

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Igor S. Plješa

**ULOGA GLUTATION TRANSFERAZA  
KAO BIOMARKERA RIZIKA ZA  
NASTANAK  
KARCINOMA JAJNIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Dr Igor S. Plješa

**GLUTATHIONE TRANSFERASES AS  
BIOMARKERS OF RISK IN OVARIAN  
CANCER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

**MENTOR:**

Prof. dr Milica Berisavac, profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

**KOMENTOR:**

Prof. dr Ana Savić-Radojević, profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

1. Prof. dr Tatjana Simić, profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Tatjana Pekmezović, profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Bošković, profesor u penziji Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

# ULOGA GLUTATION TRANSFERAZA KAO BIOMARKERA RIZIKA ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA

## SAŽETAK

**Uvod:** Smatra se da karcinom jajnika ne treba posmatrati kao izolovani entitet, jer nastaje kao posledica akumulacije većeg broja genskih promena. Pokazano je da polimorfna ekspresija glutacion S-transferaza (GST), zbog njihove značajne uloge u metabolizmu kancerogena, može uticati kako na podložnost za nastanak karcinoma jajnika, tako i na progresiju bolesti.

**Cilj:** Ovaj rad je imao za cilj da se ispita polimorfna ekspresija citosolnih glutacion S-transferaza (M1, T1, A1, P1 i O2) i njihov značaj u riziku za nastanak karcinoma jajnika, njegovoj progresiji i preživljavanju obolelih.

**Metode:** Izvedena je studija slučajeva i kontrola koja je obuhvatila 103 pacijentkinje sa karcinomom jajnika i 178 odgovarajućih kontrola. Prisustvo homozigotne delecije *GSTM1* i *GSTT1* gena je ispitivano primenom multipleks metode reakcije lančanog umnožavanja (PCR). Polimorfizmi jednog nukleotida ispitivani su analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP) za *GSTA1 C69T*, odnosno metodom kvantitativnog PCR (qPCR) za *GSTP1 Ile105Val* i *GSTO2 A142G* polimorfizme. Uticaj GST genotipova na rizik za smrtni ishod analiziran je pomoću Cox regresione analize, a verovatnoća preživljavanja je analizirana pomoću *Kaplan Meier* metode tokom 36 meseci praćenja.

**Rezultati:** Nije uočena značajna povezanost individualnih *GSTM1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2* genotipova sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika ( $p > 0,05$ ). Međutim, žene nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa su bile u 2-puta povećanom riziku za obolevanje od karcinoma jajnika (95%CI: 1.00-4.01,  $p = 0.049$ ), što je bilo još očiglednije kod pacijentkinja sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma, a kod kojih se i *GSTO2-varijantni* genotip pokazao značajnim pokazateljem rizika (OR=5,16, 95%CI: 0.99-26,89,  $p = 0,050$ ). Učestalost kombinovanog *GSTT1-aktivni/GSTA1-aktivni/GSTP1-referentni* genotipa je bila značajno veća u grupi pacijentkinja u odnosu na kontrolnu grupu ( $p = 0,042$ )

i može se dovesti u vezu sa rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika. Štaviše, pacijentkinje nosioci ove kombinacije genotipa su predstavljale preko 64% od ukupnog broja pacijentkinja unutar bilo kog FIGO stadijuma (Internacionalna federacija za ginekologiju i akušerstvo). Kada je u pitanju individualna povezanost sa agresivnošću bolesti, samo se učestalost *GSTA1* genotipova može dovesti u vezu sa FIGO stadijumom karcinoma jajnika ( $p=0.047$ ). Analiza povezanosti GST genotipa sa preživljavanjem kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika je pokazala da su pacijentkinje nosioci *GSTP1 ValVal* genotipa imale značajno kraće preživljavanje u toku perioda praćenja ( $p=0,032$ ).

**Zaključci:** Rezultati ovog istraživanja govore u prilog uloge koju GST mogu imati u riziku za nastanak i progresiji karcinoma jajnika. Pored toga, GST genotip može imati prognostičku ulogu kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika.

**Ključne reči:** glutation S-transferaze, karcinom jajnika, polimorfizam, rizik, preživljavanje

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Humana reprodukcija

# GLUTATHIONE TRANSFERASES AS BIOMARKERS OF RISK IN OVARIAN CANCER

## ABSTRACT

**Introduction:** It has been proposed that ovarian cancer should not be considered as a single disease entity and that it results from an accumulation of genetic changes. Several studies have shown that polymorphisms of glutathione S-transferases (GSTs), due to their important role in the modulation of the biological effects of carcinogens, could also affect susceptibility to ovarian cancer, as well as, disease progression.

**The aim:** We aimed to assess polymorphic expression of cytosolic glutathione S-transferases (M1, T1, A1, P1 and O2) with respect to ovarian cancer susceptibility, aggressiveness and survival.

**Methods:** The case-control study was conducted on 103 newly diagnosed ovarian cancer patients and 178 matched controls. The multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used to detect homozygous deletions of *GSTM1* and *GSTT1* genes. The analysis of the single nucleotide polymorphism (SNP) *GSTA1 C69T* was performed using PCR-restriction fragment length polymorphism, while for SNP *GSTP1 Ile105Val* and *GSTO2 A142G* using the real-time PCR. Cox proportional hazard model and Kaplan Meier analysis were performed to investigate the role of GST genetic polymorphism on mortality of patients with ovarian cancer during 36 months follow-up period.

**Results:** No significant association to ovarian cancer risk was found for individual *GSTM1*, *GSTA1*, *GSTP1* and *GSTO2* genotypes ( $p > 0.05$ ). However, the carriers of *GSTT1-active* genotype were at 2-fold higher risk of ovarian cancer development (95%CI: 1.00-4.01,  $p = 0.049$ ), which was even more elevated in subgroup of patients with positive familial history of cancer, in which *GSTO2-variant* genotype was also recognized as determinant of risk (OR= 5.16, 95%CI: 0.99-26.89,  $p = 0.050$ ). The frequency of combined *GSTT1-active/GSTA1-active/GSTP1-referent* genotype was significantly higher in patients than in control group ( $p = 0.042$ ) and might be associated to ovarian cancer risk. Even more,

patients who were carriers of combination of these three genotypes represented over 64% out of total number of patients within any of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stages of ovarian cancer. Regarding individual association to disease aggressiveness, only *GSTA1* genotype distribution could be associated to FIGO staging of ovarian cancer ( $p=0.047$ ). Analysis of potential prognostic role of GST genotype in ovarian cancer patients showed that patients carriers of *GSTP1 ValVal* genotype had shorter mean survival probability during the follow-up period ( $p=0.032$ ).

**Conclusions:** This study provides supportive evidence that GSTs might affect both susceptibility and progression of ovarian cancer. Furthermore, GST genotype might have prognostic role in ovarian cancer patients.

**Key words:** glutathione S-transferase, ovarian cancer, polymorphism, risk, survival

**Research area:** Medicine

**Research field:** Human reproduction

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. KARCINOM JAJNIKA.....	1
1.1.1. Epidemiološke karakteristike karcinoma jajnika.....	1
1.1.2. Faktori rizika.....	3
1.1.3. Kancerogeneza tumora jajnika.....	6
1.1.4. Simptomi i klinička slika karcinoma jajnika.....	8
1.2. DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA KARCINOMA JAJNIKA.....	11
1.2.1. Klasifikacija karcinoma jajnika.....	11
1.2.1.1. Površni epitelni tumori.....	11
1.2.1.2. Tumori porekla specijalizovane ovarijalne strome i embrionalnih gonada.....	13
1.2.1.3. Tumori porekla germinativnih ćelija.....	16
1.2.1.4. Ostali tumori jajnika.....	17
1.2.2. Histološko gradiranje karcinoma jajnika.....	18
1.2.3. Histološka tipizacija.....	19
1.2.4. Određivanje stadijuma karcinoma jajnika.....	21
1.2.4.1. FIGO klasifikacija karcinoma jajnika.....	21
1.2.5. Dijagnostički postupci kod karcinoma jajnika.....	24
1.2.6. Skrining karcinoma jajnika.....	26
1.2.6.1. Porodična anamneza kao faktor skrininga.....	27
1.2.7. Terapijski postupci kod karcinoma jajnika.....	28
1.2.7.1. Terapijski plan za rane stadijume karcinoma jajnika.....	28
1.2.7.2. Terapijski plan za uznapredovali karcinoma jajnika.....	29
1.2.7.3. Tretman perzistentne ili rekurentne bolesti.....	29
1.2.7.4. Lečenje <i>borderline</i> tumora.....	29
1.2.7.5. Praćenje pacijentkinja u remisiji ( <i>follow-up</i> ).....	30



1.2.7.6.	Sistemsko lečenje epitelijalnog karcinoma jajnika.....	30
1.3.	ULOGA GLUTATION S-TRANSFERAZE U KARCINOMU JAJNIKA.....	31
1.3.1.	Glutation S-transferaza.....	31
1.3.2.	Polimorfizam glutation S-transferaza u karcinomu jajnika.....	35
1.3.2.1.	Polimorfizam <i>GSTAI</i> .....	35
1.3.2.2.	Polimorfizam <i>GSTMI</i> .....	36
1.3.2.3.	Polimorfizam <i>GSTP1</i> .....	37
1.3.2.4.	Polimorfizam <i>GSTTI</i> .....	37
1.3.2.5.	Polimorfizam <i>GSTO2</i> .....	38
1.3.2.6.	Značaj polimorfizma <i>GST</i> u riziku za nastanak karcinoma jajnika.....	38
<b>2.</b>	<b>CILJ RADA.....</b>	<b>39</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>40</b>
3.1.	SELEKCIJA ISPITANICA.....	40
3.2.	ODREĐIVANJE POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA.....	42
3.2.1.	Izolacija DNK.....	42
3.2.2.	Određivanje <i>GSTMI</i> i <i>GSTTI</i> polimorfizma.....	43
3.2.3.	Određivanje <i>GSTAI C69T</i> polimorfizma.....	45
3.2.4.	Određivanje <i>GSTP1 Ile105Val</i> polimorfizma.....	47
3.2.5.	Određivanje <i>GSTO2</i> polimorfizma.....	48
3.3.	STATISTIČKA ANALIZA.....	49
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>51</b>
4.1.	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE MANIFESTACIJE ISPITANICA.....	51
4.2.	GENSKI POLIMORFIZIM GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA.....	53
4.2.1.	Delecioni polimorfizmi glutation transferaze i rizik za nastanak karcinoma jajnika.....	53
4.2.2.	Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida glutacion transferaza i rizik za nastanak karcinoma jajnika.....	54
4.2.3.	Polimorfizam glutacion transferaza <i>O2</i> i rizik za nastanak karcinoma jajnika.....	56

4.3.	GENSKI POLIMORFIZMI GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA KOD ŽENA SA POZITIVNOM PORODIČNOM ANAMNEZOM KARCINOMA.....	57
4.4.	KOMBINOVANI UTICAJ POLIMORFIZAMA GLUTATION TRANSFERAZA NA RIZIK ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA.....	60
4.5.	POVEZANOST GENOTIPA GLUTATION TRANSFERAZA SA FENOTIPSKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA.....	62
4.6.	ZNAČAJ GENSKIH POLIMORFIZAMA GLUTATION TRANSFERAZA KLASSE <i>M1</i> , <i>T1</i> , <i>A1</i> , <i>P1</i> I <i>O2</i> U PROGNOZI BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA.....	66
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA.....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>SPISAK SKRAĆENICA.....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>BIOGRAFIJA.....</b>	
<b>10.</b>	<b>PRILOZI.....</b>	

## 1. UVOD

### 1.1.KARCINOM JAJNIKA

#### 1.1.1. Epidemiološke karakteristike karcinoma jajnika

Karcinom jajnika predstavlja sedmi najčešći tumor kod žena i skoro 4% svih novootkrivenih slučajeva tumora kod žena (Jemal i sar., 2009; *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2014*; Saida i sar., 2016). U 2012. godini, zabeleženo je 239 000 novih slučajeva karcinoma jajnika u svetu (Ferlay i sar., 2014). Incidencija je neravnomerno raspoređena u svetu, sa najvišim stopama u Evropi, kojima se blisko približavaju stope u Severnoj Americi, dok su najniže stope uočene u Jugoistočnoj Aziji i delovima Afrike (Hennessy i sar., 2009). Tokom 2012. godine, 65 538 žena je obolelo od karcinoma jajnika u Evropi, gde su najveću stopu incidencije imale Letonija i Bugarska (Ferlay i sar., 2013). Od karcinoma jajnika u proseku godišnje u Srbiji oboli 820, a umre 420 žena (Ferlay i sar., 2010; WHO, 2012). Među ženama u Srbiji, karcinom jajnika predstavlja šesti malignitet po učestalosti (5,0%), a sedmi po mortalitetu (4,6%). U 2010. godini, u Srbiji, preko 70% smrtnih ishoda od karcinoma jajnika se desilo pre 65. godine života.

Maligni tumori jajnika se javljaju u svim uzrastima, čine 23% svih malignih tumora polnih organa žene i vodeći su uzrok mortaliteta od malignih tumora ženskog genitalnog sistema. Poslednjih godina uočen je trend porasta i u oboljevanju i u umiranju od karcinoma jajnika prema mlađim uzrasnim grupama. U periodu od 1999. do 2010. godine (Ferlay i sar., 2010; Knežević i sar., 2010; Miljuš i sar., 2012) u Srbiji je zabeležen porast standardizovanih stopa incidencije karcinoma jajnika za 12,9% (od 9,3/100.000 do 10,5/100.000) i umiranja za 19,6% (od 4,6/100.000 do 5,5/100.000). U Srbiji, koja se inače nalazi na petom mestu u svetu prema incidenciji karcinoma jajnika, tokom 2012. godine je obolelo 935 žena (Ferlay i sar., 2013). U Tabeli 1. je prikazano prvih 20 zemalja u svetu, rangiranih prema incidenciji karcinoma jajnika, u 2012. godini (Ferlay i sar., 2013).

*Tabela 1. Zemlje sveta rangirane prema starosno-standardizovanoj stopi incidencije karcinoma jajnika u 2012. godini*

Rang	Zemlja	Starosno - standardizovana stopa incidencije /100 000
1	Fidži	14,9
2	Letonija	14,2
3	Bugarska	14,0
4	Poljska	13,6
<b>5</b>	<b>Srbija</b>	<b>12,8</b>
6	Litvanija	12,2
7	Crna Gora	12,0
8	Malta	11,8
8	Estonija	11,8
10	Velika Britanija	11,7
11	Slovačka	11,6
12	Makedonija	11,3
12	Ruska Federacija	11,3
14	Irska	11,2
15	Češka Republika	11,1
16	Belorusija	10,9
17	Ukrajina	10,7
18	Trinidad i Tobago	10,6
18	Mađarska	10,6
20	Slovenija	10,4

Činjenica da se u 60-70% slučajeva karcinom jajnika dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu upućuje na probleme u dijagnostici, prvenstveno zbog podmuklog toka bolesti bez simptoma u ranoj fazi, a istovremeno objašnjava i visoku stopu smrtnosti (Đurđević i sar., 2009; Terry i sar., 2016). Naime, kod više od 70% pacijentkinja dijagnoza se postavlja u uznapredovalim kliničkim fazama (faza III ili IV), gde je stopa

relativnog prosečnog 5-godišnjeg preživljavanja 20-35% (Bast i sar., 2009; Chornokur i sar., 2013). Iako incidencija karcinoma jajnika čini manji deo ukupne incidencije malignih oboljenja u svetu, maligni tumori jajnika predstavljaju vodeći uzrok smrti među malignim tumorima ženskog genitalnog sistema (47%) i nose značajan udeo u ukupnoj smrtnosti (5%) od malignih oboljenja kod žena (Ferlay i sar., 2013). Interesantno je da karcinom jajnika, nesrazmerno incidenciji, karakteriše visoka stopa mortaliteta, kako zbog nedostatka simptoma, tako i zbog ranih strategija otkrivanja.

Još uvek ne postoje pouzdani skrining testovi za ovu bolest, a simptomi su često nejasni i pogrešno protumačeni kao druga, češća ginekološka i gastrointestinalna oboljenja (Goff et al., 2000). Što se tiče terapijskog pristupa, zlatni standard u lečenju karcinoma jajnika predstavlja maksimalna citoredukcija praćena hemioterapijom, sa inicijalnim odgovorom u 65–80% slučajeva (Kim i sar., 2012; Halkia i sar., 2015). Ipak, u značajnom broju slučajeva, dolazi do ponovne pojave karcinoma i pacijentkinje razvijaju rezistenciju na primenjenu terapiju, što sve vodi petogodišnjem preživljavanju od svega 30-50% (De Angelis i sar., 2014; Terry i sar., 2016).

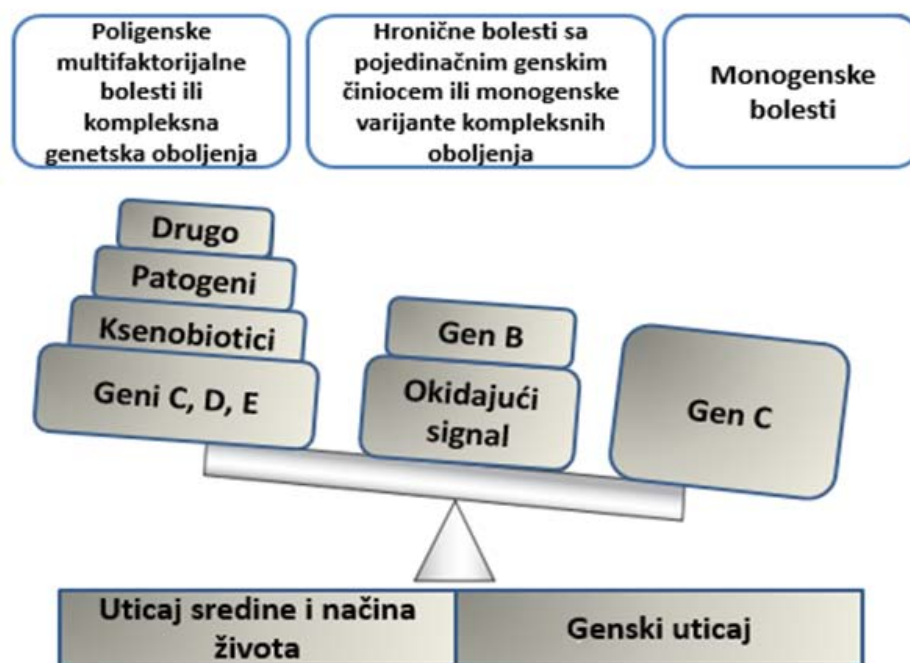
U poslednjoj deceniji, brojni pokušaji u cilju razvoja efikasnijih terapijskih, kako hirurških, tako i hemioterapijskih tretmana, sa akcentom na kombinovanu primenu citostatika, rezultirali su značajnim produžetkom kratkoročnog preživljavanja i malim povećanjem ukupne prosečne dužina preživljavanja (Bast i sar., 2009; Corazziari i sar., 2014).

### **1.1.2. Faktori rizika**

Poznati faktori rizika, koji se dovode u vezu sa nastankom karcinoma jajnika, povezani su kako sa reproduktivnom ulogom žene, tako i sa genetskim faktorima. Pored toga, smatra se da i faktori sredine mogu uticati na rizik za obolevanje od karcinoma (Di Pietro i sar., 2010, Slika 2).

Pokazano je da žene koje nisu rađale imaju dvostruko veći rizik u pogledu obolevanja od karcinoma jajnika. Visok rizik takođe postoji i kod žena niskog pariteta (Ji i sar., 2007). Žene sa određenim faktorima rizika, kao što je starosno doba, postojanje

porodične istorije bolesti, bez prethodnih trudnoća, bez upotrebe oralnih kontraceptiva, sa postojanjem steriliteta i pripadnost Eškenazi jevrejskoj zajednici, imaju veću verovatnoću za obolevanje od karcinoma jajnika (Lockwood-Rayermann i sar., 2009). Pored toga, pokazano je da dugotrajna izloženost azbestu, kao i upotreba talka povećavaju rizik od obolevanja od karcinoma jajnika (Camargo i sar., 2011; Narod, 2016). Sa druge strane, prva trudnoća u juvenilnom periodu, rana menopauza i upotreba oralnih kontraceptiva smanjuju rizik za nastanak ovog karcinoma, s obzirom da ponavljano prskanje (ovulacija) površinskog epitela jajnika i njegovo obnavljanje čine podlogu za nastanak genetskih aberacija (Walker i sar., 2015).



*Slika 1. Faktori koji mogu uticati na rizik za nastanak karcinoma – različiti faktori doprinose na različit način u zavisnosti od tipa oboljenja (slika preuzeta iz rada Di Pietro i sar., 2010)*

Do sada su otkrivena i dva karakteristična sindroma, *Breast-Ovarian Cancer* sindrom, povezan sa nasleđenim mutacijama BRCA-1 i BRCA-2 gena i *Lynch* sindrom tip II, koji uključuje postojanje malignih tumora debelog creva, endometrijuma i prostate.

