijenata sa sarkomom bila je značajno viša razina MDA te značajno niža vrijednost GSH i aktivnost SOD i katalaze. U ovom istraživanju razina

oba mjerena antioksidansa (SOD, GSH) smanjivala s povećanjem tumorskog opterećenja, no značajno niža koncentracija s porastom tumorskog opterećenja zabilježen je samo za GSH. Snižena koncentracija GSH povezana je s povećanim rizikom od kroničnih bolesti kao i različitim degenerativnim bolestima (Pizzorno, 2014). Slično ovom istraživanju, Nathan i sur. (2011) utvrdili su nižu razinu antioksidansa kod bolesnika sa sarkomom u odnosu na zdrave osobe. Dobiveni rezultati su potvrđeni i regresijskom analizom koja je pokazala vrlo dobru korelaciju između mjerenih biokemijskih parametara i tumorskog opterećenja. β koeficijenti za CRP ($\beta=0,74$; $p<0,0000$) i GSH ($\beta=-0,43$; $p<0,0332$) ukazuju na to da njihova razina statistički značajno ovisi o tumorskom opterećenju.

Međunarodne smjernice za liječenje STS-a temeljem objavljenih podataka i meta-analiza još uvijek preporučuju kemoterapiju temeljenu na doksorubicinu jer značajno može poboljšati period bez progresije bolesti (PFS) i ukupno preživljenje (Casali i sur., 2010; Dangoor i sur., 2016). Doksorubicin se prema protokolima osim samostalno može primjenjivati i zajedno s drugim citotoksičnim lijekovima poput ifosfamida, dakarbazina, vinkristina, mitomicina i cisplatine pri čemu se ostvaruje nešto bolji PFS dok je učinak na ukupno preživljenje još uvijek nejasan (Bramwell i sur., 2003; Tanaka i sur., 2019). Postoje i drugi terapijski agensi kao primerice trabektidin, eribulin i pazopanib koji su odobreni za drugu liniju liječenja metastatskog STS-a.

U ovom istraživanju htio se utvrditi učinak terapije antraciklinima na bolesnike sa sarkomom. Stoga su uzorci krvi prikupljeni prije kemoterapije te nakon kemoterapije. S obzirom na to da je jedan od mehanizama djelovanja antraciklina oksidacijski stres, u ovom istraživanju uzorci periferne krvi prikupljali su se 25. dan (+/- 1 dan) nakon zadnjeg ciklusa jer je tada lijek u potpunosti izlučen iz organizma, a njegovi metaboliti su zanemarivi.

Primijenjena kemoterapija prema protokolu utjecala je na mjerene parametre oksidacijskog stresa. Razina ROS bila je značajno niža nakon kemoterapije u odnosu na razinu prije početka kemoterapije. Također, uočen je i značajan pad razine MDA nakon kemoterapije. Primijenjena kemoterapija nije značajnije utjecala na aktivnost antioksidacijskog enzima SOD te je aktivnost SOD bila nešto viša nakon kemoterapije, ali ne i statistički značajno. Također, i razina antioksidansa GSH pokazala je negativan trend nakon kemoterapije u odnosu na razinu prije kemoterapije, ali ne značajno. Prema dobivenim rezultatima za pretpostaviti je da je prema protokolu primijenjena kemoterapija antraciklinima utjecala na oksidacijski stres smanjujući razinu oksidansa (ROS, MDA) kod bolesnika sa sarkomom.

U uzorcima krvi nakon primjene kemoterapije zabilježena je značajno niža vrijednost CRP-a u odnosu na vrijednost tog upalnog markera prije kemoterapije. Također, nakon kemoterapije

značajno je smanjen i broj leukocita u odnosu na njihov broj u uzorcima sakupljenim prije kemoterapije. Udio neutrofila u uzorcima poslije kemoterapije je bio nešto niži u odnosu na prije kemoterapije, ali ne statistički značajno. Rezultati ovog istraživanja govore u prilog tome da primjenom kemoterapije antraciklinima može doći do smanjenja upale kod bolesnika sa sarkomom.

Jedan od mehanizama djelovanja antraciklina je poticanje stvaranja ROS koji oštećuju DNA i staničnu membranu te pokreću starenje stanice i smrt, pri čemu se javljaju i upalni procesi (Kciuk i sur., 2023; Jiang i sur., 2023). Vežanje doksorubicina na fosfolipidne komponente mitohondrijske membrane i njegov utjecaj na ETC rezultira povećanom proizvodnjom ROS. Također, antraciklini kroz reduktivan proces ovisan o željezu mogu potaknuti lipidnu peroksidaciju. Dodatno, mogu aktivirati proupalne puteve na način da utječu na transkripciju interleukina, uključujući IL-1beta i IL-6 (Vuong i sur. 2022).

Iako su antraciklini neposredni pokretači povećane proizvodnje ROS te mogu potaknuti upalne procese, u ovom istraživanju u uzorcima krvi nakon kemoterapije antraciklinima zabilježena je niža razina parametara oksidacijskog stresa (ROS, MDA) i upale (CRP, leukociti) u odnosu na razinu prije kemoterapije antraciklinima. Važno je naglasiti da su uzorci u ovom istraživanju prikupljeni 25. dan (+/- 1 dan) nakon zadnjeg ciklusa kemoterapije antraciklinima. Budući da je tada lijek izlučen iz organizma, nema direktan utjecaj na mjerene parametre oksidacijskog stresa i upale. Niže razine parametara oksidacijskog stresa i upale odražavaju dugoročni pozitivan učinak kemoterapije antraciklinima na oporavak bolesnika. Antitumorsko djelovanje antraciklina uključuje smanjenje proliferacije i nakupljanja tumorskih stanica te posljedično smanjenje upale koja prati tumorski proces. Također, inhibitoran utjecaj kemoterapije na hematopoezu može smanjiti količinu i aktivnost upalnih stanica u tkivu (uključujući tumor) kao i cirkulirajućih upalnih stanica, što dovodi do smanjenja upalnih parametara (Carvalho i sur., 2009).