Smatra se da mutacije *BRCA1* i *BRCA2* gena, koje predstavljaju faktore rizika za nastanak karcinoma dojke, takođe povećavaju rizik i za razvoj karcinoma jajnika (39% kod *BRCA 1* i 11% kod *BRCA 2*) (Antoniou i sar., 2003; Menendez i sar., 2016). Međutim, pokazano je da karcinomi jajnika kod kojih postoji *BRCA* mutacija imaju bolju prognozu u odnosu na sporadične slučajeve ovog karcinoma (Chetrit i sar., 2008; Ben David i sar., 2002; Boyd i sar., 2000), verovatno zbog povećane osetljivosti na hemioterapiju (Hussain i sar., 1998; Yuan i sar., 1999). Pored toga, infiltracija limfocita u tumorskom tkivu se, na osnovu novijih istraživanja, takođe dovodi u vezu sa boljom prognozom karcinoma ovarijuma kod kojih postoji mutacija *BRCA* gena (Zhang i sar., 2003; Clarke i sar., 2009). Žene sa *Lynch* sindromom (nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom, eng. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC*), koji se dovodi u vezu sa defektom u jednom ili više specifičnih gena odgovornih za mehanizme popravke molekula DNK, su u većem riziku za obolevanje od karcinoma endometrijuma, nego od karcinoma debelog creva (Lynch i sar., 2009; Mills i Longacre, 2016).

Međutim, mutacije su karakteristične samo za nasledne, porodične slučajeve ovog karcinoma i sreću se kod 10-15% pacijentkinja, dok najveći broj malignih tumora jajnika nastaje sporadično (Varga i sar., 2013). Prihvaćeno je mišljenje da karcinom jajnika nastaje kao posledica akumulacije genetskih promena (Lee i sar., 2013), a veliki deo predispozicije u sporadičnim slučajevima karcinoma jajnika se dovodi u vezu i sa polimorfizmom gena koji su uključeni u metabolizam hemijskih kancerogena (Barakat i sar., 2009). Naime, poznato je da značajnu ulogu u nastanku karcinoma jajnika imaju hemijski kancerogeni, kao što su policiklični ugljovodonici i nitrozamini (Waalkes i sar., 2004; Fong i sar., 2009). Naime, genski polimorfizam enzimskih sistema detoksikacije faze I (CYP450) i faze II (glutation transferaze, GST) za posledicu može imati promenu aktivnosti ovih enzima i njihove sposobnosti da detoksikuju kancerogene (Strange i sar., 1999). Zbog toga se smatra da identifikacija inter-individualnih genetskih varijacija, posebno u genima koji kodiraju enzime uključene u proces detoksikacije, može biti od značaja u karcinomu jajnika.

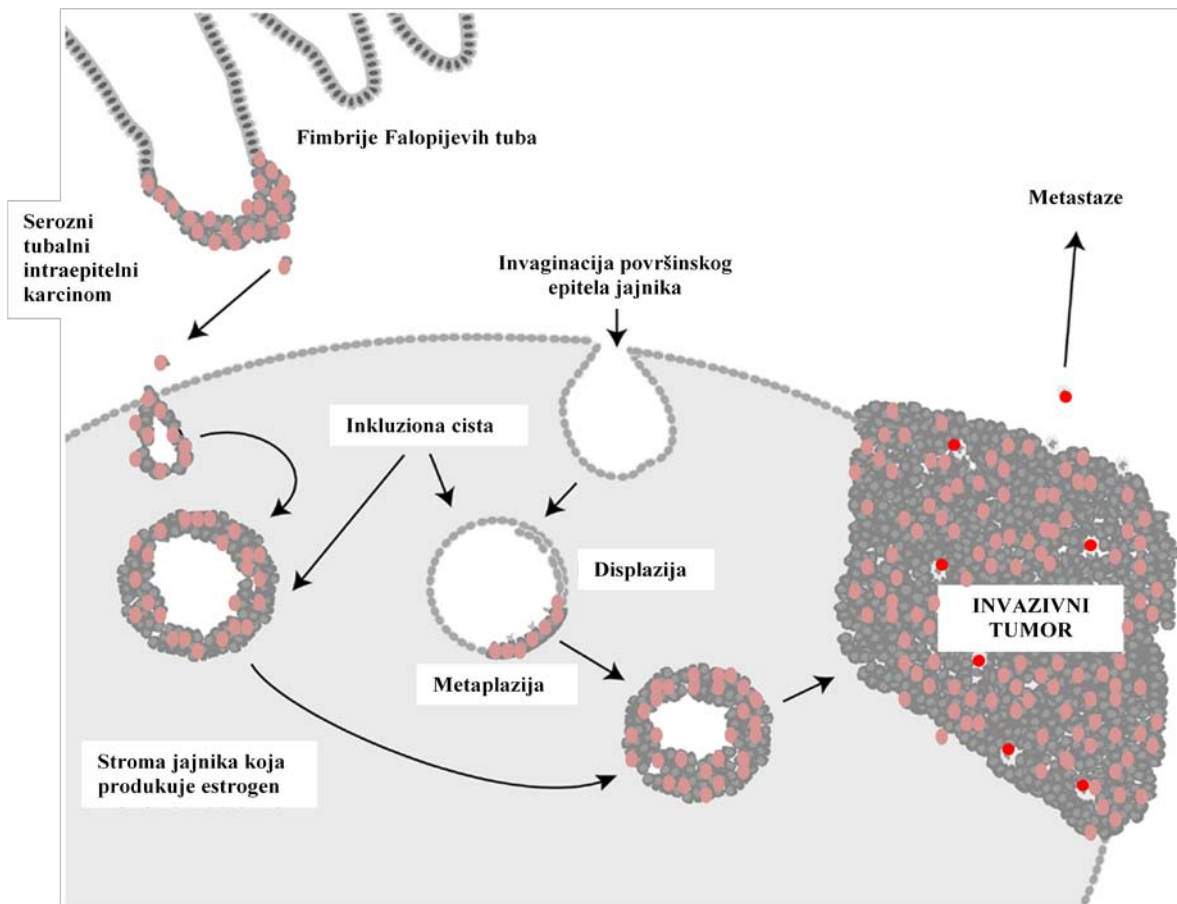
### **1.1.3. Kancergeneza tumora jajnika**

Iz Milerovih kanala se razvijaju ženski reproduktivni organi, tako što se iz gornjih nespojenih delova razvijaju jajovodi, iz srednjih delova se razvija materica, a iz donjih delova gornji deo vagine (Naora, 2005). Jednoslojni omotač peritonealnog mezotelijuma koji oblaže jajnik ima potencijal da uđe u metaplastičnu konverziju u više diferenciranih stanja (Auersperg i sar., 2001). Kada ovaj epitel prolazi kroz malignu transformaciju, može se diferencirati u različite tipove ćelija, prema poreklu delova Milerovih kanala, odnosno u ćelije jajovoda, materice, grlića i strome jajnika (Naora, 2005). Smatra se da većina karcinoma jajnika razvija iz površinskog epitela jajnika ili iz postovulatornih inkluzionih cista koje su duže izložene dejstvu hormona ili drugih hemokina (Slika 2) (Auersperg i sar., 2001; Ribeiro i sar., 2014). Ruptura površinskog epitela jajnika tokom ovulacije i posledični mehanizmi reparacije mogu dovesti do povećanog rizika od nastanka mutacija i naknadne maligne transformacije (Fathalla, 1971). Ovu hipotezu podržavaju saznanja da su postojanje više trudnoća (Whittemore i sar., 1992; Bernstein i sar., 1992), produženo vreme laktacije (Gwinn i sar., 1990) i primena oralnih kontraceptiva (Whittemore i sar., 1992; Nasca i sar., 1984) povezani sa manjim rizikom od pojave karcinoma jajnika. Istraživanja Risch i saradnika (Risch i sar., 1998) su pokazala da i primena oralnih kontraceptiva koji sadrže samo progestin, koji ne inhibiraju ovulaciju, takođe ima zaštitni efekat sa efikasnošću jednakom kao i primena kombinovanih kontraceptiva, koji inhibiraju ovulaciju. Osim toga, žene sa sindromom policističnih jajnika, gde dolazi do smanjenja ovulatornih ciklusa, imaju veći rizik od razvoja karcinoma jajnika (Schildkraut i sar., 1996).

Po drugoj hipotezi, veći broj karcinoma jajnika seroznog tipa zapravo vodi poreklo od Falopijevih tuba, koji se tek kasnije proširuju na jajnik, pre nego da su u pitanju primarni karcinomi jajnika (Kindelberger i sar., 2007; Ribeiro i sar., 2014) (Slika 2). Šta više, nekoliko studija je pokazalo sličnost u kliničkim, molekularnim i genetskim karakteristikama primarno peritonealnih i falopijevih karcinoma (Lacy i sar., 1995; Kowalski i sar., 1997; Pere i sar., 1998; Halperin i sar., 2001; Halperin i sar., 2001; Chen i sar., 2003).



Zapaljenski procesi takođe utiču na razvoj karcinoma jajnika, jer se smatra da inflamatorno mikrookruženje može imati ključnu ulogu u pokretanju oboljenja (Grivennikov i sar., 2010). Navedeni hipotezu podržavaju podaci da nesteroidni anti-inflamatorni lekovi smanjuju rizik od razvoja raznih oblika karcinoma, npr. debelog creva i dojke, da se tokom ovulacije javlja inflamacija, kao i da je inflamacija uključena u aktivaciju različitih onkogeno (Ness i sar., 1999; Straub i sar., 2007; Mantovani i sar., 2008;). Hemokini su takođe glavne determinante makrofagne i limfocitne infiltracije tumorskog tkiva jajnika (Negus i sar., 1995). Šta više, davno je pretpostavljeno da mehanizmi vezani za ovulaciju, gonadotropini i zapaljenje ne deluju nezavisno, već najverovatnije imaju zajedničko interaktivno dejstvo (Ness i sar., 1999).



**Slika 2.** Prikaz patogeneze i dediferencijacije epitelnog karcinoma jajnika

(slika preuzeta iz rada Ribeiro i sar., 2014)

#### **1.1.4. Simptomi i klinička slika karcinoma jajnika**

Zbog svoje nespecifičnosti u pojavi simptoma, karcinom jajnika nazivaju „tihim ubicom“ jer se smatralo da izraženu kliničku sliku daje tek u uznapređovalim stadijumima. Rezultati nekoliko studija koje su se bavile ovim problemom, iako kritikovane zbog malog broja uključenih pacijentkinja i retrospektivne analize, ipak je naznačilo prisustvo nekih simptoma koji nisu bili vezani za ginekološke organe (Petignat i sar., 1997; Young i sar., 1998; Clement i sar., 1998). U kanadskoj studiji, koja je obuhvatila 1725 pacijentkinja obolelih od ovog karcinoma, pre postavljanja dijagnoze, u 95% žena su opisani nespecifični simptomi, koji se povezuju sa abdomenom (77%), gastrointestinalnim sistemom (70%), nespecifičnim bolom (58%), urinarnim sistemom (34%) i karlicom (26%), dok su simptomi koji se povezuju sa ginekološkim organima bili najmanje zastupljeni. Goff i saradnici su, promatrajući simptome u odnosu na stadijum bolesti, verifikovali simptome kod 89% ispitanica stadijuma I/II, pre postavljanja dijagnoze i 97% kod uznapređovalih stadijuma (Goff i sar., 2000). Rane simptome u ranom stadijumu bolesti, pre postavljanja dijagnoze, u oko 80-90% slučajeva prijavili su i drugi autori (Olson i sar., 2001; Vine i sar., 2001).

Upravo prepoznavanje simptoma u ranim stadijumima imalo bi najznačajniju ulogu u blagovremenom prepoznavanju pacijentkinja sa karcinomom jajnika, kao i nezanemarivanje najčešće nespecifičnih simptoma, što bi sve moglo uticati i na poboljšanje ukupnog preživljavanja, s obzirom da je stadijum bolesti jedan od značajnih prognostičkih faktora kod karcinoma jajnika. Ipak, treba naglasiti da je većina studija koristila metode popunjavanja upitnika, retrogradno posle uspostavljanja same dijagnoze i tretmana i nekoliko meseci i godina od samog lečenja. Od lekara primarne zdravstvene zaštite naglašeno je da je dosta žena prijavljivalo neke od simptoma koje bi mogli povezati sa karcinomom jajnika, a da bolest nije dijagnostikovana u toj grupi. Osnova daljih ispitivanja bila bi pokušaj izdvajanja učestalosti, ozbiljnosti i trajanja nekih simptoma koje bi se tipično mogle povezati sa karcinomom jajnika, a registruju se u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Problem koji se može javiti proizlazi iz neprepoznavanja simptoma koje bi se mogli povezati sa karcinomom jajnika, s obzirom da većina simptoma koja se opisuju su nespecifični i vezani za stanja koja nisu povezana sa malignitetom. U preko 95% slučajeva,

žene sa simptomima bolova u abdomenu, urinarnom simptomatologijom, nadutostošću i distenzijom trbuha javljale su se lekaru opšte medicine, tako da najveći značaj za ovu vrstu oboljenja, postavljanje sumnje i adekvatnog upućivanja pacijentkinje kod ginekologa leži na izabranom lekaru.

Kada govorimo o simptomima karcinoma jajnika najznačajnije je prepoznati simptome u primarnoj zdravstvenoj zaštiti i u ranom stadijumu. Jedna od značajnih studija koja se bavila simptomatologijom karcinoma jajnika prikazala je povezanost određenih simptoma, njihovu učestalost i težinu sa karcinomom jajnika kod žena koje su se javljale u ordinacije primarne zdravstvene zaštite (Goff i sar., 2004). U ispitivanoj populaciji, 72% žena je prijavilo simptome, u proseku 2 simptoma od kojih su najčešći bili bol u leđima (45%), slabost (34%), nadutost (27%), opstipacija (24%), abdominalni bol (22%) i urinarna simptomatologija (16%). Poređenjem grupe žena kod kojih je dijagnostikovao karcinom jajnika i kontrolne grupe pokazan je odnos šansi (*eng. odds ratio*, OR) od 7,4 (95% CI [*eng. confidence interval*, CI]: 3,8-14,2) za porast obima abdomena, 3,6 (95% CI:1,8-7,0) za nadutost, 2,5 (95% CI:1,3-4,8) za urinarnu urgenciju i 2,2 (95% CI:1,2-3,9) za bol u karlici. Žene sa malignim bolestima su 20-30 puta mesečno prijavljivale učestalost simptoma i simptomi su bili izražajni i značajno više učestali nego u grupi sa benignim adneksalnim masama i kontrolnoj grupi. Kombinaciju nadutosti, uvećanja obima abdomena i urinarne tegobe je prijavilo 43% pacijentkinja sa karcinomom, ali samo 8% je bilo prezentovano lekaru opšte medicine (Goff i sar., 2004). Osnovni zaključak autora bilo je da se izražajni simptomi koji se učestalije javljaju, zahtevaju dalju i detaljniju dijagnostiku u pravcu potvrde ili isključivanja sumnje na postojanje adneksalne benigne ili maligne mase.

U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati Olsona i saradnika, gde je pokazan OR od 25,3 za nadutost, 8,8 za otežano uzimanje hrane, 6,2 za abdominalno-pelvične bolove i 3,5 za simptome urinarnog sistema (Olson i sar., 2001). Obe studije pokazale su da su abdominalni i gastrointestinalni simptomi dominantni u anamnezi pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Međutim, iste studije su ukazale na pojavu sličnih simptoma i kod adneksalnih masa benigne etiologije na koje treba obratiti pažnju. U studiji Vine i saradnika (2001), koji su upoređivali simptome kod 616 žena sa karcinomom jajnika i 151 žene sa tumorima jajnika niskog malignog potencijala (*eng. borderline tumori*), simptome je

prijavilo 92% ispitanica prve grupe i 86% druge grupe. Najčešći simptomi u obe grupe javljali su se u maloj karlici, vezano za gastrointestinalni i urinarni sistem. U studiji Hamiltona i saradnika (2009), prema multivarijabilnoj analizi, ukazano je na sedam simptoma koji se mogu povezati sa karcinomom jajnika: abdominalna distenzija, postmenoauzalno krvarenje, gubitak apetita, učestalo mokrenje, abdominalni bolovi, rektoragija i abdominalna nadutost. Kod 85% slučajeva i 15% kontrola jedan od navedenih sedam simptoma je prijavljen u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Nakon isključivanja simptoma koji su se javili 180 dana od dijagnoze, pokazano je da abdominalna distenzija, učestali nagon za mokrenje i abdominalni bol predstavljaju nezavisne faktore, koji se mogu povezati sa karcinomom jajnika (Hamilton i sar., 2009). U navedenoj studiji, svi navedeni simptomi su imali pozitivnu prediktivnu vrednost ispod 1%, osim abdominalne distenzije (2,5%), što je obrazloženo visokom učestalošću simptoma i u kontrolnoj grupi. Međutim, ovi rezultati ukazuju da abdominalnu distenziju treba uzeti u obzir kao značajan simptom, jer je jedna trećina pacijentkinja sa karcinomom jajnika prijavila upravo ovaj simptom. Navedeni simptom se često javlja, kako u uznapreovalom, tako i u ranim stadijumima karcinoma jajnika (Latifeh i sar., 2005). Ono što treba naglasiti jeste da postoji razlika u definisanju abdominalne distenzije od nadutosti i razumevanja ovih različitosti kod žena prilikom popunjavanja upitnika. Oko polovina pacijentkinja je prijavila abdominalni bol. Navedeni simptom se javlja i u ranom stadijumu par meseci pre dijagnoze, ali pozitivna prediktivna vrednost ovog simptoma je bila 0,3%. Iako se učestali nagon za mokrenje izdvojio sa predhodna dva kao simptom koji se javljao 180 dana pre dijagnoze karcinoma, isti se ne može jasno povezati sa ranom ili uznapreovalom bolešću. Ovaj simptom je više vezan i za druge uzroke koji se uglavnom razmatraju, ali se ne sme zanemariti i mogućnost karcinoma jajnika. Postmenopauzalno i rektalno krvarenje često su vezani za urgentna dalja ispitivanja i dovode se u vezu i sa drugim uzrocima. Iako su nešto češće prijavljivana kod dijagnoze ranog stadijuma, njihovo retko javljanje u ranom stadijumu može ukazati na veoma mali broj karcinoma jajnika. Pored navedenih sedam simptoma iz Hamiltonove studije, univarijantnom analizom, opstipacija i dijareja su takođe prikazana kao mogući simptomi na koje su ukazale i neke druge studije slučaja (Vine i sar., 2001; Chan i sar.,

2003; Goff i sar., 2004; Webb i sar., 2004). Interesantan je zaključak Hamiltona i saradnika koji kažu da „*karcinom jajnika nije tih, već njegov zvuk ostaje neprepoznat*“.

## 1.2. DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA KARCINOMA JAJNIKA

### 1.2.1. Klasifikacija karcinoma jajnika

Poznavanje embriologije i mikroskopske anatomije jajnika predstavljaju osnovu za razumevanje različitih histopatoloških tipova tumora porekla od jajnika (Slika 2). Ovi tumori su relativno česti kod žena, a veoma su heterogeni u odnosu na svoje poreklo i biološko ponašanje. Raznovrsnost histopatološke građe proizlazi iz kompleksne građe jajnika i mogućnosti nastanka tumora iz histogenetskih veoma različitih tkiva. Većina tumora porekla od jajnika se može svrstati u tri glavne podgrupe:

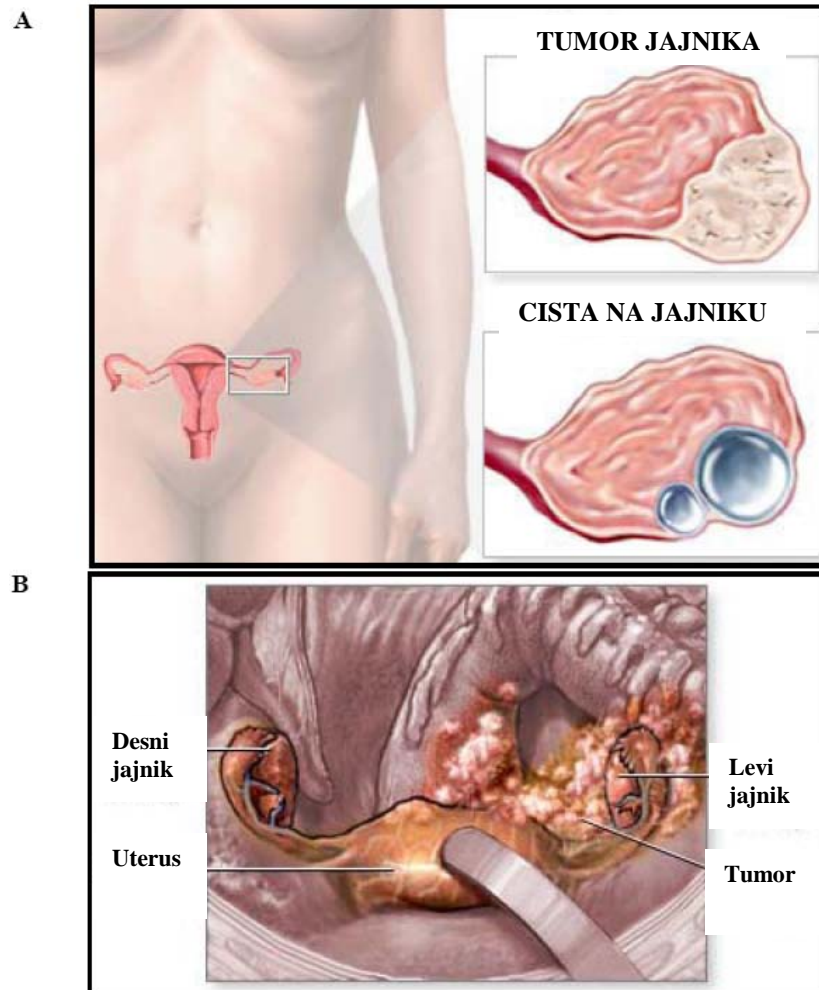
- Epitelni tumori
- Tumori porekla specijalizovane ovarijalne strome i embrionalnih gonada
- Tumori porekla germinativnih ćelija (*eng. „germ cell“*).

#### 1.2.1.1. Površni epitelni tumori

Oko 60% svih tumora jajnika i 80-90% malignih tumora potiču od površnog epitela (Katsube i sar., 1982; Koonings i sar., 1986). U Tabeli 2 je prikazana osnovna histološka klasifikacija tumora jajnika porekla epitela prema Svetskoj Zdravstvenoj Organizaciji (SZO).

„*Borderline*“ tumori jajnika čine 15-20% ovarijalnih epitelijalnih neoplazmi (Acs i sar., 2005). Oni se opisuju kao epitelni tumori sa stratifikovanim rastom, bez destruktivne stromalne invazije, najčešće porekla seroznog ili mucinoznog tipa epitelnih tumora. Međunarodna federacija za Ginekologiju i akušerstvo (*eng. International Federation of Gynaecology and Obstetrics, FIGO*) je 1971. godine definisala tumore niskog malignog potencijala kao posebnu kategoriju (Silverberg i sar., 2006). Mešovitim epitelnim tumorima sa smatraju oni u kojima jedna ili više komponenti, u odnosu na predominantnu, obuhvataju najmanje 10% tumora pri mikroskopom pregledu (Kaku i sar., 2003). Nediferentovani

karcinomi su oni koji ne pokazuju diferentovanost ili manja područja diferencijacije (Kaku i sar., 2003).



**Slika 3.** (A) Razlike u rastu tumefakta unutar jajnika (B) Veliki rizik za nastanak metastaza u karcinomu jajnika zbog neposredne blizine drugih abdominalnih organa (slika preuzeta od Brose MS, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages>)

Novija istraživanja doprinela su razvoju klasifikacije epitelnog karcinoma jajnika, pa se danas on deli na pet osnovnih podtipova (Folkins i sar., 2009; Piek i sar., 2001; McMeekin i sar., 1995; Modesitt i sar., 2002). Na osnovu ove podele u oko 96% karcinoma jajnika može se dijagnostikovati jedan od ovih pet podtipova (Risch i sar., 2001):

- „High-grade“ – 71%
- Mucinozni karcinom - 3,2%
- „Low-grade“ serozni karcinom - 4,1%
- Endometroidni - 8,3%
- „Clear cell“ - 9,5%

Jedan od najznačajnijih napredaka u razumevanju karcinoma jajnika poslednjih godina je prepoznavanje dva odvojena entiteta oboljenja, „high-grade“ seroznog karcinoma (HGSC) i „low-grade“ seroznog karcinoma (LGSC), koji se danas odvojeno posmatraju. Otkriće ova dva podtipa zasniva se na njihovoj genetskoj različitosti. Kod većine LGSC je utvrđena mutaciju *KRAS* i *BRAF* gena i pretpostavlja se da je serozni *borderline* tumor prekursor ovog podtipa. Sa druge strane, potvrđeno je da kod HGSC postoje mutacije *p53* gena i skoro polovina slučajeva ima abnormalnosti u *BRCA1* ili *BRCA2* genima. Pored toga, HGSC se ne povezuje sa seroznim *borderline* tumorima. Kada su u pitanju endometroidni i „clear cell“ karcinomi, oni su povezuju sa endometriozom u 23-42% slučajeva.

#### 1.2.1.2. Tumori porekla specijalizovane ovarijalne strome i embrionalnih gonada

Prema poslednjoj klasifikaciji „sex cord-stromalni tumori“ su podeljeni u četiri grupe (Tabela 3):

- „Granulosa“- stromalni tumori
- „Sertoli“ – stromalni tumori
- „Sex cord“-stromalni tumori mešovito ili ne klasifikovanog ćelijskog tipa
- Tumori steroidnih ćelija

Razlika u odnosu na ranije klasifikacije jeste da trenutna klasifikacija uvodi novu kategoriju, „sex cord“- stromalni tumori, mešoviti ili neklasifikovani ćelijski tip, koji objedinjuje tri kategorije: „sex cord“ tumor sa anularnim tubulima, ginandroblastom i neklasifikovani „sex cord“-stromalni tumor koji je korišćen u drugoj SZO klasifikaciji (Tavassoli et al., 2003; Roth et al., 2006).



Tabela 2. Histološka klasifikacija tumora jajnika porekla epitela prema SZO

	Benigni tumori	Tumor niskog malignog potencijala (eng. <i>Borderline</i> )	Maligni tumori
<b>Serozni</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistadenom i papilarni cistadenom</li> <li>• Površni papilom</li> <li>• Adenofibroma i cistadenofibroma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistični tumor i papilarni cistični tumor</li> <li>• Površni papilarni tumor</li> <li>• Adenofibroma i cistadenofibroma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenokarcinom, papilarni adenokarcinom i papilarni cistadenokarcinom</li> <li>• Površni papilarni adenokarcinom</li> <li>• Adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom</li> </ul>
<b>Mucinozni, endocervikalno-slični i instestinalni tip</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistadenom</li> <li>• Adenofibrom i cistadenofibrom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistični tumor</li> <li>• Adenofibrom i cistadenofibrom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenokarcinom i cistadenokarcinom</li> <li>• Adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom</li> </ul>
<b>Endometroidni</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistadenom</li> <li>• Cistadenom sa skvamoznom diferencijacijom</li> <li>• Adenofibrom i cistadenofibrom</li> <li>• Adenofibrom i cistadenofibrom sa skvamoznom diferencijacijom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistični tumor</li> <li>• Cistični tumor sa skvamoznom diferencijacijom</li> <li>• Adenofibrom i cistadenofibrom</li> <li>• -Adenofibrom i cistadenofibromsa skvamoznom diferencijacijom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenokarcinom i cistadenokarcinom</li> <li>• Adenokarcinom i cistadenokarcinom sa skvamoznom diferencijacijom</li> <li>• Adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom</li> <li>• Adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom sa skvamoznom diferencijacijom</li> <li>• Adenosarkoma, homologni i heterologni</li> <li>• Karcinosarkom, homologni i heterologni</li> <li>• Stromalni sarkom</li> </ul>
<b>„Clear cell“ tumori</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistadenoma</li> <li>• Adenofibrom i cistadenofibrom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistični tumor</li> <li>• Adenofibrom i cistadenofibrom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenokarcinom</li> <li>• Adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom</li> </ul>
<b>Tranzitorni ćelijski tumori</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Brenner</i> tumor</li> <li>• <i>Brenner</i> tumor „borderline“ maligniteta</li> <li>• Maligni <i>Brenner</i> tumor</li> <li>• Karcinom tranzitornih ćelija (<i>non-Brenner</i> tip)</li> </ul>		
<b>Skvamozni tumori</b>			
<b>Mešani epitelni tumori</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benigni</li> <li>• Niskog malignog potencijala</li> <li>• Maligni</li> </ul>		
<b>Nediferentovani karcinomi</b>			



**Tabela 3. Klasifikacija tumora porekla specijalizovane ovarijalne strome i embrionalnih gonada**

<b>„Granulosa“- stromalni tumor</b>
„Granulosa cell“ tumori <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adultni tip</li> <li>• Juvenilni tip</li> </ul>
„Theca-fibroma“ tumori <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tekoma                     <ul style="list-style-type: none"> <li>– Tipični</li> <li>– Luteinizirajući (delimično luteinizirajuće teke ćelije tumora)</li> <li>– Kalcifikovani</li> </ul> </li> <li>• Fibroma</li> <li>• Celularni fibrom (celularni fibrom niskog malignog potencijala)</li> <li>• Fibrosarkoma</li> <li>• Stromalni tumor sa minornim „sex cord“ elementima</li> <li>• Sklerozirajući stromalni tumor</li> <li>• „Signet-ring“ stromalni tumor</li> <li>• Neklasifikovani (fibrotekoma)</li> </ul>
<b>„Sertoli“-stromalni tumori</b>
„Sertoli-Leydig“ tumori (androblastoma) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dobro diferentovan</li> <li>• Srednje diferentovan - varijanta sa heterolognim elementima</li> <li>• Loše diferentovan (sarkomatoid) - varijanta sa heterolognim elementima</li> <li>• „Retiform“ - varijanta sa heterolognim elementima</li> </ul>
„Sertoli“ tumori
„Stromal-Leydig“ tumori
<b>„Sex cord“-stromalni tumori mešovito ili ne klasifikovanog ćelijskog tipa</b>
„Sex cord“ tumori sa anularnim tubulima
Ginandroblastom
„Sex cord“- stromalni tumor, neklasifikovani
<b>Tumori steroidnih ćelija</b>
„Leydig“ tumori <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hilus tumori</li> <li>• „Leydig“ tumori, ne –hilarni tip</li> <li>• „Leydig“ tumor, koji nije drugačije specifikovan</li> </ul>
Tumor steroidnih ćelija, koji nije drugačije specifikovan <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dobro diferentovani</li> <li>• Maligni</li> </ul>

### 1.2.1.3. Tumori porekla germinativnih ćelija

Pretpostavlja se da tumori porekla germinativnih ćelija vode poreklo iz primordijalne germinativne ćelije. Čine oko 25% svih tumora jajnika, ali samo 3-7% malignih tumora jajnika (Simone i sar., 2016). Više od polovine ovarijalnih neoplazmi kod dece i adolescenata su porekla germinativnog epitela od čega je trećina maligna. Najučestaliji tip ove grupe je disgerminom. Embrionalni karcinom je građen od slabo diferentovane, multipotentne germinativne ćelije. One germinativne ćelije koje se diferentuju u embrionalnom ili somatskom pravcu čine teratome. One koje se diferentuju u ekstraembrionalnom pravcu (placentarni ili trofoblastni) dovode do razvoja tumora žumančane kese (eng. „yolk sac tumors“) ili horiokarcinoma. Takođe, mogu se javiti i mešoviti podtipovi tumora germinativnih ćelija (Tabela 4).

**Tabela 4.** Klasifikacija tumora porekla germinativnih ćelija

<b><i>Disgerminom</i></b>
<b><i>Tumor žumančane kesice (endodermalni sinus tumor)</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• polivezikularni vitelinski tumor</li> <li>• hepatoid</li> <li>• C. glandularni</li> </ul>
<b><i>Embrionalni karcinom</i></b>
<b><i>Poliembrioma</i></b>
<b><i>Horiokarcinom</i></b>
<b><i>Teratom</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• nezreli</li> <li>• zreli</li> <li>• monodermalni</li> <li>• D. mešani</li> </ul>

Disgerminomi se često javljaju u drugoj i trećoj dekadi života, čine do 2% od svih tumora jajnika i svega 3-5% od svih malignih tumora jajnika. Najčešći je tip iz grupe tumora porekla germinativnih ćelija, radiosenzitivan je i sa dobrom prognozom. Za razliku od disgerminoma, tumori žumančane kese, koji su drugi po učestalosti iz grupe tumora porekla germinativnih ćelija, su visoko maligni uz rano limfogeno metastaziranje, radiorezistentni, a dijagnostikuju se obično između 20. i 30. godine života. Embrionalni karcinom je veoma malignan, češće se javlja kod dece, rano daje metastaze, ali je radiorezistentan. Horiokarcinom nastaje iz germinativnih placentalnih ćelija, visokog je stepena maligniteta, lokalno agresivan, redak tumor germinativnih ćelija i često izmešan sa drugim tipovima. Horiokarcinom se češće javlja kod dece i mlađih adolescenata. Poslednji u grupi tumora porekla germinativnih ćelija, teratomi, se razvijaju iz više od jednog od tri primitivna embrionalna lista (ektoderm, mezoderm i endoderm), a mogu biti zreli (benigni) i nezreli (benigni i maligni). Zreli cistični teratomi su najčešći tip ovarijalnog tumora germinativnog porekla. Oko 10% tumora jajnika pripada ovom podtipu i uglavnom su unilateralni, sa retkom malignom transformacijom (često u menopauzi) i najčešće rezultiraju razvojem planocelularnog karcinoma. Ostali mogući maligni tipovi su: karcinoid, karcinom štitne žlezde, melanom, lejomiosarkom, melanom. Nezreli teratomi sadrže primitivne, nezrele ili embrionalne strukture u dodatku sa dobro razvijenim ili zrelim tkivom. Ovi tumori su često unilateralni, veliki, retki i učestaliji u prvih dvadeset godina života.

#### 1.2.1.4. Ostali tumori jajnika

U ovu grupu spadaju tumori jajnika koji se ređe javljaju, a mogu se podeliti na:

- Gonadoblastom
- Tumor germinativnih ćelija „*sex cord-stromal*“ tumor ne-gonadoblastoma tip
- Tumor *rete ovarii*
- Mezotelijalni tumor
- Tumor nepoznatog porekla i mešoviti tumori
- Gestaciona trofoblastna bolest

- Meko-tkivni tumori nespecifični za jajnik
- Maligni limfom, leukemija i plazmocitom
- Neklasifikovani tumori
- Metastatski tumori
- Tumorima slične lezije

### 1.2.2. Histološko gradiranje karcinoma jajnika

Tumori jajnika se gradiraju na dobro-diferentovane (G1), srednje diferentovane (G2), loše diferentovane (G3) i nediferentovane.

*Tabela 5. Univerzalni sistem stepena diferentovanosti tumora jajnika*

Odlika	Skor
<b>Obrazac arhitektonike</b>	Glandularni = 1 Papilarni = 2 Solidni = 3
<b>Nuklearni pleomorfizam</b>	Blag = 1 Srednji = 2 Naglašen = 3
<b>Mitotska aktivnost</b> (broj mitoza na 10 polja velikog uvećanja, 1hpf=0,345 mm <sup>2</sup> u najaktivnijoj regiji)	0 - 9 = 1 10 - 24 = 2 ≥ 25 = 3
<b>Stepen (eng. Grade)</b> , ukupan rezultat se dobija sabiranjem rezultata tri gore navedene odlike	3 - 5 = Grade 1 6 ili 7 = Grade 2 8 ili 9 = Grade 3
„Clear cell“ – Ukupan rezultat se ne ocenjuje, jer arhitektura tumora nije prognostički faktor	
<b>Tranzitorni celularni karcinom</b> - Ukupan rezultat se ne ocenjuje jer solidna/glandularna komponenta nisu relevantne	
<b>Borderline tumori</b> - obično se ne gradiraju, ali se subkategorija karcinom <i>in situ</i> , prepoznaje kao takva	

Pored toga, epitelijalni tumori mogu takođe biti klasifikovani i kao „borderline“ tumori. Većina histoloških gradusa zasniva se na analizi arhitektonike i celularnih karakteristika tumora i definiše tri ili četiri grupe prema porastu rizika za agresivno ponašanje tumora. Činjenica je da je veoma teško primeniti jedan tip gradiranja na sve histološke tipove karcinoma jajnika.

Univerzalni sistem stepena diferentovanosti tumora jajnika predložen je od strane više autora, a ukazuje na značaj stepena diferentovanosti kao važnog prognostičkog faktora tumora jajnika (Shimizu i sar., 1998; Silverberg i sar., 2000; Mayr i sar., 2000) (Tabela 5).

### 1.2.3. Histološka tipizacija

Svetska zdravstvena organizacija definiše epitelne tumore površine jajnika kao one koje potiču iz površinskog epitela jajnika ili njegovih drugih struktura, a javljaju se kod žena u reproduktivnoj dobi i posle toga (Tavassoli i sar., 2003). Međutim, napredak u razjašnjavanju etiologije karcinoma jajnika je ukazao na različito poreklo karcinoma jajnika, pa je utvrđivanje pravog ćelijskog tipa dobilo veliki značaj u kliničkoj praksi (Lengyel i sar., 2010).

Različiti podtipovi karcinoma jajnika su heterogena grupa oboljenja, a njihovo određivanje je veoma značajno kako za prognozu bolesti, tako i za određivanje terapije (Kobel i sar., 2008; Schwede i sar., 2013). Podtipovi karcinoma jajnika se međusobno razlikuju prema faktorima rizika, prekursorima lezija, molekularnim aberacijama, ekspresiji biomarkera, načinu širenja i odgovoru na terapiju (Tabela 6).

Pacijenti sa *clear-cell* tipom tumora i mucinoznim karcinomima ne reaguju na hemoterapiju platinom i taksanom, na isti način kao pacijenti sa seroznim karcinomima visokog stadijuma, naročito u početku terapije (Hess i sar., 2004; Fountain i sar., 2006; Pectasides i sar., 2006). Postoji sve veće interesovanje za istraživanje patogenetskih puteva koji posreduju u diferencijaciji različitih podtipova karcinoma jajnika kao mogućim metama za terapiju postojećim i novim hemioterapeuticima. Predloženo je da inhibicija PARP (NAD + ADP-riboziltransferaza) može biti pristup koji obećava, posebno za serozne karcinome visokog stepena sa aberacijama u *BRCA* genima (Audeh i sar., 2010; Tutt i sar., 2010; Fong i sar., 2010).

**Tabela 6.** Razlike u faktorima rizika i kliničkim karakteristikama karcinoma jajnika

	<i>HGSC</i>	<i>LGSC</i>	<i>MC</i>	<i>EC</i>	<i>HNPCC</i>
<b>Faktor rizika</b>	BRCA 1/2	Nepoznat	Nepoznat	<i>Lynch</i> sindom	<i>Lynch</i> sindom
<b>Prekursorska lezija</b>	Tubularni intraepitealni karcinom	Serozni granični ( <i>borderline</i> ) tumor	Cistadenom/granični ( <i>borderline</i> ) tumor	Endometrijoza	Endometrijoza
<b>Širenje</b>	Veoma rano, transkavitalno	Transkavitalno	Uglavnom samo na jajniku	Uglavnom samo na jajniku	Uglavnom samo na jajniku
<b>Molekularne abnormalnosti</b>	BRCA, p53	BRAF, KRAS	KRAS, HER2	PTEN	HNF1
<b>Osetljivost na hemioterapiju</b>	Visoka	Srednja	Niska	Visoka	Niska
<b>Prognoza</b>	<b>Loša</b>	<b>Srednja</b>	<b>Dobra</b>	<b>Dobra</b>	<b>Srednja</b>

HGSC (*eng. high-grade serous carcinoma*) - serozni karcinom visokog stepena; LGSC (*eng. low-grade serous carcinoma*) - serozni karcinom niskog stepena; MC (*eng. mucinous carcinoma*) - mucinozni karcinom; EC (*eng. endometrioid carcinoma*) - endometrioidni karcinom; HNPCC (*eng. hereditary non-polyposis colorectal carcinoma*) - urođeni nepolipozni kolorektalni karcinom

Površinski epitelni tumori su klasifikovani na osnovu tipa tumorskih ćelija (serozni, mucinozni, endometrioidni, *clear-cell*, prelazni), a zatim su dalje stratifikovani kao benigni, granični ili maligni. Histološka subtipizacija je uglavnom bazirana na bojenju preparata hematoksilin-eozinom i imunohistohemijskim ispitivanjima (Kobel i sar., 2010). Ispravna klasifikacija histoloških subtipova je veoma važna za određivanje stadijuma bolesti, prognozu i terapiju. *Clear-cell*, endometrioidni i mucinozni karcinomi su najčešće zastupljeni u stadijumu bolesti I ili II, a serozni karcinomi visokog stadijuma je često prisutan u uznapredovalim kliničkim fazama (Kobel i sar., 2010). Unutar grupe karcinoma niskih stadijuma, takođe postoje značajne razlike u prognozi između različitih vrsta tumora (Kobel i sar., 2010). Kompleksnost u patolistološkoj proceni subtipova karcinoma jajnika

se dodatno povećava ekspresijom različitih gena, koji pokazuju, na primer, da su tumori dijagnostikovani kao "endometroidni visokog stepena" neodvojivi od seroznih karcinoma visokog stepena, ali se razlikuju od endometrioidnih tumora niskog stepena (Gilks i sar., 2009).

#### **1.2.4. Određivanje stadijuma karcinoma jajnika**

Sveobuhvatno hirurško određivanje stadijuma karcinoma jajnika pre primene terapije je od ključnog značaja u lečenju karcinoma jajnika. Uprkos širokom korišćenju hemioterapije, pacijenti ostaju u značajnom riziku od pojave recidiva, ukoliko nije pravilno određen stadijum tumora (Le i sar., 2002).

##### *1.2.4.1. FIGO klasifikacija karcinoma jajnika*

Određivanje stadijuma karcinoma jajnika se vrši primenom *FIGO* sistema klasifikacije, prema kriterijumima Međunarodne federacije za Ginekologiju i akušerstvo koji je zasnovan na nalazima dobijenim u toku hirurške eksploracije (Prat i sar., 2014) (Tabela 7).