Ograničenje ovog istraživanja je mali broj bolesnika koji su bili uključeni u istraživanje, što odražava mali broj bolesnika kojima se godišnje dijagnosticiraju rijetki tumori sarkoma te posljedično započinje kemoterapijsko liječenje. Iako je grupa bolesnika u ovom istraživanju imala dijagnosticirano 16 različitih podtipova sarkoma, nađena je statistički značajna razlika mjerenih parametara. U ovom istraživanju određen je metilacijski status gena *RBI* u leukocitima periferne krvi, no ti rezultati nisu uspoređeni s metilacijskim statusom gena *RBI* u tumorskom tkivu.

6. ZAKLJUČCI

1. Kod bolesnika sa sarkomom uključenih u istraživanje nisu nađene promjene u broju kopija gena *RBI* te je kod svih bolesnika promotorska regija CpG106 bila demetilirana. Regija introna 2 CpG85 kod svih bolesnika imala je normalnu razinu metilacije od 50%, izuzev jedne bolesnice sa malim do srednjim tumorskim opterećenjem kod koje je nađena hipermetilacija regije CpG85 od 10%. Ti rezultati pokazuju da bolesnici sa sarkomom mogu imati hipermetilaciju CpG otoka u intronu 2 gena *RBI*.
2. U bolesnika s većim tumorskim opterećenjem zabilježena je niža razina antioksidansa SOD i GSH, a razina ne-enzimskog antioksidansa GSH bila je statistički značajno niža u bolesnika s većim tumorskim opterećenjem što upućuje na povezanost antioksidacijske obrane s tumorskim opterećenjem kod bolesnika sa sarkomom.
3. Vrijednosti upalnih parametara (CRP, broj leukocita, udio neutrofila) bile su više kod bolesnika s većim tumorskim opterećenjem te je dobra pozitivna korelacija nađena između tumorskog opterećenja i upalnog parametra CRP što ukazuje na povezanost upale s napredovanjem bolesti.
4. Terapija antraciklinima kod bolesnice kod koje je nađena hipermetilacija od 10% regije CpG85 (ukupno 60%) smanjila je razinu metilacije na normalnu razinu od 50%. Nađena promjena naglašava mogućnost utjecaja kemoterapije antraciklinima na metilacijski status gena *RBI* međutim potrebna su dodatna istraživanja koja bi odredila ulogu navedene epigenetske promjene u liječenju sarkoma. Važno je naglasiti da je ženska bolesnica kod koje je nađena hipermetilacija CpG85 do završetka ovog istraživanja bila bez znakova bolesti koji se povezuju s dijagnozom dediferenciranog liposarkoma.
5. Primjena kemoterapije antraciklinima dovela je do smanjenja razine parametara oksidacijskog stresa ROS i MDA koji su nakon kemoterapije bili statistički značajno niži u odnosu na razinu prije primjene kemoterapije. Stoga se može zaključiti da je kemoterapija antraciklinima snizila razinu oksidacijskog stresa u bolesnika sa sarkomom.
6. Nakon primjene kemoterapije antraciklinima razina parametara upale (CRP, broj leukocita, udio neutrofila) bila je niža u odnosu na razinu prije primjene kemoterapije, a statistički značajno niža razina zabilježena je za CRP i broj leukocita. Ti rezultati govore u prilog tome da primjenom kemoterapije antraciklinima može doći do smanjenja upale kod bolesnika sa sarkomom.

7. Antitumorsko djelovanje antraciklina uključuje proupalne i prooksidacijske mehanizme, međutim smanjenje razine parametara oksidacijskog stresa i upale te snižena metilacija CpG85 gena *RBI* primjenom kemoterapije antraciklinima kroz određeno razdoblje ukazuje na pozitivne učinke kemoterapije.

Ocjena rada
u tijeku

7. LITERATURA

1. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
2. Baili P, Di Salvo F, Marcos-Gragera R, Siesling S, Mallone S, Santaquilani M, et al. EUROCORE-5 Working Group. Age and case mix-standardized survival for all cancer patients in Europe 1999-2007: results of EUROCORE-5, a population-based study. *Eur J Cancer*. 2015;51:2120-2129. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.025>
3. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado PA, Brulé AO, Araújo Mdo C, Schetinger MR, Morsch VM. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem*. 2008;41:511-518. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.01.027>
4. Bauer HC, Trovik CS, Alvegård TA, Berlin O, Erlanson M, Gustafson P, Klepp R, Möller TR, Rydholm A, Saeter G, Wahlström O, Wiklund T. Monitoring referral and treatment in soft tissue sarcoma: study based on 1,851 patients from the Scandinavian Sarcoma Group Register. *Acta Orthop Scand*. 2001;72:150-159 <https://doi.org/110.1080/0001647013173234085-10>
5. Böck J, Appenzeller S, Haertle L, Schneider T, Gehrig A, Schröder J, Rost S, Wolf B, Bartram CR, Sutter C, Haaf T. Single CpG hypermethylation, allele methylation errors, and decreased expression of multiple tumor suppressor genes in normal body cells of mutation-negative early-onset and high-risk breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2018;143:1416-1425. <https://doi.org/10.1002/ijc.31526>
6. Bonaïti-Pellié C, Briard-Guillemot ML. Segregation analysis in hereditary retinoblastoma. *Hum Genet*. 1981;57(4):411-419. <https://doi.org/10.1007/BF00281695>
7. Bramwell VH, Anderson D, Charette ML. Sarcoma Disease Site Group. Doxorubicin-based chemotherapy for the palliative treatment of adult patients with locally advanced or metastatic soft tissue sarcoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;2003:CD003293. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003293>
8. Brennan MF. Lessons learned from the study of soft tissue sarcoma. *Int J Surg*. 2013;11:8-10. [https://doi.org/10.1016/S1743-9191\(13\)60005-9](https://doi.org/10.1016/S1743-9191(13)60005-9)
9. Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res*. 2012;2:14. <https://doi.org/10.1186/2045-3329-2-14>

10. Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862:398-406. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.06.016>
11. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16:3267-3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>
12. Casali PG, Blay J-Y. ESMO/CONTICANET/EUROBONET Consensus Panel of experts. Soft tissue sarcomas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21:198-203. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq209>
13. Chaussade A, Millot G, Wells C, Brisse H, Laé M, Savignoni A, Desjardins L, Dendale R, Doz F, Aerts I, Jimenez I, Cassoux N, Stoppa Lyonnet D, Gauthier Villars M, Houdayer C. Correlation between RB1 germline mutations and second primary malignancies in hereditary retinoblastoma patients treated with external beam radiotherapy. *Eur J Med Genet*. 2019;62:217-223. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.07.017>
14. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9:7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
15. Cheng Y, Mo F, Pu L, Li Q, Ma X. Pretreatment Inflammatory Indexes as Prognostic Predictors of Survival in Patients Suffering From Synovial Sarcoma. *Front Oncol*. 2019;9:955. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00955>
16. Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*. 2000;177:68-78. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2000.17702.x>
17. Christensen LP, Christensen K. The Role of Direct and Indirect Polyphenolic Antioxidants in Protection Against Oxidative Stress. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 2013;1:289-309. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00023-2>
18. Coldwell KE, Cutts SM, Ognibene TJ, Henderson PT, Phillips DR. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:e100. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn439>

19. Collins JJ, Jammer B, Sladeczek FM, Bodnar CM, Salomon SS. Surveillance for angiosarcoma of the liver among vinyl chloride workers. *J Occup Environ Med.* 2014;56:1207-1209. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000247>
20. Dangoor A, Seddon B, Gerrand C, Grimer R, Whelan J, Judson I. UK guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Clin Sarcoma Res.* 2016;6:20. <https://doi.org/10.1186/s13569-016-0060-4>
21. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15:316-28. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
22. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
23. Domijan A-M, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Žanić-Grubišić T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL – application to various biological samples. *Biomed Chromatogr.* 2015;29:41-46. <https://doi.org/10.1002/bmc.3361>
24. Dries D, Baca K, Truss L, Dobin S. Interstitial deletion of 13q and a 13;X chromosome translocation results in partial trisomy 13 and bilateral retinoblastoma. *Ophthalmic Genet.* 2003;24:175-180. <https://doi.org/10.1076/opge.24.3.175.15612>
25. Duka I, Gerić M, Gajski G, Frišćić M, Maleš Ž, Domijan A-M, Turčić P. Optimization of a fast screening method for the assessment of low molecular weight thiols in human blood and plasma suitable for biomonitoring studies. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2019;55:275-280. <https://doi.org/10.1080/10934529.2019.1687236>
26. Dunnet M, Ortega-Recalde OJ, Waters SA. Leukocyte-specific DNA methylation biomarkers and their implication for pathological epigenetic analysis. *Epigenetics Commun.* 2022; 2, 5. <https://doi.org/10.1186/s43682-022-00011-z>
27. Eliason L, Grant L, Francis A, Cardellino A, Culver K, Chawla SP, Arbuckle R, Pokras S. Qualitative study to characterize patient experience and relevance of patient-reported outcome measures for patients with metastatic synovial sarcoma. *J Patient Rep Outcomes* 2022;6:43. <https://doi.org/10.1186/s41687-022-00450-1>
28. Evans DG, Birch JM, Thorneycroft M, McGown G, Lalloo F, Varley JM. Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet.* 2002;39:941-944. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.12.941>

29. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem.* 2003;312:224-227. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00506-7](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00506-7)
30. Fletcher CD. The evolving classification of soft tissue tumours - an update based on the new 2013 WHO classification. *Histopathology.* 2014;64:2-11. <https://doi.org/10.1111/his.12267>
31. Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med.* 2009;15:391-404. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.06.007>
32. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008;266:6-11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.026>
33. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986;323(6089):643-646. <https://doi.org/10.1038/323643a0>
34. García-Guede Á, Vera O, Ibáñez-de-Caceres I. When Oxidative Stress Meets Epigenetics: Implications in Cancer Development. *Antioxidants (Basel).* 2020;9:468. <https://doi.org/10.3390/antiox9060468>
35. García-Ortega DY, Melendez-Fernandez AP, Alvarez-Cano A, Clara-Altamirano MA, Caro-Sanchez C, Alamilla-Garcia G, Luna-Ortiz K. Neutrophil-to-Lymphocyte ratio as a prognostic biomarker in extremities undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Surg Oncol.* 2022;42:101746. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2022.101746>
36. Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I, Rossi, R. Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: a comparison among the most widely applied methodologies. *J. Chromatogr. B-Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005;851:124-39. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.031>
37. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94:651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
38. Hernández-Cruz EY, Arancibia-Hernández YL, Loyola-Mondragón DY, Pedraza-Chaverri J. Oxidative Stress and Its Role in Cd-Induced Epigenetic Modifications: Use of Antioxidants as a Possible Preventive Strategy. *Oxygen* 2022;2:177-210. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020015>
39. Ho RYN, Liebman, JF, Valentine JS. Overview of the Energetics and Reactivity of Oxygen. U: Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF (ur.). *Active Oxygen in Chemistry. Structure Energetics and Reactivity in Chemistry Series (SEARCH Series),*