Najznačajniji prognostički faktori u prognozi daljeg toka i ishoda bolesti kod epitelnih karcinoma jajnika su proširenost bolesti (*FIGO* stadijum) u trenutku postavljanja dijagnoze i zapremina zaostalog (rezidualnog) tumora posle hirurškog lečenja. Faktori visokog rizika za nastanak recidiva obuhvataju: loše diferentovane (G3) tumore, ekscencije na površini jajnika ili rupturu tumorske kapsule, pozitivan nalaz peritonealne citologije i širenje tumora izvan jajnika na okolne površine. Rano otkrivanje, serozna komponenta tumora i niža starost pacijenta su faktori koji ukazuju na bolju prognozu toka bolesti.

Prognostički faktori kod uznapredovalih stadijuma (*FIGO* III/IV) uključuju: zapreminu zaostalog (rezidualnog) tumora posle primarnog hirurškog lečenja, godine starosti, histološki tip i stepen ćelijske diferencijacije tumora. Velika zapreminu zaostalog (rezidualnog) tumora, starije životno doba, svetloćelijski (*clear-cell*) histološki tip i loše diferentovani tumori (G3) povezani su sa lošijom prognozom i ishodom bolesti.

**Tabela 7. FIGO sistem klasifikacije karcinoma jajnika**

<b>0</b>	Primarni tumor nije moguće proceniti Nema dokaza o primarnom tumoru
<b>I</b>	Tumor ograničen na jajnike
<b>IA</b>	Tumor ograničen na jedan jajnik, intaktna kapsula
<b>IB</b>	Tumor ograničen na oba jajnika, intaktna kapsula Bez tumora na površini jajnika Nema malignih ćelija u ascitu ili peritonealnom ispirku
<b>IC</b>	Tumor ograničen na jedan ili oba jajnika udružen sa rupturom kapsule, sa tumorom koji je prisutan na površini jajnika ili pozitivnim citološkim nalazom u ascitu ili peritonealnom ispirku
<b>II</b>	Tumor lokalizovan na jednom ili oba jajnika uz širenje na karlicu
<b>IIA</b>	Širenje tumora i/ili metastaze u materici i/ili jajovodima Nema malignih ćelija u ascitu ili peritonealnom ispirku
<b>IIB</b>	Širenje tumora na druge karlične organe Nema malignih ćelija u ascitu ili peritonealnom ispirku
<b>IIC</b>	II A /B sa prisutnim malignim ćelijama u ascitu ili peritonealnom ispirku
<b>III</b>	Tumor je zahvatio jedan ili oba jajnika sa mikroskopski potvrđenim peritonealnim metastazama izvan male karlice i/ili metastazama u regionalnim limfnim čvorovima
<b>IIIA</b>	Mikroskopske peritonealne metastaze izvan karlice
<b>IIIB</b>	Makroskopske peritonealne metastaze izvan karlice (2 cm ili manje u najvećem prečniku)
<b>IIIC</b>	Peritonealne metastaze izvan karlice (veće od 2 cm u najvećem prečniku) i/ili sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima
<b>IV</b>	Udaljena metastaze izvan peritonealne šupljine



U Tabeli 8. je prikazana relativna stopa preživljavanja, stratifikovana prema FIGO stadijumima (Ries i sar., 2007).

**Tabela 8.** Relativna stopa preživljavanja pacijentkinja starijih od 20 godina, obolelih od adenokarcinoma jajnika, stratifikovanih prema FIGO stadijumu (uključujući „borderline“ tumore)

FIGO stadijum	Relativna stopa preživljavanja (%)	
	5 godina	10 godina
<b>I</b>	89,3	84,1
<b>I A</b>	94,0	88,9
<b>I B</b>	91,1	78,7
<b>I C</b>	79,8	76,0
<b>II</b>	65,5	55,7
<b>II A</b>	76,4	66,8
<b>II B</b>	66,9	57,4
<b>II C</b>	57,0	45,9
<b>III</b>	33,5	22,2
<b>III A</b>	45,3	31,4
<b>III B</b>	38,6	26,1
<b>III C</b>	35,2	22,6
<b>IV</b>	17,9	10,4

### 1.2.5. Dijagnostički postupci kod karcinoma jajnika

Uspeh lečenja kod karcinoma jajnika umnogome zavisi od rano postavljene dijagnoze. Kliničari u svom radu moraju da uzmu u obzir čitav niz različitih histoloških tipova malignih tumora jajnika koji su karakteristični za određene starosne grupe. *Borderline* tumori sa niskim malignim potencijalom najčešće se javljaju u perimenopauzi, ali se mogu javiti i u generativnom periodu. U svim slučajevima uzima se detaljna anamneza o postojanju faktora rizika i potom sledi detaljan klinički pregled, koji obuhvata palpatorni ginekološki, ultrazvučni, kao i pregled dojke i rektuma. U svim slučajevima uzima se, obavezno, i kontrola Papanikolau brisa.

Pri sumnji na postojanje karcinoma jajnika "minimalni" dijagnostički postupak trebalo bi da obuhvati: ultrazvučni pregled genitalnih organa sa akcentom na pregled materice i oba jajnika, ultrazvučni pregled organa gornjeg abdomena, rendgenski snimak grudnog koša u 2 pravca, kao i određivanje tumorskih markera iz krvi CA 125 i/ili CA 19-9 kod epitelnih mucinoznih tumora. Kod mlađih žena vrši se određivanje koncentracije tumorskih markera  $\beta$ -HCG-a i AFP-a u cilju isključivanja prisustva germinativno-ćelijskih tumora (Tabela 9).

Poseban značaj u neinvazivnoj dijagnostici tumora jajnika pridaje se ultrazvučnom pregledu i Doppler sonografiji. U pogledu primene ultrazvuka na raspolaganju je primena abdominalne i endovaginalne sonografije. Prednost abdominalnog pristupa je detaljno sagledavanje i pregled svih delova trbušne duplje (jetra, slezina, paraaortalni limfni čvorovi, prisustvo slobodne tečnosti ili ascitesa). Za pregled promena koje su lokalizovane na jajnicima bolje rezultate pruža endovaginalna sonografija, koja ima za cilj da opiše veličinu i morfološke karakteristike tumora (cistična, kompleksna ili pretežno solidna građa). Ultrazvučni nalaz, kod povećane sumnje na malignitet, uključuje sledeće morfološke karakteristike tumora: papilarne proliferacije preko 3 mm u promeru i neravnine na unutrašnjoj strani tumorskog zida, veći broj pregrada (septuma) nejednake debljine, multicistične delove unutar solidnog tumora, solidne tumore "kompleksne" građe i slobodnu tečnost (ascites) u truhu.

Primenom ultrazvuka moguće je odrediti i volumen jajnika koji pokazuje pozitivnu korelaciju sa rizikom za prisustvo maligne bolesti, osim kod unilokularnih cističnih formacija glatkih zidova (tzv. *simplex* ciste jajnika). Primenom Doppler sonografije, pored morfologije, dobijaju se i podaci o vaskularizaciji tumora s obzirom na to da se karcinomi jajnika karakterišu neovaskularizacijom i prisustvom novostvorenih arteriovenskih komunikacija što ima za posledicu smanjen otpor protoka kroz krvne sudove. Ukoliko za to postoje mogućnosti, kao i kod osnovane sumnje da se radi o karcinomu jajnika, indikovano je sprovesti dopunski pregled karlice i abdomena nekom od imidžing dijagnostičkih metoda (CT – kompjuterizovana tomografija i MR – magnetna rezonanca) u cilju procene proširenosti oboljenja (prisustvo metastaza na jetri, slezini, bubrezima i dr.). Preporuka je da se primenjuje kompjuterizovana tomografija (CT), jer se u istom aktu mogu pregledati različiti delovi i regije tela kao npr. grudni koš, abdomen i karlica.

**Tabela 9.** Dijagnostički postupci koji se sprovode kod karcinoma jajnika

<i>Minimum dijagnostičkih postupaka</i>	<i>Dopunski postupci</i>
Opšti klinički pregled	Doppler sonografski pregled jajnika
Kompletan ginekološki i rektovaginalni pregled	CT ili MR pregled karlice i abdomena
UZ pregled genitalnih organa (endovaginalnom i/ili abdominalnom sondom)	Rektosigmoidoskopija, kolonoskopija ili irigografija
UZ pregled organa gornjeg abdomena	Dopunski tumor markeri iz krvi: CA 19-9, AFP, beta-hCG
RTG snimak grudnog koša u 2 pravca	Dopunski pregledi (CT/MR grudnog koša, PET sken, cistoskopija i dr.)
Određivanje CA 125 iz krvi	

Kada postoji sumnja na prisustvo metastaza, u obzir dolazi i primena pozitron emisione tomografije ili PET skena. Međutim, svi ovi pregledi ne mogu zameniti intraoperativnu procenu stadijuma bolesti i obaveznu patohistološku potvrdu da se radi o primarnom karcinomu jajnika (Buys i sar., 2005; Hartge i sar., 2010; Skates i sar., 2010; Hartge i sar., 2010).

### **1.2.6. Skrining karcinoma jajnika**

Skrining strategije koje mogu da postignu cilj ranog otkrivanja karcinoma jajnika, imaju potencijal da dramatično poboljšaju ukupno preživljavanje obolelih (Baker i sar., 1994). Značajan broj istraživanja je usmeren na razvoj poboljšanih metoda skrininga kod žena koje su u visokom riziku od nastanka karcinoma jajnika. Iako eksperimentalni podaci ukazuju na postojanje niza premalignih lezija jajnika, koje pokazuju kumulativni efekat molekularnih promena, definitivna klinička identifikacija takvih lezija ostaje nerazjašnjena. Trenutno se žene, za koje se pretpostavlja da su u visokom riziku za nastanak ovih karcinoma, moraju oslanjati na genetsko savetovanje i testiranja, koja obično obuhvataju merenje serumskog CA 125 i ultrazvučni pregled transvaginalnom sondom (TVS) (Bast i sar., 2007).

Tumorski marker CA 125 se pokazao korisnim u praćenju odgovora na terapiju i progresije bolesti, ali ne i kao dijagnostički ili prognostički. Generalno, CA 125 test pokazuje osetljivost kod samo 50-60% obolelih u prvom stadijumu bolesti i pokazano je da značajno manje osetljivi kod žena pre menopauze u odnosu na žene u postmenopauzi (Woolas i sar., 1993; Jacobs i sar., 1989; Bast i sar., 2007).

U svetlu ovih ograničenja, trenutne preporuke ne idu u prilog korišćenje CA 125 za opšti skrining. Skrining na osnovu TVS, Doppler i morfoloških indeksa je ipak dao neke ohrabrujuće rezultate, ali svaka od ovih metoda trenutno nema zadovoljavajuću specifičnost da ispuni zahteve skrining test za opštu populaciju (MacDonald i sar., 1998).

Multimodalni skrining pristup koji kombinuje korišćenje tumorskih markera merenih u određenim intervalima i ultrazvuka može dati veću osetljivost i specifičnost. Pristup ovog tipa je potvrđen i može predstavljati isplativu strategiju za rano otkrivanje (Jacobs i sar., 2004; Menon i sar., 2011). Međutim, trenutna verzija ove strategije se oslanja

isključivo na CA 125 kao biomarker, zbog čega nema dovoljnu osetljivost u ranim stadijumima bolesti. Stoga, postoji kritična potreba da se razviju dodatni informativni biomarkeri u cilju postizanja potrebne vizualizacije neophodne za kliničku dijagnostiku ove bolesti.

Sticanje uslova za primenu strategije efikasnog skrininga rane faze karcinoma jajnika u opštoj populaciji i izvodljivost takvog poduhvata čine fokus dva velika istraživanja. U okviru jednog se obavlja randomizirano kontrolno ispitivanje karcinoma prostate, pluća, kolorektalnog i karcinoma jajnika (*PLCO, NCT00002540*) pod pokroviteljstvom Nacionalnog instituta za rak, a druga je kolaborativna studija o karcinomu jajnika u Velikoj Britaniji (*UKCTOCS, NCT00058032*) (Buys i sar., 2005; Anderson i sar., 2009). U nedavno objavljenoj meta-analizi, godišnji skrining bi trebalo da otkrije tumore od 1,3 cm u prečniku za postizanje senzitivnosti od 50% u otkrivanju tumora pre nego što dostignu fazu III, dok je za 80% senzitivnosti potrebno otkrivanje tumora manjih od 0,4 cm u prečniku. Pored toga, smanjenje smrtnosti kod karcinoma jajnika za 50% bi zahtevalo test koji je sposoban da detektuje tumore manje od 0,5 cm u prečniku (Brown i sar., 2009).

S obzirom na nisku učestalost karcinoma jajnika u opštoj populaciji, svaka predložena skrining strategija mora da pokaže minimum specifičnosti od 99,6% i osetljivost veću od 75% u ranoj fazi bolesti, kao i da postigne pozitivnu prediktivnu vrednost od 10% i izbegne neprihvatljiv nivo lažno pozitivnih rezultata (Jacobs i sar., 2004; Menon i sar., 2011). Dok ovi zahtevi ne budu ispunjeni, praktičan pristup karcinomu jajnika uključuje testiranje serumskih biomarkera u evaluaciji određenih grupa visokog rizika i u kliničkim uslovima.

#### *1.2.6.1. Porodična anamneza kao faktor skrininga*

Kako je rizik za nastanak karcinoma jajnika udružen sa porodičnom anamnezom, ona ujedno predstavlja preduslov za odgovarajuće savetovanje. Na osnovu epidemioloških podataka, žene sa pozitivnom porodičnom anamnezom se mogu podeliti u tri grupe: sa visokim rizikom, sa povišenim rizikom i grupu kod kojih pozitivna porodična anamneza karcinoma nije udružena sa rizikom. Smatra se da rizik od nastanka karcinoma jajnika, ukoliko nema obolelih srodnika, iznosi 1,4%, kod žena sa jednim obolelim rođakom, rizik

je 3-4% (ili 3-4 puta veći nego u opštoj populaciji), dok je rizik kod žena koje imaju dva ili više obolelih rođaka, do 40%. Grupu osoba sa visokim rizikom za nastanak karcinoma jajnika čine:

- Žene iz porodica sa pozitivnom porodičnom anamnezom i istorijom koja ukazuje na jedan od tzv. familijarnih ovarijalnih kancer sindroma
- Žene sa dokumentovanom istorijom karcinoma jajnika kod dve ili više srodnica prvog stepena

Skrining karcinoma jajnika u okviru ovih grupa može dati obećavajuće rezultate. Sa tim ciljem na umu, postoji velika potreba da se izvrši identifikacija novih biomarkera, ili utvrdi kombinacija biomarkera koji mogu da otkriju male presimptomatske tumore jajnika i razlikuju maligne od benignih tumora sa visokim nivoom osetljivosti i specifičnosti.

## **1.2.7. Terapijski postupci kod karcinoma jajnika**

### *1.2.7.1. Terapijski plan za rane stadijume karcinoma jajnika*

Terapijski plan zavisi od stadijuma karcinoma jajnika. Za rane stadijume bolesti (I i IIa), početak lečenja, pored svega što je već urađeno u hirurškom stadiranju, podrazumeva totalnu abdominalnu histerektomiju i adneksektomiju još neodstranjenih adneksa (Trimble i sar., 2002; Berek i sar., 2010; Gershenson i sar., 2010; Di Saia i sar., 2011). U ovoj fazi može se razmišljati i o prezervaciji fertiliteta. Odnosno, privremeno očuvanje fertiliteta, tokom ograničenog vremenskog perioda, može se oprezno razmotriti u slučaju da su ispunjeni sledeći uslovi (Berek i sar., 2010; Gershenson i sar., 2010; Di Saia i sar., 2011):

1. Da se radi o mladoj ženi niskog pariteta
2. Da je stadiranje u potpunosti korektno
3. Da je bolest stadijuma Ia
4. Da nema adhezija, niti ascitesa u trbušnoj šupljini
5. Da je nizak histološki gradus karcinoma (Levine i sar., 2010)
6. Da unutrašnje genitalije nisu na drugi način kompromitovana
7. Da postoji mogućnost za rigoroznu kontrolu

8. Da je pacijentkinja ipak spremna da podnese odgovarajući rizik za svoju odluku

#### 1.2.7.2. Terapijski plan za uznapredovali karcinom jajnika

Osnovne postavke terapijskog plana za uznapredovali karcinom jajnika čine (Trimble i sar., 2009; Berek i sar., 2010; Gershenson i sar., 2010):

1. Citoreduktivna hirurgija kao standard u lečenju uznapredovalog karcinoma jajnika
2. Šest ciklusa karboplatine/paklitaksela kao standardna hemioterapiju za većinu pacijentkinja
3. Nije dokazano da povećanje doze platine, bilo kakva terapija održavanja ili uvođenje trećeg citotoksičkog agensa poboljšavaju preživljavanje
4. Od intraperitonealne terapije mogu imati koristi samo pacijentkinje sa karcinomom male zapremine
5. Uznapredovali „*clear cell*“ ili mucinozni tumori hemorezistentni

#### 1.2.7.3. Tretman perzistentne ili rekurentne bolesti

Osnovne postavke tretmana perzistentne ili rekurentne bolesti su (van der Burg i sar., 1996; Gershenson i sar., 2010; Berek i sar., 2010; Di Saia i sar., 2011):

1. Rekurentni ovarijalni karcinom je neizlečiv, ali pacijentkinje kod kojih se karcinom vrati posle više od šest meseci od završetka primarne terapije mogu imati značajnu korist od dalje hemoterapije.
2. Kombinovana terapija daje bolji terapijski odgovor nego hemoterapija jednim lekom kod karcinoma senzitivnih na platinu, ali korist u smislu ukupnog preživljavanja nije dokazana.
3. Značaj sekundarne citoreduktivne hirurgije se još ispituje u kliničkim studijama.

#### 1.2.7.4. Lečenje *borderline* tumora

Osnovne postavke lečenja *borderline* tumora su (Seidman i sar., 2000; Berek i sar., 2010; Gershenson i sar., 2010; Di Saia i sar., 2011):

1. Hirurški tretman je osnova lečenja *borderline* tumora.

2. Nema dokaza da postoperativna hemoterapija poboljšava ishod kod pacijentkinja sa *borderline* tumorima uznapredovalih stadijuma.
3. *Borderline* tumori mogu recidivirati i posle 10-15 godina.

Kada su u pitanju ovi tumori, odluka o daljem lečenju posle inicijalnog hirurškog zahvata koji je retko rađen zbog suspektnog maligniteta, treba da bude donesena na ginekološkom-onkološkom konzilijumu.

#### *1.2.7.5. Praćenje pacijentkinja u remisiji (follow-up)*

Zbog visokog rizika od relapsa bolesti, većina pacijentkinja koje su u kompletnoj kliničkoj remisiji prate se, najčešće tromesečno, kombinacijom pregleda male karlice, kompjuterizovanom tomografijom abdomena i male karlice i merenjem vrednosti tumorskog markera CA 125. Ipak, nijedna od ovih metoda ne doprinosi smanjenju simptoma ili poboljšanom preživljavanju.

Za razliku od opšteg skrininga, porast nivoa CA 125 posle primarnog lečenja visoko je specifičan, pogotovo ako je potvrđen ponovnim testom. Studije su, međutim, potvrdile da uvođenje hemoterapije u trenutku porasta CA 125 u odnosu na uvođenje u trenutku klinički jasnog recidiva, ne daje poboljšanje ni u smislu preživljavanja, niti kvaliteta života (Buys i sar., 2005; Berek i sar., 2010; Gershenson i sar., 2010; Di Saia i sar., 2011).

#### *1.2.7.6. Sistemsko lečenje epitelijalnog karcinoma jajnika*

Karcinom jajnika se još od ranog perioda razvoja citostatske terapije pokazao kao jedan od najrezistentnijih maligniteta među solidnim tumorima (Bateman i sar., 1959). Sedamdesetih godina prošlog veka primenjivani su alkilirajući agensi u lečenju epitelnog karcinoma jajnika, a od 1976. godine, posle prvih publikovanih rezultata o efikasnosti cisplatine u ovoj bolesti, započela je era moderne hemioterapije u karcinomu jajnika. Osamdesete i devedesete godine 20. veka su obeležile mnogobrojne studije koje su istraživale mogućnosti cisplatine i karboplatine primenjenih kao monoterapija ili u različitim kombinacijama. Sledeći značajan terapijski iskorak učinjen je uvođenjem paklitaksela, dok su poslednje dve decenije ispitivani i brojni drugi „konvencionalni“



citotoksični lekovi i biološka („ciljana“) terapija u lečenju epitelijalnog karcinoma jajnika (Bell-McGuinn i sar., 2011; Bast i sar., 2011).

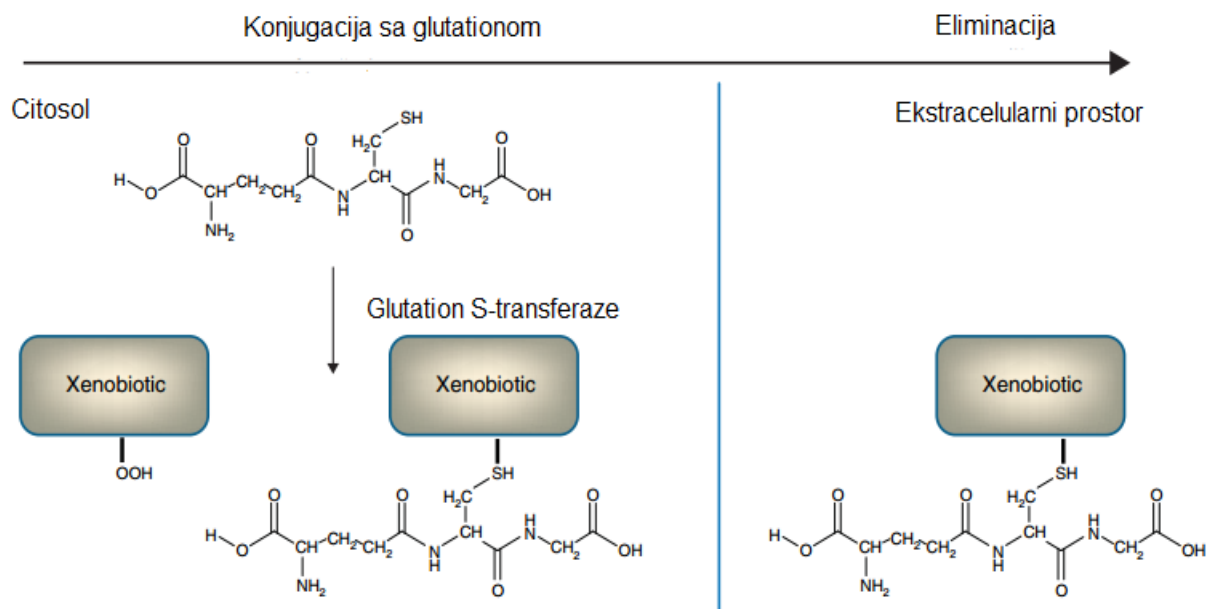
Uvođenje ovih novijih lekova u terapijsku kaskadu lečenja karcinoma jajnika značajno je doprinelo poboljšanju ukupanog ishoda lečenja: tokom poslednjih dvadesetak godina 5-godišnja stopa preživljavanja je sa oko 30% povećana na oko 50%, a stopa izlečenja (za sve stadijume bolesti) danas iznosi oko 25-35%, što omogućava da se kod jednog broja pacijentkinja epitelijani karcinom jajnika može smatrati hroničnom bolešću (Kim i sar., 2012). Zbog činjenice da mogu doprinositi osetljivosti na primenjenu hemioterapiju, a zbog svoje uloge u procesu detoksikacije i inaktivacije ksenobiotika, enzimi uključeni u proces detoksikacije, kao i interindividualne genske varijacije u genima koji ih kodiraju, mogu biti od velikog značaja u karcinomu jajnika.

### **1.3.ULOGA GLUTATION S-TRANSFERAZA U KARCINOMU JAJNIKA**

#### **1.3.1. Glutation S-transferaze**

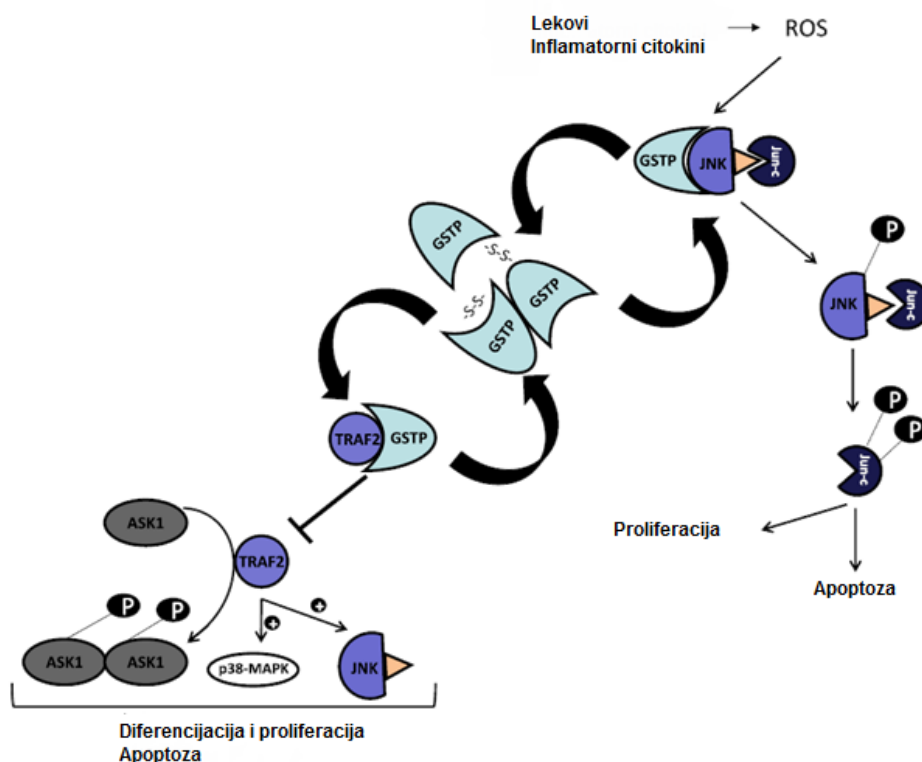
Veliki broj jedinjenja koja su identifikovana kao faktori rizika za pojavu karcinoma u organizmu podležu reakcijama biotransformacije i detoksikacije u kojima važnu ulogu imaju glutation S-transferaze (GST). Glutation transferaze su velika superfamilija izoenzima, koja čini oko 3% ćelijskih proteina. GST detoksikuju potencijalne kancerogene konjugacijom sa glutationom (GSH), usled čega ova jedinjenja postaju manje reaktivna prema nukleinskim kiselinama (Habig i sar., 1994; Di Pietro i sar., 2010; Wu i Dong, 2012) (Slika 4).

Pored katalitičke uloge, pokazano je da pojedini izoenzimi GST, kao što su GSTP1 ili GSTM1, učestvuju i u protein:proteinским interakcijama sa određenim MAP kinazama (eng. *Mitogen-activated protein kinases*) poput JNK (eng. *c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase*) ili ASK1 (eng. *Apoptosis signal-regulating kinase 1*), i na taj način imaju potencijalnu regulatornu ulogu u signalnim putevima uključenim u proces apoptoze (Tew i Townsend, 2012; Board i Menon, 2013) (Slika 5).



**Slika 4.** Uloga GST u detoksikaciji ksenobiotika (slika preuzeta iz rada Di Pietro i sar., 2010)

Postoje velike interindividualne varijacije u izoenzimskom profilu GST, zbog činjenice da je unutar skoro svih klasa GST čoveka zabeleženo prisustvo genskog polimorfizma, koji za posledicu ima potpuno odsustvo ili izmenjenu katalitičku efikasnost ovih enzima. Usled nedostatka ili prisustva izmenjene enzimske aktivnosti GST, pojedine osobe imaju smanjen kapacitet za zaštitu od kancerogenih jedinjenja, što pogoduje bržem slomu antitumorskih mehanizama, pa ove osobe imaju veći rizik za pojavu tumora (Hayes i sar., 2000; Wu i Dong, 2012). Zbog činjenice da u nastanku karcinoma jajnika značajnu ulogu ima izloženost hemijskim kancerogenima, veoma je važno ispitati uticaj genetskog polimorfizma GST, kao enzima koji metabolišu ova jedinjenja, na predispoziciju za nastanak ovih tumora.

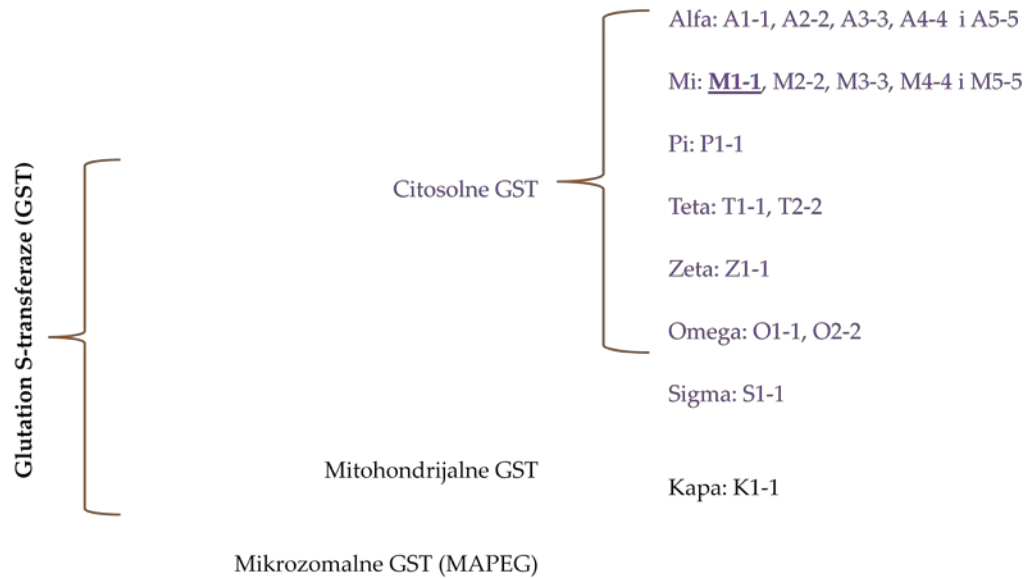


Slika 5. Nekatalitička uloga GST (slika preuzeta iz rada Board i Menon, 2013)

Superfamilija glutation S-transferaza je podeljena na tri familije koje čine citosolne, mitohondrijalne i mikrozomalne GST. Citosolne GST su dalje podeljene na nekoliko klasa na osnovu primarne strukture (Hayes i Strange, 2000; Wu i Dong, 2012) (Slika 6). Članovi iste klase imaju minimum 50% identičnih sekvenci. Nomenklatura glutation S-transferaza zasniva se na sličnosti u primarnoj strukturi GST i podeli na klase koje obuhvataju GST kodirane od strane veoma bliskih sekvenci (Tabela 10).

Kod ljudi je do sada identifikovano sedam grupa gena koji kodiraju sedam klasa citosolnih GST: pet GST  $\alpha$  (geni *GSTA1-5*), pet GST  $\mu$  (geni *GSTM1-5*), jedan GST  $\pi$  (gen *GSTP1*), dva GST  $\theta$  (geni *GSTT1-2*), jedan GST  $\zeta$  (gen *GSTZ1*), dva GST  $\Omega$  (geni *GSTO1-2*) i GST  $\varsigma$  (gen *GSTS1*) klase. Genski polimorfizam je otkriven u nekoliko familija GST

gena:  $\alpha$  (*GSTA1* i *GSTA2*),  $\mu$  (*GSTM1*, *GSTM3* i *GSTM4*),  $\pi$  (*GSTP1*),  $\theta$  (*GSTT1*),  $\zeta$  (*GSTZ1*),  $\Omega$  (*GSTO1*) i MAPEG (*MGST1*, *LTC<sub>4</sub>S* i *FLAP*) (Xu i sar., 1998; McLellan i sar., 1997; Patskovsky i sar., 1999) (Tabela 10).



**Slika 6.** Familija glutation S-transferaza (slika preuzeta iz rada Wu i Dong, 2012)

Proizvodi ekspresije GST gena su različiti izoenzimi GST koji se međusobno razlikuju na osnovu svojih strukturalnih, fiziko-hemijskih i imunoloških osobina. Katalitičku aktivnost GST ispoljavaju u obliku homo ili heterodimera, koji nastaju kombinovanjem identičnih ili različitih subjedinica koje pripadaju istoj klasi GST (Ketterer B i Christodoulides LG., 1994; Mannervik B i Danielson UH., 1988).

**Tabela 10.** Humane solubilne glutation S-transferaze, klase i hromozomska lokalizacija njihovih gena

<i>Oznaka enzima</i>	<i>Klasa</i>	<i>Gen</i>	<i>Hromozom</i>
GST A1-1	Alfa	<i>GSTA1</i> *	6p12
GST A2-2	Alfa	<i>GSTA2</i> *	6p12
GST A3-3	Alfa	<i>GSTA3</i>	6p12
GST A4-4	Alfa	<i>GSTA4</i>	6p12
GST A5-5 <sup>a</sup>	Alfa	<i>GSTA5</i>	6p12
GST M1-1	Mi	<i>GSTM1</i> *	1p13
GST M2-2	Mi	<i>GSTM2</i>	1p13
GST M3-3	Mi	<i>GSTM3</i> *	1p13
GST M4-4	Mi	<i>GSTM4</i> *	1p13
GST M5-5	Mi	<i>GSTM5</i>	1p13
GST P1-1	Pi	<i>GSTP1</i> *	11q13
GST T1-1	Tete	<i>GSTT1</i> *	22q11.2
GST T2-2	Tete	<i>GSTT2</i>	22q11.2
GST Z1-1	Zeta	<i>GSTZ1</i> *	14q24.3
GST O1-1	Omega	<i>GSTO1</i> *	10q24.3
GST O2-2	Omega	<i>GSTO2</i>	10q24.3
PGD2/GST S1-1 <sup>b</sup>	Sigma	<i>PGD2</i>	4q22.3

<sup>a</sup> Ekspresija proteina kodiranog genom *GSTA5* klase alfa treba tek da bude dokazana <sup>b</sup> Klasa sigma GST je poznata kao glutation-zavisna prostaglandin D<sub>2</sub> sintaza \* prisutan polimorfizam

### 1.3.2. Polimorfizam glutation S-transferaza u karcinomu jajnika

#### 1.3.2.1. Polimorfizam *GSTA1*

Pripadnici GSTA klase su kodirani od strane 5 različitih gena (*GSTA1*-*A5*), smeštenih na hromozomu 6. Iako je polimorfizam opisan kod svih članova A klase, smatra se da najveći klinički značaj ima polimorfna ekspresija *GSTA1*. Naime, protein *GSTA1*,

koji katališe detoksikaciju kancerogenih metabolita životne sredine i duvanskog dima (policiklični aromatični ugljovodonični dioleposkidi) je najviše eksprimirana u jetri. Genski polimorfizam *GSTAI C-69T* obuhvata tri povezane supstitucije baza u promotorskom regionu na poziciji 567, 69 i 52, što ima za posledicu velike kvantitativne razlike u ekspresiji i aktivnosti enzima (Coles i sar., 2001). Oko 60% osoba bele rase poseduje *GSTAI\*A* alel sa T, C i G na pozicijama 567, 69 i 52, dok preostalih 40% poseduje varijantni *GSTAI\*B* alel u kome se na ovim pozicijama nalaze G, T i A (Habig i sar., 1994). Osobe koje su homozigoti za *GSTAI\*B* imaju četiri puta slabiju ekspresiju *GSTAI* u jetri. Pokazano je da prisustvo *GSTAI\*B* alela predstavlja biomarker rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma (Sweeney i sar., 2002). Naime, veća osetljivost za nastanak kolorektalnog karcinoma, može se objasniti činjenicom da ove osobe nemaju na raspolaganju dovoljno *GSTAI* za detoksikaciju mutagenih derivata heterocikličnih amina prisutnih u termički obrađenom mesu (Sweeney i sar., 2002; Magagnotti i sar., 2003). S obzirom da je najznačajniji kancerogeni metabolit duvanskog dima supstrat za *GSTAI*, kao i da pušenje predstavlja jedan od faktora rizika za pojavu karcinoma jajnika, od velikog značaja je ustanoviti da li polimorfizam *GSTAI* predstavlja modulator rizika za pojavu ovog tumora kod žena pušača.

#### 1.3.2.2. Polimorfizam *GSTM1*

Veza između uloge *GST* polimorfizma kao biomarkera za nastanak karcinoma jajnika je do sada najviše izučavana za mi klasu *GST* (Spurdle i sar., 2001; Beeghley i sar., 2006). Naime, *GSTM1* genski lokus ove familije na hromozomu 1 privlači pažnju istraživača, jer je prisutan u svega 55% populacije (Board i sar., 1981), a njegov proizvod *GSTM1* detoksikuje kancerogene iz duvanskog dima, kao što su policiklični aromatični ugljovodonici i aromatični amini (Ketterer i sar., 1992). Osobe kojima nedostaje konstitutivna ekspresija *GSTM1* (*GSTM1\*0*), nemaju mogućnost adekvatne detoksikacije ovih kancerogena. Zbog toga kod osoba sa *GSTM1* nultim genotipom može doći do kumulativnih oštećenja molekula DNK i nastanka mutacija, što može imati za posledicu nastanak karcinoma. Naime, pokazano je da osobe sa *GSTM1* nultim alelom imaju veći rizik za pojavu karcinoma kolona, larinksa i pluća (Brockmüller i sar., 1994; Quiñones i

sar., 2001; Ateş i sar., 2005). Uprkos činjenici da se GSTM1 i GSTA1 preklapaju u pogledu specifičnosti prema supstratima iz duvanskog dima, nema podataka da li genski polimorfizam ove dve klase ima kumulativni efekat na rizik za pojavu karcinoma jajnika.

#### 1.3.2.3. Polimorfizam *GSTP1*

Zbog činjenice da je *GSTP1* polimorfan protein, što za posledicu ima različit kapacitet za detoksikaciju ksenobiotika, izvedeno je nekoliko epidemioloških studija da bi se ustanovilo da li postoji veza između različitih varijanti *GSTP1* alela i različitih nemalighnih i malignih bolesti (Fryer i sar., 2000; Sundberg i sar., 1998). Opisane su četiri glavne alelske forme *GSTP1*: *GSTP1*\*A (105I, 114A), *GSTP1*\*B (105V, 114A), *GSTP1*\*C (105V, 114V) i *GSTP1*\*D (105I, 114V). Pokazano je da se karcinomi pluća, testisa i jajnika češće javljaju kod homozigota *GSTP1*\*B (Rydberg i sar., 1997; Harries i sar., 1997), posebno karcinom jajnika kod pušača (Hayes i sar., 2000; Landi i sar., 2000; Habdous i sar., 2004). Genski polimorfizam *GSTP1*, kod bolesnica sa karcinomom jajnika ispitivan je u nekoliko studija koje su pratile efikasnost primenjene terapije i preživljavanje, međutim rezultati pomenutih istraživanja su kontradiktorni (Spurdle i sar., 2001; Beeghley i sar., 2006; Morari i sar., 2006; Nagle i sar., 2007).

#### 1.3.2.4. Polimorfizam *GSTT1*

Sledeća izučavana klasa GST, čiji polimorfizam može imati značaja za pojavu karcinoma jajnika, je pripadnik teta klase, *GSTT1*, čiji gen je lokalizovan na hromozomu 22. Slično kao u slučaju *GSTM1*, oko 20 do 30 % populacije uopšte nema ovaj enzim, jer poseduje *GSTT1* nulti genotip. Ove osobe imaju smanjenu metaboličku aktivnost prema halogenim derivatima acikličnih ugljovodonika, kojima su izložene mnoge osobe u hemijskoj industriji (Brockmöller i sar., 1994; Ateş i sar., 2005). Iako je genski polimorfizam *GSTT1*, kod bolesnica sa karcinomom jajnika izučavan u nekoliko studija, još uvek je nejasno da li postoji veza između *GSTT1* nultog genotipa (*GSTT1*\*0) i povećanog rizika za nastanak ovog karcinoma (Howells i sar., 2004; Morari i sar., 2006; Beeghley i sar., 2006; Gates i sar., 2008).

#### *1.3.2.5. Polimorfizam GSTO2*

Opisano je 66 polimorfizama u *GSTO2* genu, ali se po povezanosti sa nastankom oboljenja izdvojio *GSTO2* rs156697 (Mukerjee i sar., 2006). Kod ovog polimorfizma jednog nukleotida promena nastaje u okviru egzona 4, na nukleotidu 424, gde adenin (A) biva zamenjen guaninom (G), što vodi supstituciji asparagina (Asn) aspartatom (Asp) u aminokiselini 142 (\*N124D). Genotip A/A je prisutan u oko 59% populacije, A/G u oko 37%, a G/G u oko 4% populacije (Marahatta i sar., 2006). Dosadašnji rezultati o povezanosti polimorfizma *GSTO2* sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika ukazuju da ovaj SNP može doprinosti podložnosti za nastanak bolesti (Pongstaporn i sar., 2006).

#### *1.3.2.6. Značaj polimorfizma GST u riziku za nastanak karcinoma jajnika*

U karcinomu jajnika, pažnja istraživača je najviše bila usmerena na citosolne klase M1, T1 i P1 kao moguće pokazatelje rizika za obolevanje od ovog karcinoma (Oliveira i sar., 2012; Fang i sar., 2013; Jin i Hao, 2014; Pereira i sar., 2016), dok klasa GSTA1, koja značajno utiče na redoks ravnotežu u ćeliji, do sada nije ispitivana. Kada je u pitanju *GSTO2* klasa, postoje rezultati istraživanja koji govore u prilog uloge ove klase GST u riziku za nastanak karcinoma jajnika (Pongstaporn i sar., 2006).

Poznato je da, pored jasno definisane uloge koju GST mogu imati u podložnosti za nastanak karcinoma, one mogu takođe uticati i na odgovor na hemioterapiju. Sawers i saradnici su nedavno pokazali da *GSTP1* ima značajnu ulogu u metabolizmu cisplatine i karboplatine u ćelijama karcinoma jajnika i da razlike u intertumskoj ekspresiji *GSTP1* direktno utiču na odgovor na hemioterapiji platinom kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika (Sawers i sar., 2014). Ovi rezultati sugerišu da je od velikog značaja identifikacija podgrupa pacijentkinja sa karcinomom jajnika, koje mogu imati koristi od primene novih terapijskih protokola, a na osnovu njihovog kapaciteta za detoksikaciju i sposobnosti da se pozitivni efekti primenjene antitumorske terapije potenciraju, a toksični svedu na minimum.