- vol 2. Springer, Dordrecht; 1995; str. 1-23. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0874-7_1
40. Holland SL, Avery SV. Chromate toxicity and the role of sulfur. *Metallomics*. 2011;3:1119-1123. <https://doi.org/10.1039/c1mt00059d>
41. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411-421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
42. Howerton SB, Nagpal A, Williams LD. Surprising roles of electrostatic interactions in DNA-ligand complexes. *Biopolymers*. 2003;69:87-99. <https://doi.org/10.1002/bip.10319>
43. Hu F, Yu Y, Chen JS, Hu H, Scheet P, Huff CD. Integrated case-control and somatic-germline interaction analyses of soft-tissue sarcoma. *J Med Genet*. 2021;58:145-153. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106814>
44. Huang KP, Huang FL. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):1049-1056. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01175-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01175-9)
45. Hui JY. Epidemiology and Etiology of Sarcomas. *Surg Clin North Am*. 2016;96:901-914. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2016.05.005>
46. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*. 2010;6:e1001134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001134>
47. Iqbal MJ, Kabeer A, Abbas Z, Siddiqui HA, Calina D, Sharifi-Rad J, Cho WC. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. *Cell Commun Signal*. 2024;22:7. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01398-5>
48. Italiano A, Dinart D, Soubeyran I, Bellera C, Espérou H, Delmas C, et al. Molecular profiling of advanced soft-tissue sarcomas: the MULTISARC randomized trial. *BMC Cancer*. 2021;21:1180. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08878-2>
49. Jiang H, Zuo J, Li B, Chen R, Luo K, Xiang X, Lu S, et al. Drug-induced oxidative stress in cancer treatments: Angel or devil? *Redox Biol*. 2023;63:102754. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102754>
50. Jung I, Kim TY, Kim-Ha J. Identification of *Drosophila* SOD3 and its protective role against phototoxic damage to cells. *FEBS Lett*. 2011;585:1973-1978. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.033>

51. Kanber D, Berulava T, Ammerpohl O, Mitter D, Richter J, Siebert R, Horsthemke B, Lohmann D, Buiting K. The human retinoblastoma gene is imprinted. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000790. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000790>
52. Kantor B, Kaufman Y, Makedonski K, Razin A, Shemer R. Establishing the epigenetic status of the Prader-Willi/Angelman imprinting center in the gametes and embryo. *Hum Mol Genet.* 2004;13:2767-2779. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh290>
53. Katz D, Boonsirikamchai P, Choi H, Lazar AJ, Wang WL, Xiao L, Park MS, Ravi V, Benjamin RS, Araujo DM. Efficacy of first-line doxorubicin and ifosfamide in myxoid liposarcoma. *Clin Sarcoma Res.* 2012;2:2. <https://doi.org/10.1186/2045-3329-2-2>
54. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, Kontek R. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells.* 2023;12:659. <https://doi.org/10.3390/cells12040659>
55. Kim YS, Gupta Vallur P, Phaëton R, Mythreye K, Hempel N. Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer. *Antioxidants (Basel).* 2017;6:86. <https://doi.org/10.3390/antiox6040086>
56. Kleinerman RA, Tucker MA, Abramson DH, Seddon JM, Tarone RE, Fraumeni JF Jr. Risk of soft tissue sarcomas by individual subtype in survivors of hereditary retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:24-31. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk002>
57. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122:135-140. <https://doi.org/10.1007/BF01366952>
58. Kreuz S, Fischle W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics.* 2016;8:843-862. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0002>
59. Kvastad L, Werne Solnestam B, Johansson E, Nygren AO, Laddach N, Sahlén P, Vickovic S, Bendigtsen SC, Aaserud M, Floer L, Borgen E, Schwind C, Himmelreich R, Latta D, Lundeberg J. Single cell analysis of cancer cells using an improved RT-MLPA method has potential for cancer diagnosis and monitoring. *Sci Rep.* 2015;5:16519. <https://doi.org/10.1038/srep16519>
60. LactMed. Drugs and Lactation Database (LactMed®) [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development; 2006-. LactMed - Database Creation and Peer Review Process. Pristupljeno: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547434/>
61. Li GZ, Okada T, Kim YM, Agaram NP, Sanchez-Vega F, Shen Y, Tsubokawa N, Rios J, Martin AS, Dickson MA, Qin LX, Succi ND, Singer S. Rb and p53-Deficient Myxofibrosarcoma and Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma Require Skp2 for

- Survival. *Cancer Res.* 2020;80:2461-2471. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1269>
62. Li L, Choi JY, Lee KM, Sung H, Park SK, Oze I, Pan KF, You WC, Chen YX, Fang JY, Matsuo K, Kim WH, Yuasa Y, Kang D. DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *J Epidemiol.* 2012;22:384-394. <https://doi.org/10.2188/jea.je20120003>
63. Li Y, Liu X, Zhang J, Yao W. Prognostic role of elevated preoperative systemic inflammatory markers in localized soft tissue sarcoma. *Cancer Biomark.* 2016;16:333-342. <https://doi.org/10.3233/CBM-160571>
64. Mandapati A, Lukong KE. Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023;149:3701-3719. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04189-6>
65. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999;424:83-95. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00010-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00010-x)
66. Meister A. Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor. *J Nutr Sci Vitaminol. (Tokyo)* 1992;Spec No:1-6. https://doi.org/10.3177/jnsv.38.special_1
67. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* 1988; 263:17205-17208.
68. Methaneethorn J, Tengcharoen K, Leelakanok N, AIEjjetat R. Population pharmacokinetics of doxorubicin: A systematic review. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2023;19:9-26. <https://doi.org/10.1111/ajco.13776>
69. Meyer M, Seetharam M. First-Line Therapy for Metastatic Soft Tissue Sarcoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20:6. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0606-9>
70. Misaghi A, Goldin A, Awad M, Kulidjian AA. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT J.* 2018;4:12. <https://doi.org/10.1051/sicotj/2017028>
71. Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell.* 2008;30:755-766. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.007>
72. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38:23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
73. Morcos L, Ge B, Koka V, Lam KC, Pokholok DK, Gunderson KL, Montpetit A, Verlaan DJ, Pastinen T. Genome-wide assessment of imprinted expression in human cells. *Genome Biol.* 2011;12(3):R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-r25>

74. Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Uchida A, Sudo A. Clinical significance of pretreatment serum C-reactive protein level in soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2012;118:1055-1061. <https://doi.org/10.1002/cncr.26353>
75. Nathan FM, Singh VA, Dhanoa A, Palanisamy UD. Oxidative stress and antioxidative status in primary bone and soft tissue sarcoma. *BMC Cancer*. 2011;11:382. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/382>
76. Nishida N, Kudo M. Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis*. 2013;31:447-53. <https://doi.org/10.1159/000355243>
77. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol*. 2020;37:101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
78. Nozoe T, Korenaga D, Futatsugi M, Saeki H, Maehara Y, Sugimachi K. Immunohistochemical expression of C-reactive protein in squamous cell carcinoma of the esophagus - significance as a tumor marker. *Cancer Lett*. 2003;192:89-95. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00630-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00630-4)
79. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol*. 2016;17:9-17. <https://doi.org/10.1038/ni.3320>
80. Paksi Z, Jancsó A, Pacello F, Nagy N, Battistoni A, Gajda T. Copper and zinc binding properties of the N-terminal histidine-rich sequence of *Haemophilus ducreyi* Cu,Zn superoxide dismutase. *J Inorg Biochem*. 2008;102:1700-1710. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.04.007>
81. Pallardó FV, Markovic J, García JL, Viña J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med*. 2009;30:77-85. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.01.001>
82. Penel N, Grosjean J, Robin YM, Vanseymortier L, Clisant S, Adenis A. Frequency of certain established risk factors in soft tissue sarcomas in adults: a prospective descriptive study of 658 cases. *Sarcoma*. 2008;2008:459386. <https://doi.org/10.1155/2008/459386>
83. Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9:771-779. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.08.005>
84. Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet*. 2014;15:517-530. <https://doi.org/10.1038/nrg3766>

85. Pillozzi S, Bernini A, Palchetti I, Crociani O, Antonuzzo L, Campanacci D, Scoccianti G. Soft Tissue Sarcoma: An Insight on Biomarkers at Molecular, Metabolic and Cellular Level. *Cancers (Basel)*. 2021;13:3044. <https://doi.org/10.3390/cancers13123044>
86. Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas)*. 2014;13:8-12.
87. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*. 2010;17:421-433. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.012>
88. Radić Brkanac S, Gerić M, Gajski G, Vujčić V, Garaj Vrhovac V, Kremer D, Domijan A-M. Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;73:923-929. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.025>
89. Ralat LA, Misquitta SA, Manevich Y, Fisher AB, Colman RF. Characterization of the complex of glutathione S-transferase pi and l-cysteine peroxiredoxin. *Arch Biochem Biophys*. 2008;474:109-118. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.043>
90. Ramasubramanian A, Shields CL, Tasman W, Meadows AT, Knudson AG. *Retinoblastoma*, 1st Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers, Inc. 2012.
91. Reuter S, Gupta SC, Chatuvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1603-1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
92. Rudyk O, Eaton P. Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biol*. 2014;2:803-813. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.005>
93. Rutkowski P, Kaminska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine serum levels in soft tissue sarcoma patients: correlations with clinico-pathological features and prognosis. *Int J Cancer*. 2002;100:463-471. <https://doi.org/10.1002/ijc.10496>
94. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*. 1991;48:880-888.
95. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1412-1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
96. Schüler A, Weber S, Neuhäuser M, Jurklies C, Lehnert T, Heimann H, Rudolph G, Jöckel KH, Bornfeld N, Lohmann DR. Age at diagnosis of isolated unilateral retinoblastoma does not distinguish patients with and without a constitutional RB1 gene

- mutation but is influenced by a parent-of-origin effect. *Eur J Cancer*. 2005;41:735-740. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.12.022>
97. Shi H., Noguchi N., Niki E. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27:334-346. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00053-2)
98. Siemes C, Visser LE, Coebergh JW, Splinter TA, Witteman JC, Uitterlinden AG, Hofman A, Pols HA, Stricker BH. C-reactive protein levels, variation in the C-reactive protein gene, and cancer risk: the Rotterdam Study. *J Clin Oncol*. 2006;24:5216-5222. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.1381>
99. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol*. 1997;82:291-295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
100. Singh P, Zhou L, Shah DA, Cejas RB, Crossman DK, Jouni M, Magdy T, Wang X, Sharafeldin N, Hageman L i sur. Identification of novel hypermethylated or hypomethylated CpG sites and genes associated with anthracycline-induced cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2023;13:12683. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39357-2>
101. Starzer AM, Berghoff AS, Hamacher R, Tomasich E, Feldmann K, Hatzioannou T, Traint S, Lamm W, Noebauer-Huhmann IM, Furtner J, Müllauer L, Amann G, Bauer S, Schildhaus HU, Preusser M, Heller G, Brodowicz T. Tumor DNA methylation profiles correlate with response to anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor monotherapy in sarcoma patients. *J Immunother Cancer*. 2021;9:e001458. <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2020-001458>
102. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirlaque MD, Casali PG; RARECARE Working Group. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. *Eur J Cancer*. 2013;49:684-695. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.09.011>
103. Strachan T, Goodship J and Chinnery P. *Genetics and Genomics in Medicine*. Garland Science. 2014. ISBN: 978-0-8153-4480-3
104. Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 1984;308(5959):548-550. <https://doi.org/10.1038/308548a0>
105. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140:805-820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