## 2. CILJ RADA

Ovaj rad imao je za cilj:

1. Da se odredi učestalost *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTAI1*, *GSTP1* i *GSTO2* genotipova kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika i pripadnica odgovarajuće kontrolne grupe
2. Da se ispita da li postoji uticaj genskog polimorfizma *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTAI1*, *GSTP1* i *GSTO2* na rizik za nastanak karcinoma jajnika
3. Da se ispita da li se prisustvo različitih genskih varijanti *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTAI1*, *GSTP1* i *GSTO2* može dovesti u vezu sa fenotipskom karakteristikama karcinoma jajnika
4. Da se pokaže da li polimorfna ekspresija *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTAI1*, *GSTP1* i *GSTO2* ima prognostički značaj kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. SELEKCIJA ISPITANICA

Izvedena je studija slučajeva i kontrola (engl. *case – control study*), u koju su bile uključene 103 pacijentkinje, prosečne starosti  $59,73 \pm 8,92$  godina, sa histopatološki potvrđenom dijagnozom karcinoma jajnika, koje su lečene u Klinici za ginekologiju Kliničko-bolničkog centra Zemun-Beograd, na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i na Institutu za onkologiju Vojvodine.

Nakon ultrasonografskog pregleda male karlice i postavljanja sumnje na postojanje tumorske promene na jednom ili oba jajnika, pacijentkinja je upućivana na dodatno ispitivanje koje je uključivalo određivanje vrednosti specifičnih tumorskih markera CA125, HE4 i ROMA (eng. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) indeksa. Nakon dobijanja rezultata i postavljanja diferencijalne dijagnoze malignog tumora jajnika, izvršene su dijagnostičke procedure neophodne za prikazivanje onkološkom konzilijumu. Onkološki konzilijum su činili specijalista ginekologije i akušerstva-subspecijalista onkologije, specijalista radiologije - radioterapeut, specijalista interne medicine - subspecijalista onkologije i specijalista patološke anatomije. Nakon prikazivanja konzilijumu, gde su razmatrane vrednosti tumorskih markera i nalazi ultrazvučnih pregleda, kompjuterizovne tomografije ili nuklearno magnetne rezonance abdomena i male karlice, donošena je odluka o načinu lečenja, operativni zahvat ili primarna hemioterapija. Sve pacijentkinje uključene u studiju su podvrgnute operativnom lečenju.

Nakon adekvatne preoperativne pripreme izvršen je operativni zahvat. Po operativnom otvaranju abdomena uziman je uzorak tečnosti za citološku dijagnostiku. Zavisno od procene zahvaćenosti organa malignom bolesti, operativni zahvati su se kretali od uzimanja biopsija radi utvrđivanja tipa maligne bolesti, preko adneksektomija, histerektomija sa obostranom adneksektomijom, pelvičnom i paraaortalnom limfadenektomijom, uz uzimanje biopsija sa visceralnog peritonema male karlice, abdomena i dijafragme kao i biopsija sa sumnjivih mesta na organima, do optimalne

citoredukcije i postizanja nivoa resekcije R0 što znači da ne postoji makroskopski vidljiva bolest uz primenu hipertermijske intraperitonealne hemioterapije u izabranim slučajevima. Kod određenog broja pacijentkinja je rađena i "*second look*" operacija nakon primene hemioterapije i uvođenja maligne bolesti u fazu remisije.

Histopatološka dijagnoza karcinoma jajnika (serozni, endometrioidni, mucinozni i svetlih-ćelija) izvedena je prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*) za tumore ženskih reproduktivnih organa (Kurman i sar., 2014) i klasifikaciji Internacionalne federacije za ginekologiju i akušerstvo (eng. *International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO*) (Prat i sar., 2014). Praćenje pacijentkinja je otpočelo onog trenutka kada im je postavljena dijagnoza karcinoma jajnika i trajalo je 36 meseci. Kontrolnu grupu je činilo 178 ispitanica uparenih po starosti ( $60,65 \pm 12,40$  godina), bez verifikovanog malignog oboljenja, a koje su deo biobanke na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju. Kriterijum za uključenje ispitanica u kontrolnu grupu bilo je odsustvo pozitivne porodične anamneze bilo kog karcinoma. Uslov za isključivanje iz istraživanja je bila želja ispitanika da ne učestvuju u istraživanju iz ličnih razloga.

Za prikupljanje osnovnih demografskih podataka, kao i podataka o izloženosti pretpostavljenim faktorima rizika za nastanak karcinoma jajnika, korišćen je strukturisani epidemiološki upitnik, sastavljen na Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji su ispitanice popunjavale u vreme uzimanja krvi za analize. Ovaj upitnik je prethodno validiran korišćenjem odgovarajućih procedura. Upitnik je sadržao pitanja o starosti, mestu rođenja i stanovanja, broju porođaja, zaposlenju, pušenju i dužini pušačkog staža, konzumiranju alkohola, komorbiditetu, pozitivnoj porodičnoj anamnezi karcinoma jajnika i dojke, prisustvu endometrioze, kao i upotrebi hormonske terapije i analgetika (Prilog 1). U našem istraživanju, u grupu gojaznih osoba su svrstavane ispitanice sa indeksom telesne mase (eng. *body mass index, BMI*) preko 25, a u grupu pušača one sa minimalnim 60-odnevnom pušačkim stažom pre uključanja u istraživanje. Pored toga, ispitanice su odgovarale na pitanja u vezi broja cigareta popušanih dnevno, kao i ukupnom pušačkom stažu.

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sve osobe od kojih je uziman biološki materijal, koji je korišćen u studiji, kao i lični podaci, potpisale su pristanak da su obaveštene o ciljevima i očekivanim ishodima studije.

### **3.2. ODREĐIVANJE GENSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA**

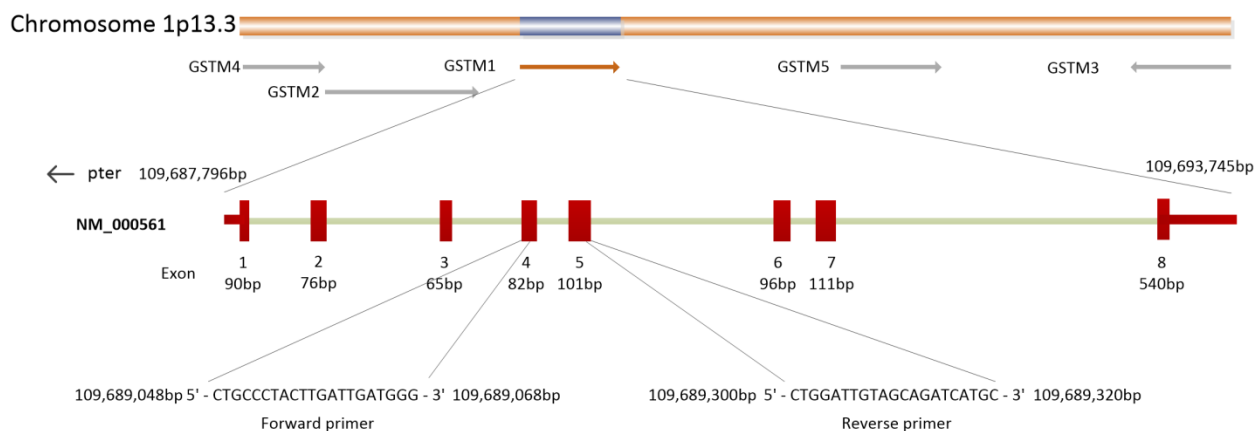
Delecioni polimorfizam *GSTM1* i *GSTT1* gena je određivan reakcijom lančanog umnožavanja (engl. *polimerase chain reaction, PCR*). Polimorfizmi jednog nukleotida ispitivani su analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP*) za *GSTA1* gen, odnosno metodom qPCR (eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) za *GSTP1* i *GSTO2* gene. DNK koja je korišćena za PCR analize je iz uzoraka pune krvi, koja je uzeta u vakutejnere sa citratom. Uzorci pune krvi su alikvotirani i do izvođenja PCR analiza čuvani na -20°C.

#### **3.2.1. Izolacija DNK**

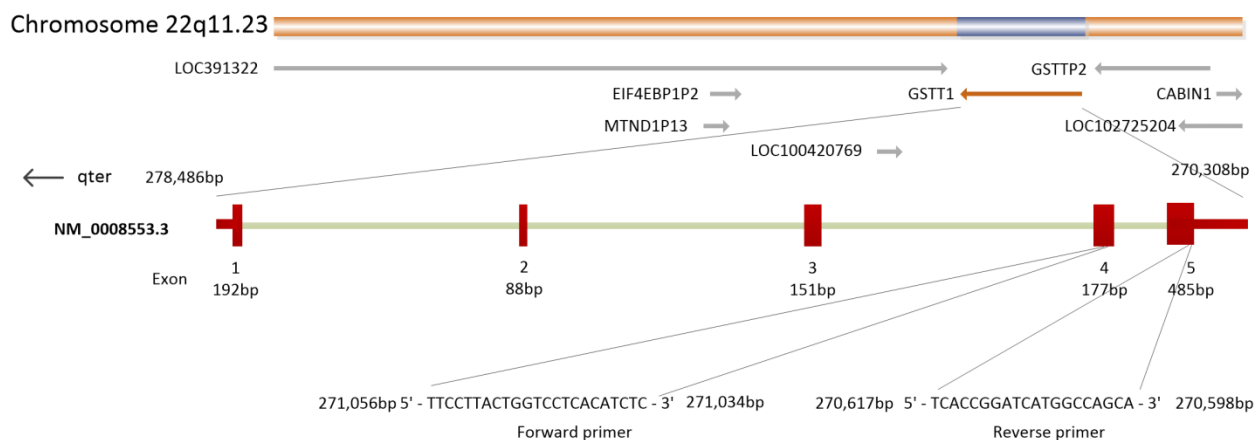
DNK je izolovana iz leukocita periferne krvi korišćenjem *Qiagen DNA* mini kita (*Qiagen, Chatsworth CA, USA*). Ovom metodom liziraju se ćelijske membrane leukocita u rastvoru deterdženta, a histoni i ostali proteini vezani za DNK uklanjaju se enzimskom digestijom delovanjem proteinaze K. Rezultat je slobodna DNK, oslobođena od proteina, nukleaza i ostalih kontaminata koji mogu da interferiraju sa PCR reakcijom. Dobijeni lizat se prenosi u mini spin kolone u kojima se nalazi silikonska-gel membrana koja selektivno vezuje DNK. Ostatak lizata se potom ispira korišćenjem serije pufera koje sadrže soli i etanol. Na kraju se DNK ispira sa kolone i čuva na -20°C do izvođenja PCR reakcija. Koncentracija DNK je određivana korišćenjem *GeneQuant pro* (*Biochrom, Cambridge, England*).

### 3.2.2. Određivanje *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizma

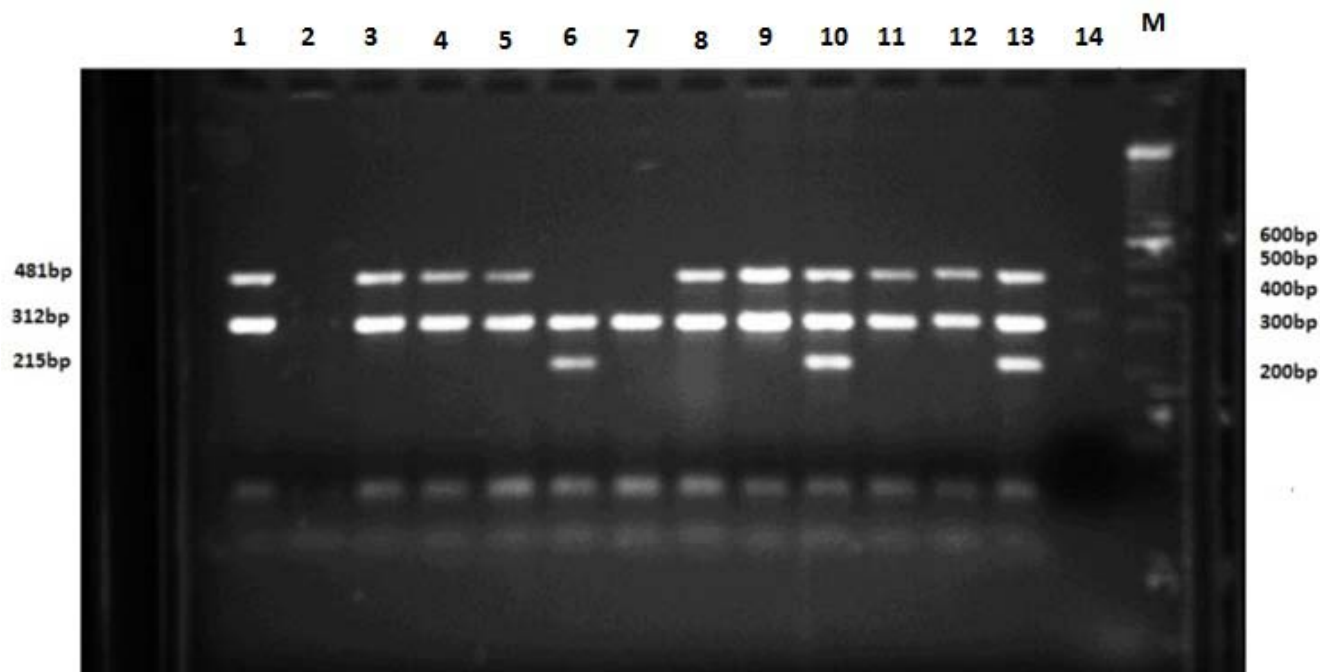
Polimorfizam *GSTM1* i *GSTT1* gena je određivan po multipleks PCR metodi Abdel-Rahmana i saradnika (Abdel-Rahman i sar., 1996). Pored odgovarajućih prajmera za *GSTM1* (*forward* 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' i *reverse* 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3') (Slika 7) i *GSTT1* (*forward* 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' i *reverse* 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3') (Slika 8), korišćeni su i prajmeri za *CYP1A1* (*forward* 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3' i *reverse* 5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC-3') *housekeeping* gen, koji je služio kao unutrašnja kontrola u cilju potvrde prisustva DNK i uslova PCR-a. PCR reakciona smeša je inkubirana i inicijalno denaturisana na 94°C u toku 4 minuta. Nakon toga, usledilo je 30 ciklusa u kojima su ponavljana tri naredna koraka: denaturacija (94°C u toku 30 sekundi), pripajanje prajmera (30 sekundi na 59°C) i ekstenzija prajmera (72°C u toku 45 sekundi). Nakon poslednjeg ciklusa uzorci su inkubirani na 72°C tokom 5 minuta (finalna ekstenzija). Ovom metodom se detektuje prisustvo (barem jedan alel prisutan, homozigot ili heterozigot) ili odsustvo (potpuno odsustvo oba alela) gena.



**Slika 7. *GSTM1* gen.** Nalazi se na hromozomu 1 (1p13.3), sastoji se od 8 egzona i obuhvata region od 21,244 baza. *GSTM1-nulti* genotip je posledica rekombinacije kojom dolazi do delecije segmenta od 20-kb (Xu et al., 1998, Pejovic-Milovancevic et al., 2016)



**Slika 8. *GSTT1* gen.** Nalazi se na hromozomu 2 (22q11.23), sastoji se od 5 egzona i obuhvata region od 8,146 baza (Pejovic-Milovancevic et al., 2016)

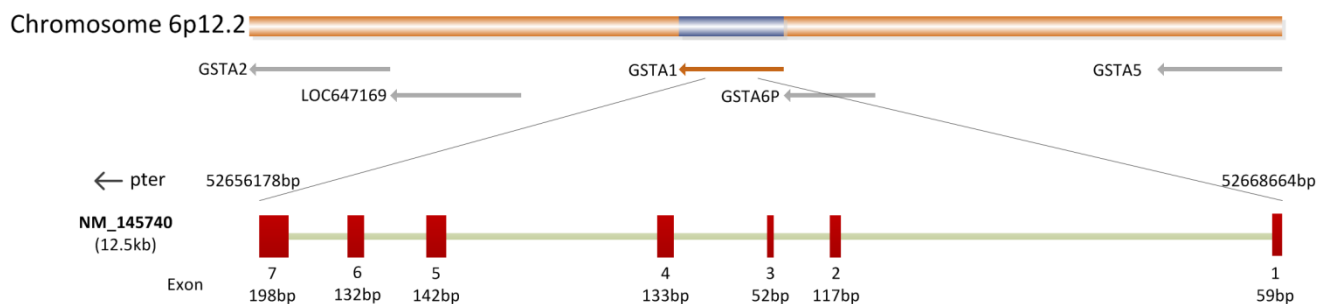


**Slika 9. Analiza genskih varijanti *GSTM1* i *GSTT1* metodom multipleks reakcije lančanog umnožavanja.** M-marker molekulske veličine (broj baznih parova). Trake 6 i 7 pokazuju odsustvo trake veličine 481 bp, odnosno prisustvo *GSTT1-nultog* genotipa (homozigoti). Trake 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 i 13 pokazuju traku veličine 481 bp, odnosno prisustvo *GSTT1-aktivnog* genotipa, (homozigoti ili heterozigoti). Trake 6, 10 i 13 pokazuju traku veličine 215 bp, odnosno prisustvo *GSTM1-aktivnog* genotipa, (homozigoti ili heterozigoti). Trake 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11 i 12 pokazuju odsustvo trake veličine 215 bp, odnosno prisustvo *GSTM1-nultog* genotipa (homozigoti). *CYP1A1* (unutrašnja kontrola, 312 bp) - prisutan u svim uzorcima sem 2 i 14 koji nisu uspeali.

PCR proizvodi su razdvajani na 2,2% agaroznom gelu i vizuelizovani pomoću etidijum bromida na 302 nm. Elektroforeza je trajala 15 minuta na 150V, 0,27A i 50W. Prisustvo trake veličine 215 bp ukazuje na prisustvo gena za *GSTM1* (homozigotnog ili heterozigotnog genotipa). Odsustvo traka ukazuje na homozigotnu deleciju gena za *GSTM1*, odnosno *GSTM1 nulli* genotip (Slika 9).

### 3.2.3. Određivanje *GSTA1 C-69T* polimorfizma

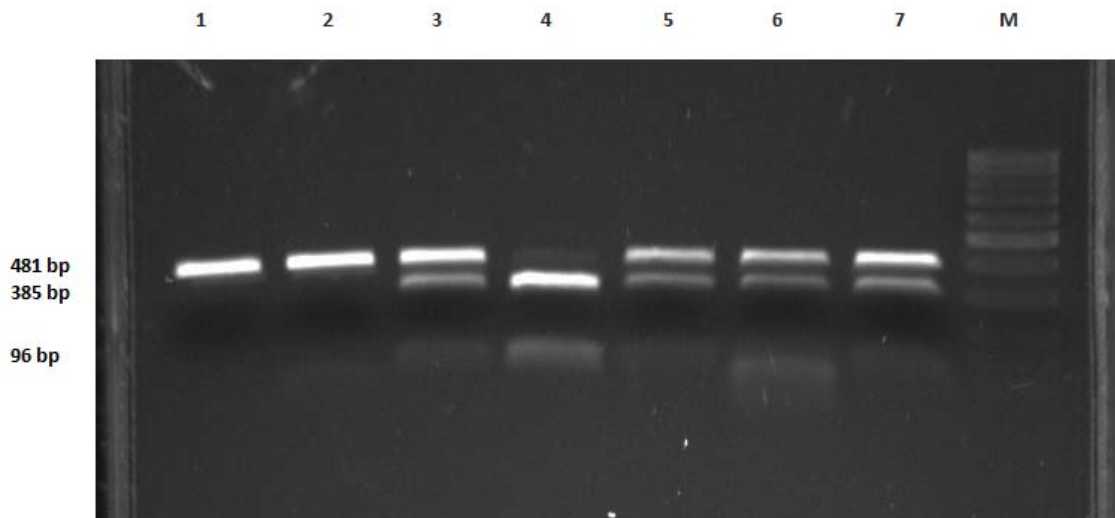
Polimorfizam *GSTA1 C-69T* (rs3957356) je određivan po PCR-RFLP metodi Ping i saradnika (Ping i sar., 2006), upotrebom odgovarajućih prajmera za *GSTA1* (*forward* 5'-GCATCAGCTTGCCCTTCA-3' i *reverse* 5'-AAACGCTGTCACCGTCCTG-3') (Slika 10). PCR reakciona smeša je inkubirana i inicijalno denaturisana na 94°C tokom 4 minuta. Nakon toga, usledila su 33 ciklusa u kojima su ponavljana tri naredna koraka: denaturacija (94°C u toku 20 sekundi) pripajanje prajmera (20 sekundi na 58°C) i ekstenzija prajmera (72°C tokom 40 sekundi). Nakon poslednjeg ciklusa uzorci su inkubirani na 72°C tokom 5 minuta (finalna ekstenzija).



**Slika 10. *GSTA1* gen.** Nalazi se na hromozomu 6 (6p12.2), sastoji se od 7 egzona (crveno) i 6 introna (zeleno) i obuhvata region od 12.5 kb (Savic Radojevic i Radic, 2014)

Nakon završenog PCR-a izvršena je elektroforeza na 1% agaroznom gelu. Elektroforeza je trajala 15 minuta na 125V, 0.27A i 50W. Kako je za PCR proizvode vezan etidijum – bromid oni se mogu vizuelizovati na 302 nm. Dobijene trake veličine 481bp odgovaraju *GSTAI* genu.