106. Tanaka K, Kawano M, Iwasaki T, Itonaga I, Tsumura H. Surrogacy of intermediate endpoints for overall survival in randomized controlled trials of first-line treatment for advanced soft tissue sarcoma in the pre- and post-pazopanib era: a meta-analytic evaluation. *BMC Cancer*. 2019;19:56. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5268-2>
107. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Gayther SA, Apostolidou S, et al. An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. *PLoS One*. 2009;4:e8274 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008274>
108. Toguchida J, Ishizaki K, Sasaki MS, Nakamura Y, Ikenaga M, Kato M, Sugimoto M, Kotoura Y, Yamamuro T. Preferential mutation of paternally derived RB gene as the initial event in sporadic osteosarcoma. *Nature*. 1989;338:156-158.
109. Trama A, Badalamenti G, Baldi GG, Brunello A, Caira M, Drove N, Marrari A, Palmerini E, Vincenzi B, Dei Tos AP, Grignani G. Soft tissue sarcoma in Italy: From epidemiological data to clinical networking to improve patient care and outcomes. *Cancer Epidemiol*. 2019;59:258-264. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.02.012>
110. Tsang WP, Chau SP, Kong SK, Fung KP, Kwok TT. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci*. 2003;73:2047-2058. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00566-6](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00566-6)
111. Tsuyoshi H, Yoshida Y. Molecular biomarkers for uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. *Cancer Sci*. 2018;109:1743-1752. <https://doi.org/10.1111/cas.13613>
112. Valluru L, Dasari S, Wudayagiri R. Role of free radicals and antioxidants in gynecological cancers: current status and future prospects. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*. 2014;3:15-26. <https://doi.org/10.5455/oams.201113.rv.011>
113. Verschoor, AJ, Litière, S, Marréaud, S, Judson I, Toulmonde M, Wardelmann E, et al. Survival of soft tissue sarcoma patients after completing six cycles of first-line anthracycline containing treatment: an EORTC-STBSG database study. *Clin Sarcoma Res*. 2020;10:18. <https://doi.org/10.1186/s13569-020-00137-5>
114. Voitkun V, Zhitkovich A. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutat Res*. 1999;424:97-106. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00011-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00011-1)
115. Vuong JT, Stein-Merlob AF, Cheng RK, Yang EH. Novel Therapeutics for Anthracycline Induced Cardiotoxicity. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:863314. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.863314>

116. Wang X, Liu S, Zhao X, Fang E, Zhao X. The value of C-reactive protein as an independent prognostic indicator for disease-specific survival in patients with soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *PloS One*. 2019;14:e0219215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219215>
117. WHO. Classification of Tumors Editorial Board. Soft tissue and Bone Tissue Tumors. 5th ed. I Lyon: IARC; 2020.
118. Wigner P, Szymanska B, Bijak M, Sawicka E, Kowal P, Marchewka Z, Saluk-Bijak J. Oxidative stress parameters as biomarkers of bladder cancer development and progression. *Sci Rep*. 2021;11:15134. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94729-w>
119. Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol*. 2014;542:243-262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3>
120. Worch J, Matthay KK, Neuhaus J, Goldsby R, DuBois SG. Ethnic and racial differences in patients with Ewing sarcoma. *Cancer*. 2010;116:983-988. <https://doi.org/110.1002/cncr.24865>
121. Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature*. 1997 16;389(6652):745-749. <https://doi.org/10.1038/39631>
122. Xu J, Su X, Burley SK, Zheng XFS. Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11:427. <https://doi.org/10.3390/antiox11020427>
123. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med*. 2009;30:29-41. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.003>
124. Zaidieh H, Smith JR, Ball KE, An Q. ROS as a novel indicator to predict anticancer drug efficacy. *BMC Cancer*. 2019;19:1224. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6438-y>
125. Zampieri M, Ciccarone F, Calabrese R, Franceschi C, Bürkle A, Caiafa P. Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mech Ageing Dev*. 2015;151:60-70. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.02.002>
126. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:337-349.
127. Zhang Y, Lu X, Zhang Y, Zhao D, Gong H, Du Y, Sun H. The Effect of Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3) Gene in Lung Cancer. *Front Oncol*. 2022;12:722646. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.722646>

128. Zhao X, Wu Q, Gong X, Liu J, Ma Y. Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches. *Biomed Eng Online*. 2021;20:24. <https://doi.org/10.1186/s12938-021-00860-0>
129. Zheng M, Liu Y, Zhang G, Yang Z, Xu W, Chen Q. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12:1675. <https://doi.org/10.3390/antiox12091675>

<https://www.mrcholland.com/technology/mlpa>

<https://www.mrcholland.com/technology/mlpa>

Ocjena rada
u tieku

8. SAŽETAK

Sarkomi su heterogena grupa tumora s velikim brojem histoloških podtipova. Prema ishodištu dijele se na sarkome mekih tkiva i sarkome koštanog podrijetla. S obzirom na nisku incidenciju (do 1% udjela među tumorima ukupno), sarkomi pripadaju rijetkim malignim bolestima što otežava sustavno prikupljanje i istraživanje podataka. Za liječenje sarkoma koriste se antraciklini koji su do danas osnova kemoterapije zbog njihovog povoljnog antineoplastičnog djelovanja. Glavni cilj ovog istraživanja bio je usporediti razinu oksidacijskog stresa, upale i promjene u broju kopija i metilacije gena *RBI* u bolesnika sa sarkomom prije i nakon kemoterapije kako bi se utvrdio učinak kemoterapije antraciklinima na mjerene parametre. Također, ispitana je povezanost parametara oksidacijskog stresa, upale i broja kopija i metilacije gena *RBI* prije kemoterapije s tumorskim opterećenjem bolesnika.

U istraživanju su dobrovoljno sudjelovali bolesnici sa sarkomom (n=51) zaprimljeni na liječenje u KBC Zagreb. Na osnovu zahvaćenosti organizma tumorom prije kemoterapije bolesnici su grupirani u tri grupe ovisno o tumorskom opterećenju. Uzorci periferne krvi sakupljeni su prije kemoterapije te nakon 3-5 ciklusa kemoterapije. U DNA izdvojenoj iz leukocita periferne krvi bolesnika prije i nakon kemoterapije MS-MLPA metodom utvrđen je broj kopija i metilacijski status *RBI* gena. U uzorcima krvi određeni su parametri oksidacijskog stresa (ROS, MDA, SOD i GSH) te parametri upale (CRP, broj leukocita i udio neutrofila). Promjene u broju kopija gena *RBI* nisu nađene te je kod svih bolesnika promotorska regija CpG106 bila demetilirana. Regija introna 2 CpG85 kod svih bolesnika imala je normalnu razinu metilacije od 50%, izuzev jedne bolesnice sa malim do srednjim tumorskim opterećenjem kod koje je nađena hipermetilacija regije CpG85 od 10%, a nakon terapije antraciklinima hipermetilacija CpG85 smanjila se na normalnu razinu metilacije od 50%. Prije kemoterapije parametri upale (CRP, broj leukocita, udio neutrofila) bili su viši, a razina antioksidansa SOD i GSH niža u bolesnika s većim tumorskim opterećenjem. Kemoterapija antraciklinima dovela je do smanjenja razine parametara oksidativnog stresa ROS i MDA kao i parametara upale (CRP, broj leukocita, udio neutrofila) koji su nakon kemoterapije bili statistički značajno niži u odnosu na razinu prije primjene kemoterapije. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da bolesnici sa sarkomom mogu imati promjenu u metilaciji gen *RBI* te su potvrdili da se viša razina oksidacijskog stresa i upale može povezati s većim tumorskim opterećenjem. Smanjenje razine parametara oksidacijskog stresa i upale te snižena metilacija CpG85 gena *RBI*

primjenom kemoterapije antraciklinima ukazuje na pozitivne učinke kemoterapije, unatoč njenim proupalnim i prooksidativnim mehanizmima djelovanja.

Ocjena rada
u tijeku

9. SUMMARY

Sarcomas are a heterogeneous group of tumors, with various histological subtypes divided into soft tissue and bone sarcomas. Due to their low incidence (less than 1% of all tumors), sarcomas are considered rare diseases, making the collection and analysis of data more challenging. Anthracyclines are used as the primary chemotherapy for sarcomas because of their favorable antineoplastic effects. This study aimed to compare levels of oxidative stress, inflammation, and changes in the copy number and methylation of the RB1 gene in patients with sarcoma before and after the chemotherapy. Additionally, the study examined the relationship between these parameters and the tumor burden of the patients.

The study involved 51 patients with sarcoma, grouped according to their tumor burden. Peripheral blood samples were collected before and after 3-5 cycles of anthracycline-based chemotherapy treatment. Using the MS-MLPA method, the copy number and methylation status of the RB1 gene were analyzed. Levels of oxidative stress (ROS, MDA, SOD, GSH) and inflammation (CRP, leukocyte count, neutrophil percentage) were also measured. The results showed no changes in the copy number of the RB1 gene, and the promoter region CpG106 was demethylated in all patients. One patient with low to moderate tumor burden exhibited 10% higher hypermethylation of imprinting region CpG85, which normalized to 50% after anthracycline-based chemotherapy treatment. Before chemotherapy, patients with higher tumor burdens had elevated levels of inflammatory parameters (CRP, leukocyte count, neutrophil percentage) and lower levels of the antioxidants SOD and GSH. Following anthracycline-based chemotherapy treatment, there was a significant decrease in oxidative stress parameters (ROS, MDA) and inflammatory (CRP, leukocyte count, neutrophil percentage) levels, with statistically significant results. These findings suggest that patients with sarcoma can have changes in the methylation of the RB1 gene and that higher levels of oxidative stress and inflammation may be associated with greater tumor burden. The reduction of these parameters following chemotherapy indicates the beneficial effectiveness of anthracycline-based chemotherapy despite its acute pro-inflammatory and pro-oxidative mechanisms of action.

10. ŽIVOTOPIS

Anita Pokupec Bilić rođena je 15. veljače 1979. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje u 2. (općoj) gimnaziji u Zagrebu. Godine 2003. završava studij na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje i stječe titulu magistre edukacije biologije. Osim toga, tijekom svog djetinjstva pohađala je osnovnu glazbenu školu "Vatroslav Lisinski", gdje je stekla znanje i vještinu sviranja klavira. Nakon završetka studija, 2004. godine zapošljava se u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog gdje je radila kao stručni suradnik. Tijekom ovog razdoblja, sudjelovala je u raznim istraživačkim projektima i aktivnostima edukacije posjetitelja. U srpnju 2007. prelazi na Medicinski fakultet u Zagrebu, gdje radi kao referent na Odsjeku za dodiplomsku nastavu, a od 2016. godine zaposlena je na radnom mjestu biologa citogenetičara u KBC-u Zagreb, na Odjelu za citogenetiku. Autorica je i suradnica na više znanstvenih i stručnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima. Članica je Hrvatskog društva biologa u zdravstvu. Aktivno sudjeluje na domaćim i inozemnim znanstvenim i stručnim skupovima te tečajevima usavršavanja iz citogenetike, molekularne genetike i primijenjene genomike, čime dodatno unapređuje svoje znanje i vještine u području dijagnostike.