*GSTAI* C-69T SNP polimorfizam je zatim određivan restrikcijom PCR proizvoda sa *Eam 1104I* enzimom (*Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*). Inkubacija PCR proizvoda i *Eam 1104I* enzima odvijala se na 37°C tokom 16h (preko noći). Posle inkubacije proizvodi restrikcije su razdvajani elektroforezom na 1% agaroznom gelu, a mogu se očekivati sledeći rezultati (Slika 11): *CC* genotip - traka veličine 481bp, *CT* genotip – trake veličine 481bp+385bp+96bp i *TT* genotip – trake veličine 385bp+96bp.

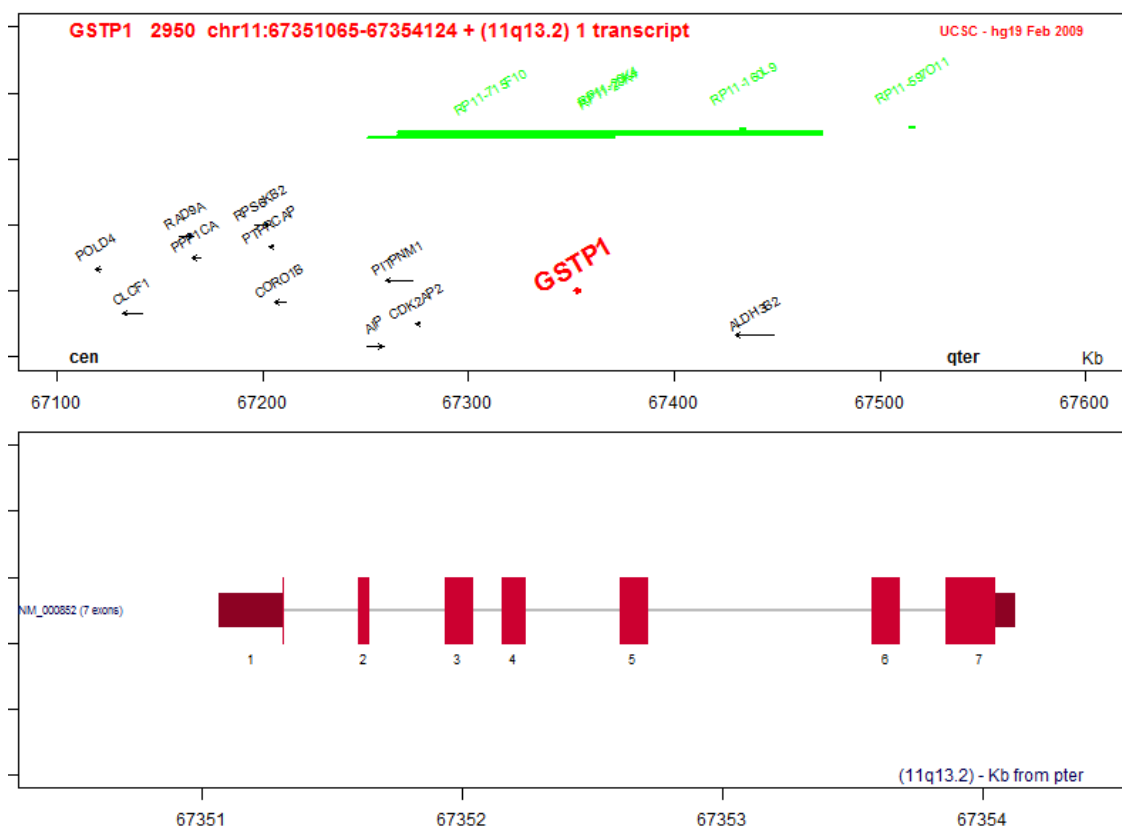


**Slika 11. Analiza genetskih varijanti *GSTAI* metodom PCR-RFLP.** M-marker molekulske veličine (broj baznih parova). Trake 1 i 2 pokazuju jednu traku veličine 481 bp, odnosno prisustvo *GSTAI CC* genotipa (homozigoti). Trake 3,5,6 i 7 pokazuju tri trake veličine 481, 385 i 96 bp, odnosno prisustvo *GSTAI CT* genotipa (heterozigoti). Traka 4 pokazuje dve trake veličine 385 i 96 bp, odnosno prisustvo *GSTAI TT* genotipa (homozigoti).



### 3.2.4. Određivanje *GSTP1* Ile105Val polimorfizma

Polimorfizam *GSTP1* Ile105Val (rs1695) je određivan uz upotrebu *Applied Biosystems TaqMan® Drug Metabolism Genotyping* eseja (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) (Slika 12). Koncentracija DNK je određivana na *GeneQuant* pro (*Biochrom, Cambridge, England*) aparatu. Uzorci DNK, kao i pozitivna i negativna kontrola, su nanošeni na ploču sa 96 bunarčića tako da je nakon uparavanja DNK na 65°C (*Mastercycler gradient thermal cycler, Eppendorf, Hamburg, Germany*) u svakom odgovarajućem bunarčiću bila ista količina DNK.

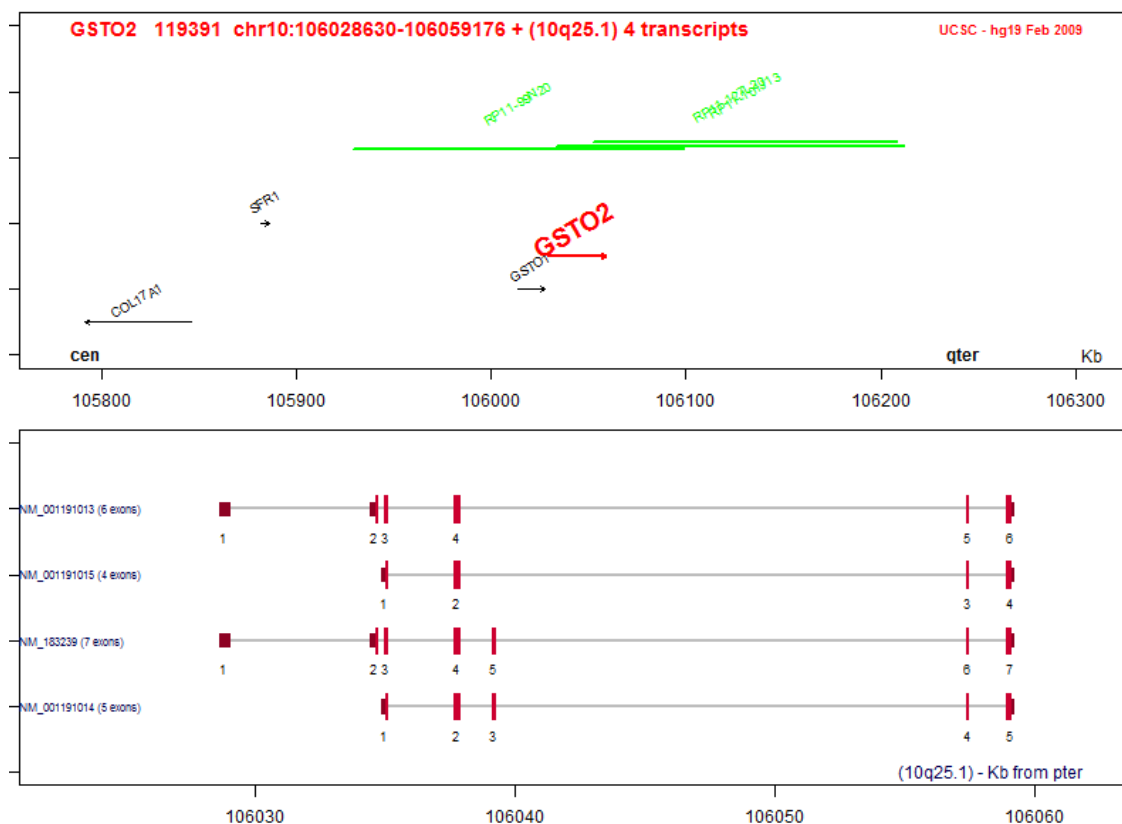


**Slika 12. *GSTP1* gen.** Nalazi se na hromozomu 11 (11q13.2), sastoji se od 7 egzona i obuhvata region od 3,066 baza (*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*)

Reakciona mešavina bila je sačinjena od PCR MasterMixa (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) i fluorescentno obeležene probe i nanošena je uz pomoć *EppMotion* robota (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) dok je PCR amplifikacija i očitavanje fluorescence izvođeno metodom qPCR (*Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany)*).

### 3.2.5. Određivanje *GSTO2* polimorfizma

Metodom qPCR određivan je polimorfizam *GSTO2* (zamena A u G na kodonu 142) (rs156697) (Slika 13). Korišćen je *Applied Biosystems TaqMan® Drug Metabolism Genotyping* esej (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*).



**Slika 13. *GSTO2* gen.** Nalazi se na hromozomu 10 (10q25.1), sastoji se od 10 egzona i obuhvata region od 36,5 kb (*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*)

Ukratko, nakon razblaživanja uzoraka DNK na koncentraciju od 6ng/μl, na ploču je nanošeno 5μl uzorka koji se potom uparavao na 65°C oko 30 minuta. Zatim je na ploču naneto 5 μl smeše koja je sadržala Taqman probu i HotStart Master Mix. Termalni protokol za qPCR sastojao se od inicijalne denaturacije u trajanju od 4 minuta, a zatim ponovljenih 40 ciklusa (95°C 15s i 60°C 1 minut).

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza je izvedena korišćenjem Statističkog paketa za društvene nauke (eng. *Statistical Package for the Social Sciences software (IBM Statistics SPSS, version 20.0)*). Distribucije frekvencija demografskih karakteristika i prepoznatih faktora rizika za nastanak karcinoma jajnika, kao što su starost, broj porođaja, pušenje i dužina pušačkog staža, konzumiranje alkohola, komorbiditet, pozitivna porodična anamneza karcinoma jajnika i dojke, prisustvo endometrioze, kao i upotreba hormonske terapije i analgetika su određivani kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika i ispitanica odgovarajuće kontrolne grupe. Statistička analiza se sastojala iz primene  $\chi^2$  testa za procenu značajnosti razlike u frekvenciji dobijenih rezultata između ispitivanih pacijentkinja i kontrolne grupe, kao i za ispitivanje povezanosti genotipova sa fenotipskim karaktersitikama tumora.

Pored deskriptivne statistike, statistička analiza je uključivala i procenu da li se ispitivani genotipovi nalaze u *Hardy Weinberg*-ovoj ravnoteži, kao i primenu  $\chi^2$  testa za određivanje značajnosti razlike u frekvenciji genotipova između pripadnica studijske i kontrolne grupe. Efekti genetskog polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma jajnika su procenjivani pomoću principa logističke regresije koji su korišćeni za računanje OR (eng. *odds ratio*) sa intervalom poverenja od 95% (eng. *confidence interval, CI 95%*). Na osnovu distribucije naših podataka i prethodnog znanja o karcinomu jajnika korigovali smo rezultate u odnosu na starost i BMI zbog potencijalnog efekta u multivarijantnom logističkom regresionom modelu.

Preživljavanje pacijentkinja sa karcinomom jajnika praćeno je primenom *Kaplan Meier* testa za procenu kumulativne verovatnoće preživljavanja. Prediktivna vrednost

različitih GST genotipova procenjivana je Cox regresionim modelom. Efekti genskog polimorfizma i rizika za nastanak smrtnog ishoda od karcinoma jajnika su predstavljeni kao *hazard ratio* (HR) sa intervalom poverenja od 95% (CI 95%). P vrednost  $<0,05$  je smatrana statistički značajnom.

## 4. REZULTATI

U cilju rasvetljavanja uloge glutation transferaza u proceni rizika za nastanak i progresiju karcinoma jajnika, određivan je genski polimorfizam citosolnih *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* i *GSTO2* enzima i analiziran je udruženi efekat ispitivanih genotipova sa malignim fenotipom ovih tumora. Pored toga, procenjivan je prognostički značaj polimorfizama ovih enzima na osnovu togodišnjeg praćenja ovih pacijentkinja.

### 4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANICA

Prosečna starost 103 pacijentkinje sa karcinomom jajnika iznosila je  $59,73 \pm 8,92$  godine, što se nije statistički razlikovalo od prosečne starosti žena uključenih u kontrolnu grupu ( $60,65 \pm 12,40$  godine,  $p > 0,05$ ). Značajna razlika nije uočena ni kada su u pitanju indeks telesne mase (BMI) i pušenje ( $p > 0,05$ ). Naime, prosečan BMI pacijentkinja sa epitelijalnim karcinomom jajnika iznosio je  $25,94 \pm 4,42$ , u odnosu na  $26,26 \pm 5,01$  u kontrolnoj grupi ( $p = 0,611$ ). Kada je u pitanju pušenje, medijana za parameter *paklo-pogodini* iznosila je 15,75 u grupi ispitanica u odnosu na 20 koliko je bilo u kontrolnoj grupi ( $p = 0,382$ ). Sve ostale demografske i kliničke karakteristike pacijentkinje sa karcinomom jajnika prikazane su u Tabeli 11.

Kao što je prikazano, većina pacijentkinja sa karcinomom jajnika imala je 2 porođaja (52%), dijagnoza endometrioze postavljena je kod svega 5 ispitanica (5%), dok je svega 3 pacijentkinje (3%) bilo na hormonskoj terapiji. Četrnaest pacijentkinja sa karcinomom jajnika (14%) imalo je pozitivnu porodičnu anamnezu karcinoma (karcinom jajnika ili dojke), dok je, što je veoma interesantno, jedna pacijentkinja imala dvoje najbližih srodnika (majčina rođena sestra i sestra od tetke po ocu) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Osnovne demografske i kliničke karakteristike pacijentkinja sa karcinomom jajnika

<b>Parametar</b>	<b>Pacijentkinje sa karcinomom jajnika</b>
<b>Starost</b> (godine)	59,73 ± 8,92 <sup>a</sup>
<b>Gojaznost</b> , n (%)	
BMI < 25	49 (48)
BMI > 25	54 (52)
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	25,94 ± 4,42
<b>Pušenje</b> , n (%)	
Ne	61 (59)
Da <sup>b</sup>	42 (41)
<b>Paklo po godini</b>	15,75 (0,30 – 66,00) <sup>c</sup>
<b>Broj porođaja</b> , n (%)	
0	14 (14)
1	27 (26)
2	54 (52)
3	7 (7)
4	1 (1)
<b>Endometrioza</b> , n (%)	
Ne	98 (95)
Da	5 (5)
<b>Porodična anamneza karcinoma</b> , n (%)	
Ne	89 (86)
Da	14 (14) <sup>d</sup>
Karcinom jajnika	6 (6)
Karcinom dojke	9 (10)
<b>Hormonska terapija</b> , n (%)	
Ne	100(97)
Da	3 (3)
<b>FIGO</b> , n (%)	
I	39 (38)
II	25 (24)
III	39 (38)

<sup>a</sup> Srednja vrednost ± SD; <sup>b</sup>Bar 60 cigareta popušeno u toku života pre uključenja u istraživanje; <sup>c</sup>Medijana (min-max); <sup>d</sup>Jedna pacijentkinja je imala dvoje najbližih srodnika sa karcinomom jajnika i dojke; BMI – Indeks telesne mase (*body mass index*); FIGO – klasifikacija Internacionalne federacije za ginekologiju i akušerstvo (*International Federation of Gynecology and Obstetrics staging classification*)

Sve pacijentkinje su imale epitelijalni karcinom jajnika (serozni, endometrioidni, mucinozni ili svetloćelijski), a kada je izvršena stratifikacija prema klasifikaciji Internacionalne federacije za ginekologiju u akušerstvo (FIGO) 39 pacijentkinja su bile stadijum FIGO I (38%), 25 su bile FIGO II (24%) i preostalih 38% su bile FIGO III.

## **4.2. GENSKI POLIMORFIZMI GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA**

Učestalost *GSTM1-nultog* genotipa iznosila je 50% u našoj kontrolnoj grupi, dok je učestalost *GSTT1-nultog* genotipa iznosila 26%, a *GSTT1-aktivnog* genotipa 74%. Kada je u pitanju distribucija *SNP* polimorfizama u kontrolnoj grupi, učestalost *GSTA1-aktivnog* genotipa iznosila je 85%, a *GSTA1* genotipa  *smanjene aktivnosti* 15%, dok su 84% kontrola su bili nosioci *GSTP1 referentnog*, a 15% *GSTP1 varijantnog* genotipa. Učestalost *GSTO2-referentnog* genotipa iznosila je 44% u kontrolnoj grupi, *GSTO2-heterozigotnog* genotipa 50%, a *GSTO2-varijantnog* genotipa 6%.

### **4.2.1. Delecioni polimorfizmi glutation transferaza i rizik za nastanak karcinoma jajnika**

Distribucija *GSTM1* i *GSTT1* genotipova kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika prikazana je u tabeli 12. Učestalost *GSTM1-aktivnog* i *GSTM1-nultog* genotipa, koja je iznosila 52%, odnosno 48%, nije se značajno razlikovala kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na kontrolnu grupu, a značajna povezanost *GSTM1* polimorfizma i podložnosti za nastanak karcinoma jajnika nije uočena (OR=0,93, 95%CI: 0,55-1,59, p=0,811). Nasuprot ovim rezultatima, dobijena je statistički značajna razlika u učestalosti *GSTT1-nultog* (15%) i *GSTT1-aktivnog* (85%) genotipa kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na pripadnice kontrolne grupe i pokazano je da su ispitanice sa *GSTT1-*

aktivnim genotipom u 2-puta većem riziku za obolevanje od karcinoma jajnika u odnosu na nosioce *GSTT1*-nultog genotipa (OR=2,00, 95%CI: 1,00-4,01, p=0,049).

**Tabela 12.** Značaj *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizama u riziku za nastanak karcinoma jajnika

GST genotip	Pacijentkinje sa karcinomom jajnika n, %	Kontrolna grupa n, %	OR (95%CI) <sup>c</sup>	p
<b><i>GSTM1</i></b>				
<i>Aktivni</i> <sup>a</sup>	44 (52)	89 (50)	1,00 (referentna grupa)	
<i>Nulti</i> <sup>b</sup>	41 (48)	89 (50)	0,93 (0,55-1,59)	0,811
<b><i>GSTT1</i></b>				
<i>Nulti</i> <sup>b</sup>	13 (15)	47 (26)	1,00 (referentna group)	
<i>Aktivni</i> <sup>a</sup>	72 (85)	131 (74)	2,00 (1,00-4,01)	0,049

<sup>a</sup>Aktivni, ako je barem jedan aktivni alel prisutan; <sup>b</sup>Nulti, ako nijedan aktivni alel nije prisutan; <sup>c</sup>OR, odnos šansi (eng. *odds ratio*) podešen na starost, BMI i *paklo-po-godini*; CI, interval poverenja (eng. *confidence interval*); *GSTM1* i *GSTT1* genotipizacija je bila uspešna kod 85 pacijentkinja sa karcinomom jajnika i svih ispitanica u kontrolnoj grupi.

#### 4.2.2. Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida glutation transferaza i rizik za nastanak karcinoma jajnika

Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida ili SNP (eng. *single nucleotide polymorphism*) polimorfizmi u osnovi imaju zamenu jednog nukleotida, sa posledičnom zamenom amino kiseline, što dalje može uticati kako na katalitičku, tako i na nekatalitičku aktivnost datog enzima.



Rezultati učestalosti GSTA1 C69T (*rs3957356*) SNP polimorfizma, prikazani u tabeli 13, su pokazali da su žene nosioci bar jednog *GSTA1-aktivnog* alela bile učestalije u grupi pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na kontrolnu grupu (92% vs. 85%), ali se ova razlika nije pokazala statistički značajnom u odnosu na rizik za obolevanje od ovog karcinoma (OR=0,52, 95% CI: 0,22-1,23, p=0,162).

**Tabela 13.** Značaj *GSTA1* i *GSTP1* polimorfizma u riziku za nastanak karcinoma jajnika

GST genotip	Pacijentkinje sa karcinomom jajnika n, %	Kontrolna grupa n, %	OR (95%CI) <sup>c</sup>	<i>p</i>
<b><i>GSTA1</i> (<i>rs 3957356</i>)</b>				
<i>CC+CT</i> (aktivni) <sup>a</sup>	80 (92)	151 (85)	1.00 (referentna grupa)	
<i>TT</i> (smanjene aktivnosti) <sup>b</sup>	7 (8)	27 (15)	0,52 (0,22-1,23)	0,162
<b><i>GSTP1</i> (<i>rs1695</i>)</b>				
<i>IleIle+IleVal</i> (referentni) <sup>c</sup>	78 (92)	150 (84)	1,00 (referentna grupa)	
<i>ValVal</i> (varijantni) <sup>d</sup>	7 (8)	28 (16)	0,53 (0,21-1,31)	0,169

<sup>a</sup>Aktivni, ako je barem jedan *C* alel prisutan; <sup>b</sup>Smanjene aktivnosti, ako su oba *T* alela prisutna; <sup>c</sup>Referentni, ako je barem jedan *Ile* alel prisutan; <sup>d</sup>Varijantni, ako su oba *Val* alela prisutna; <sup>e</sup>OR, odnos šansi (*eng. odds ratio*) podešen na starost, BMI i *paklo-po-godini*; CI, interval poverenja (*eng. confidence interval*); *GSTA1 C69T* i *GSTP1 Ile105Val* genotipizacija je bila uspešna kod 87, odnosno 85 pacijentkinja sa karcinomom jajnika i svih ispitanica u kontrolnoj grupi.