Popis objavljenih publikacija:

Pokupec Bilić A, Bilić I, Radić Brkanac S, Simetić L, Blažičević K, Herceg D, Mikloš M, Tonković Đurišević I, Domijan AM Methylation status of RB1 gene and parameters of oxidative stress and inflammation in sarcoma patients – a preliminary study // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75, Supp. 1, 2024. str. 124-124

Pokupec Bilic A, Miklos M, Tonkovic Djurisevic I, Bilic I, Dumic Kubat. Uncommon mosaicism within XYY syndrome manifested as a short stature. Eur J Hum Genet., 2024. EP14.005 – 57th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference 1 - 4 june 2024, Berlin, Germany.

Tonkovic Djurisevic I, Huljev Frkovic S, Miklos M, **Pokupec Bilic A**. Molecular karyotyping, MLPA and FISH of microdeletions and microduplications in the proximal and distal regions of chromosome 22q11.2. Eur J Hum Genet., 2024. EP14.004 – 57th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference 1 - 4 june 2024, Berlin, Germany.

Pokupec Bilic A, Bilic I, Radic Brkanac S, Simetic S, Blazicevic K, Herceg K, Miklos M, Tonkovic Durisevic I, Domijan AM. **2024**. Impact of anthracycline-based chemotherapy on RB1 gene methylation in peripheral blood leukocytes and biomarkers of oxidative stress and inflammation in sarcoma patients. *Clinical and Translational Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12094-023-03375-3>

Pokupec Bilic A, Miklos M, Tonkovic Djurisevic I, Leona Morožin Pohovski, Ivan Bilic, Mijana Kero. 2022. Satellited chromosome 20 - the importance of cytogenetic and FISH analysis. *Eur J Hum Genet.*, 2023 EP15.005 – 55th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference 11-14 june 2022, Vienna, Austria, str. 273.

Miklos M, **Pokupec Bilic A**, Tonkovic Djurisevic I, Crkvenac Gornik K, Huljev Frkovic S. 2022. Clinical and cytogenetic correlation in a case of tetrasomy 9p syndrome. *Eur J Hum Genet.*, 2023 EP12.011 – 55th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference 11-14 june 2022, Vienna, Austria, str. 219.

Pokupec Bilic A, Double trisomy in second trimester of pregnancy. *Knjiga sažetaka – 8. hrvatski kongres studenata doktorskog studija Molekularne bioznanosti, 3. listopada 2020., online konferencija*, str. 67.

Milković I, Tonković Đurišević I, Crkvenac Gornik K, **Pokupec Bilić A**, Vidaković V, Huljev Frković S. 2021. Clinical, cytogenetic and molecular findings in patients with Pallister-Killian syndrome. *Archives of Disease in childhood*, 2021, 106(Suppl 2) 85 - 10th Europaediatrics Congress, 7–9 October 2021 Zagreb, Croatia, str. 36

Crkvenac Gornik K, Tonković Đurišević I, **Pokupec Bilić A**, Huljev Frković S. 2019. Interstitial 14q31.3 q32.13 deletion the role of molecular karyotyping in clarifying the etiology of developmental delay. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*, 2019;1: 48-51

Crkvenac Gornik K, Tonković Đurišević I, **Pokupec Bilić A**, Huljev Frković S. 2019. Interstitial 14q31.3 q32.13 deletion the role of molecular karyotyping in clarifying the etiology of developmental delay. *Molecular Cytogenetics* 2019., 12(Suppl 1):1.P59 – 12th European Cytogenomics Conference 6 - 9 july 2019. Salzburg, Austria, str. 37-37.

Tonković Đurišević I, Crkvenac Gornik K, **Pokupec Bilić A**, Huljev Frković S. 2019 The applicability of array CGH and MLPA for the detection of an unbalanced translocation. *Molecular Cytogenetics* 2019., 12(Suppl 1):1 P60 – 12th European Cytogenomics Conference 6 - 9 July 2019. Salzburg, Austria, str. 37-38.

Crkvenac Gornik K, Tonković Đurišević I, Huljev Frković S, **Pokupec Bilić A**, Davidović Mrsić S. 2018. Uloga molekularne kariotipizacije u razjašnjavanju razvojnog zaostajanja. Zbornik sažetaka 13. Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem – 2. Hrvatski simpozij biologa u zdravstvu. Kružić, P. Caput Mihalić, K. Gottstein, S., Pavoković, D., Kučinić, M.(ur.). Zagreb, Croatian Biological Society, str. 172-173.

Tonković Đurišević I, Crkvenac Gornik K, Huljev Frković S, **Pokupec Bilić A**, S. Davidović Mrsić. 2018. Otkrivanje poremećaja genomskog utiskivanja metodom MS MLPA. Zbornik sažetaka 13. Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem – 2. Hrvatski simpozij biologa u zdravstvu. Kružić, P. Caput Mihalić, K. Gottstein, S., Pavoković, D., Kučinić, M.(ur.). Zagreb, Croatian Biological Society, str. 172-173.

Mihelj D, Fertalj D, Nikolić T, **Pokupec A**, 2007. Database for plant collection data in Zagreb Botanical garden. The 2nd International Conference of Eastern and Central European Botanic garden - EastCentGard II. "European botanic gardens together towards the implementation of plant conservation strategies". Puchalski, J. (ur.) Warsaw/Rogów: Académie Polonaise des Sciences, str. 49-50.