Slični rezultati su dobijeni i kada je u pitanju *GSTP1 Ile105Val* (*rs1695*) SNP polimorfizam. Naime, učestalost *GSTP1-referentnog* genotipa je bila veća (92% vs. 94%), a učestalost *GSTP1-varijantnog* genotipa manja (8% vs. 16%) kod pacijentkinja sa

karcinomom jajnika u odnosu na ispitanice iz grupe kontrola, ali se ni ova uočena razlika nije pokazala kao statistički značajna u kontekstu podložnosti za nastanak karcinoma jajnika (OR=0,53, 95% CI: 0,21-1,31, p=0,169).

#### 4.2.3. Polimorfizam glutation transferaza O2 i rizik za nastanak karcinoma jajnika

Glutation transferaze klase omega, zbog specifičnih strukturnih i funkcionalnih karakteristika, imaju dodatne uloge nezavisne od uobičajenih uloga ostalih GST klasa. To se pre svega odnosi na ulogu u procesu glutationilacije/deglutationilacije, kao i dehidroaskorbat reduktaznu aktivnost.

**Tabela 14.** Značaj *GSTO2* polimorfizma u riziku za nastanak karcinoma jajnika

GST genotip	Pacijentkinje sa karcinomom jajnika n, %	Kontrolna grupa n, %	OR (95%CI) <sup>c</sup>	p
<i>GSTO2</i> (rs156697)				
<i>AA+AG</i> (referentni) <sup>a</sup>	82 (88)	102 (94)	1,00 (referentna grupa)	
<i>GG</i> (varijantni) <sup>b</sup>	11 (12)	6 (6)	2,44 (0.79-7.55)	0,123

<sup>a</sup>Referentni, ako je barem jedan A alel prisutan;

<sup>b</sup>Varijantni, ako su oba G alela prisutna;

<sup>c</sup>OR, odnos šansi (eng. *odds ratio*) podešen na starost, BMI i paklo-po-godini;

CI, interval poverenja (eng. *confidence interval*);

*GSTO2* genotipizacija je bila uspešna kod 93 pacijentkinje sa karcinomom jajnika i 108 ispitanica u kontrolnoj grupi.

Rezultati o učestalosti *GSTO2* genotipova kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika su prikazani u tabeli 14. Može se videti da je učestalost *GSTO2-referentnog* genotipa (AA i AG) iznosila 88% kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na 94% kod ispitanica u grupi kontrola. *GSTO2-varijantni* genotip (GG) bio prisutan kod 12% pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na svega 6% u kontrolnoj grupi.

Bez obzira na jasan porast odnosa šansi (OR) za obolevanje od karcinoma jajnika kod žena nosilaca oba varijantna G alela (OR=2,44, 95% CI: 0,79-7,55), uticaj *GSTO2* polimorfizma na rizik za nastanak karcinoma jajnika se nije pokazao kao statistički značajan ( $p = 0,123$ ).

#### **4.3. GENSKI POLIMORFIZMI GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA KOD ŽENA SA POZITIVNOM PORODIČNOM ANAMNEZOM KARCINOMA**

Analiza značaja različitih genotipova *GST* (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2*) u podložnosti za nastanak karcinoma jajnika kod pacijentkinja sa pozitivnom porodičnom anamnezom je dodatno potvrdila rezultate dobijene na celoj grupi ispitanica, posebno kada je u pitanju *GSTT1* genotip (Tabele 15 i 16).

Naime, kao što je pokazano u tabeli 15, pacijentkinje sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma jajnika ili dojke, a koje su nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa, su u 5,17-puta većem riziku za obolevanje od karcinoma jajnika, međutim bez statističke značajnosti ( $p=0,123$ ), što je verovatno posledica malog broja ispitanica.

**Tabela 15.** Značaj delecionih GST polimorfizma u riziku za nastanak karcinoma jajnika kod pacijentkinja sa pozitivnom porodičnom anamnezom

GST genotip	Pacijentkinje sa karcinomom jajnika n, %	Kontrolna grupa n, %	OR (95%CI) <sup>c</sup>	p
<b>GSTM1</b>				
Aktivni <sup>a</sup>	6 (46)	89 (50)	1.00 (referentna grupa)	
Nulti <sup>b</sup>	7 (54)	89 (50)	1,35 (0,41-4,33)	0,620
<b>GSTT1</b>				
Nulti <sup>b</sup>	1 (7)	47 (26)	1.00 (referentna grupa)	
Aktivni <sup>a</sup>	13 (93)	131 (74)	5,17 (0,64-41,66)	0,123

<sup>a</sup>Aktivni, ako je barem jedan aktivni alel prisutan;

<sup>b</sup>Nulti, ako nijedan aktivni alel nije prisutan;

<sup>c</sup>OR, odnos šansi (*eng. odds ratio*) podešen na starost, BMI i paklo-po-godini;

CI, interval poverenja (*eng. confidence interval*).

Značaj SNP GST polimorfizama u riziku za nastanak karcinoma jajnika prikazan je u Tabeli X. I ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim na celoj grupi ispitanica sa karcinom jajnika, gde se posebno izdvaja *GSTO2* varijantni genotip za koji je pokazano da su žene nosioci ovog genotipa, a sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma jajnika ili dojke, u 5,16 puta većem riziku za obolevanje od karcinoma jajnika i ovaj rezultat je bio statistički značajan ( $p = 0,05$ ).

**Tabela 16.** Značaj SNP GST polimorfizma u riziku za nastanak karcinoma jajnika kod pacijentkinja sa pozitivnom porodičnom anamnezom

GST genotip	Pacijentkinje sa karcinomom jajnika n, %	Kontrolna grupa n, %	OR (95%CI) <sup>§</sup>	p
<b>GSTAI (rs 3957356)</b>				
CC+CT (aktivni) <sup>a</sup>	11 (85)	151 (85)	1,00 (referentna grupa)	
TT (smanjene aktivnosti) <sup>b</sup>	2 (15)	27 (15)	0,82 (0,25-6,38)	0,769
<b>GSTPI (rs1695)</b>				
IleIle+IleVal (referentni) <sup>c</sup>	10 (83)	150 (84)	1,00 (referentna grupa)	
ValVal (varijantni) <sup>d</sup>	2 (17)	28 (16)	0,79 (0,23-6,01)	0,843
<b>GSTO2 (rs156697)</b>				
AA+AG (referentni) <sup>e</sup>	9 (75)	102 (94)	1,00 (referentna grupa)	
GG (varijantni) <sup>f</sup>	3 (25)	6 (6)	5,16 (0,99-26,89)	0,05

<sup>a</sup>Aktivni, ako je barem jedan C alel prisutan;

<sup>b</sup>Smanjene aktivnosti, ako su oba T alela prisutna;

<sup>c</sup>Referentni, ako je barem jedan Ile alel prisutan;

<sup>d</sup>Varijantni, ako su oba Val alela prisutna;

<sup>e</sup>Referentni, ako je barem jedan A alel prisutan;

<sup>f</sup>Varijantni, ako su oba G alela prisutna;

<sup>§</sup>OR, odnos šansi (eng. *odds ratio*) podešen na starost, BMI i paklo-po-godini;

CI, interval poverenja (eng. *confidence interval*).

#### 4.4. KOMBINOVANI UTICAJ POLIMORFIZAMA GLUTATION TRANSFERAZA NA RIZIK ZA NASTANAK KARCINOMA JAJNIKA

Statistička analiza kombinovanog uticaja GST genotipova na podložnost za nastanak karcinoma jajnika je pokazala odsustvo značaja kada je ispitivana kombinacija bilo koja dva od četiri uobičajena GST genotipa (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1* i *GSTP1*).

**Tabela 17.** Značaj kombinovanog GST genotipa u riziku za nastanak karcinoma jajnika

Kombinacija GST genotipova	Pacijentkinje		OR (95%CI) <sup>g</sup>	p
	sa karcinomom jajnika n, %*	Kontrolna grupa n, %**		
<b><i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i></b>				
<i>GSTM1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTT1</i> -nulti <sup>b</sup>	4 (5)	23 (13)	1,00 (referentna grupa)	
<i>GSTM1</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTT1</i> -aktivni <sup>a</sup>	32 (37)	65 (36)	2,92 (0,92-9,32)	0,069
<b><i>GSTT1</i> i <i>GSTA1</i></b>				
<i>GSTT1</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTA1</i> -smanjene aktivnosti <sup>c</sup>	1 (1)	8 (5)	1,00 (referentna grupa)	
<i>GSTT1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTA1</i> -aktivni <sup>d</sup>	67 (78)	112 (63)	5,42 (0,66-44,59)	0,116
<b><i>GSTT1</i> i <i>GSTP1</i></b>				
<i>GSTT1</i> -nulti <sup>b</sup> / <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>e</sup>	1 (1)	10 (6)	1,00 (referentna grupa)	
<i>GSTT1</i> -aktivni <sup>a</sup> / <i>GSTP1</i> -referentni <sup>f</sup>	64 (77)	113 (63)	6,11 (0,74-49,96)	0,091
<b><i>GSTA1</i> i <i>GSTP1</i></b>				
<i>GSTA1</i> -smanjene aktivnosti <sup>c</sup> / <i>GSTP1</i> -varijantni <sup>e</sup>	1 (1)	5 (3)	1,00 (referentna grupa)	
<i>GSTA1</i> -aktivni <sup>d</sup> / <i>GSTP1</i> -referentni <sup>f</sup>	72 (85)	128 (72)	2,91 (0,31-2,71)	0,347

<sup>a</sup>Aktivni, ako je barem jedan aktivni alel prisutan; <sup>b</sup>Nulti, ako nijedan aktivni alel nije prisutan; <sup>c</sup>Smanjene aktivnosti, ako su oba *T* alela prisutna; <sup>d</sup>Aktivni, ako je barem jedan *C* alel prisutan; <sup>e</sup>Varijantni, ako su oba *Val* alela prisutna; <sup>f</sup>Referentni, ako je barem jedan *Ile* alel prisutan; <sup>g</sup>OR, odnos šansi (*eng. odds ratio*) podešen na starost, BMI i *paklo-po-godini*; CI, interval poverenja (*eng. confidence interval*); \*od ukupnog broja pacijentkinja uključenih u istraživanje; \*\*od ukupnog broja kontrola uključenih u istraživanje.

Međutim, pokazano je da je učestalost kombinovanog *GSTT1*-aktivnog/*GSTAI*-aktivnog/*GSTP1*-referentni genotipa bila veća u grupi pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na ispitanice iz kontrolne grupe (Tabela 17).

Iz tog razloga, ispitivan je kumulativni efekat ovih “rizičnih” GST genotipova kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 18).

**Tabela 18.** “Rizični” GST genotipovi kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika

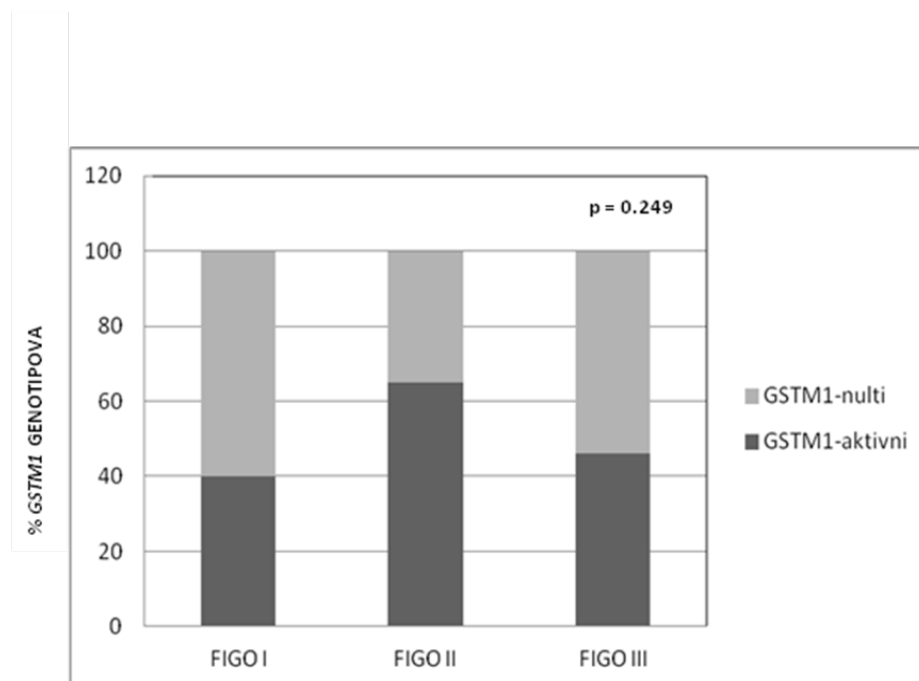
“Rizični” GST genotipovi <sup>a</sup> , n (%)	Pacijentkinje sa karcinomom jajnika, n (%)	Kontrolna grupa, n (%)
0	0	2 (1)
1	3 (4)	17 (10)
2	20 (24)	62 (35)
3	60 (72)	97 (54)
		<i>p</i> = 0,042

<sup>a</sup>*GSTT1*-aktivni i/ili *GSTAI*-aktivni i/ili *GSTP1*-referentni

Dobijeni rezultati su pokazali da je kombinacija sva tri “rizična” GST genotipa, koji se mogu dovesti u vezu sa podložnošću za nastanak karcinoma jajnika (*GSTT1*-aktivni, *GSTAI*-aktivni i *GSTP1*-referentni) prisutna kod 72% pacijentkinja sa karcinomom jajnika, što je bilo statistički značajno više ( $p=0,042$ ) u odnosu na kontrolnu grupu (54%) (Tabela 18).

#### 4.5. POVEZANOST GENOTIPA GLUTATION TRANSFERAZA SA FENOTIPSKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA JAJNIKA

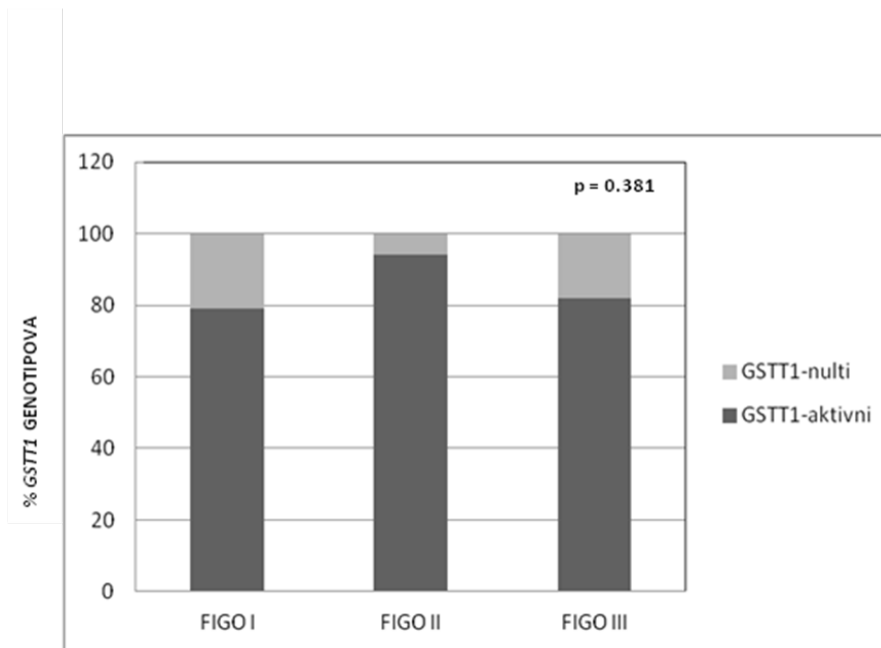
U sledećem koraku, ispitivana je povezanost genotipova *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2* sa fenotipskim karakteristikama karcinoma jajnika. Naime, nakon što je izvedena stratifikacija ispitanica sa karcinom jajnika na pacijentkinje sa stadijumom bolesti FIGO I, II ili III, analizirana je zastupljenost različitih genotipova *GST* kod pacijentkinja sa odgovarajućim stadijumom bolesti.



**Grafikon 1.** Distribucija *GSTM1* genotipova prema FIGO klasifikaciji karcinoma jajnika

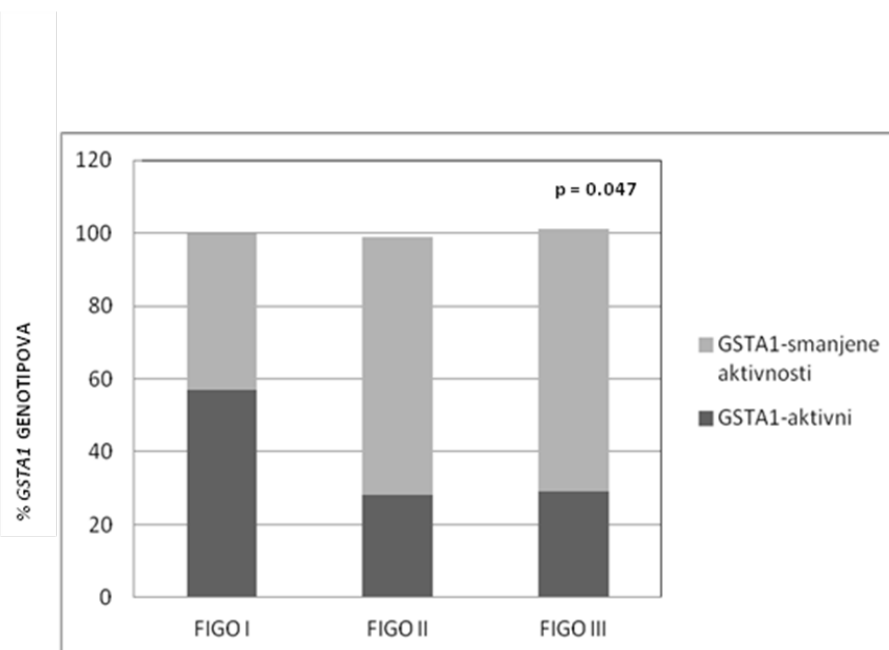
Kao što je prikazano na Grafikonu 1, nije uočena statistički značajna povezanost učestalosti *GSTM1* genotipova i stadijuma karcinoma jajnika ( $p = 0,294$ ). Sličan rezultat dobijen je kada je analiziran i drugi delecioni polimorfizam, *GSTT1*, u odnosu na FIGO stadijum karcinoma jajnika ( $p = 0,381$ , Grafikon 2).





**Grafikon 2.** Distribucija GSTT1 genotipova prema FIGO klasifikaciji karcinoma jajnika

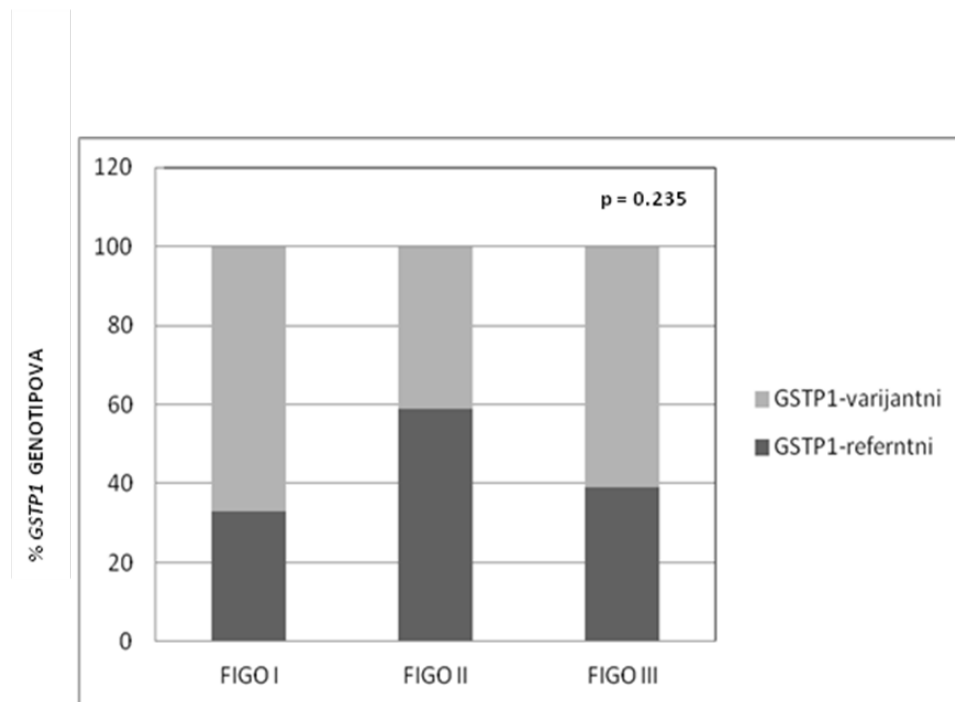
Povezanost SNP polimorfizama GST (*GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2*) sa fenotipskim karakteristikama karcinoma jajnika prikazana je na Grafikonima 3-5.



**Grafikon 3.** Distribucija GSTA1 genotipova prema FIGO klasifikaciji karcinoma jajnika

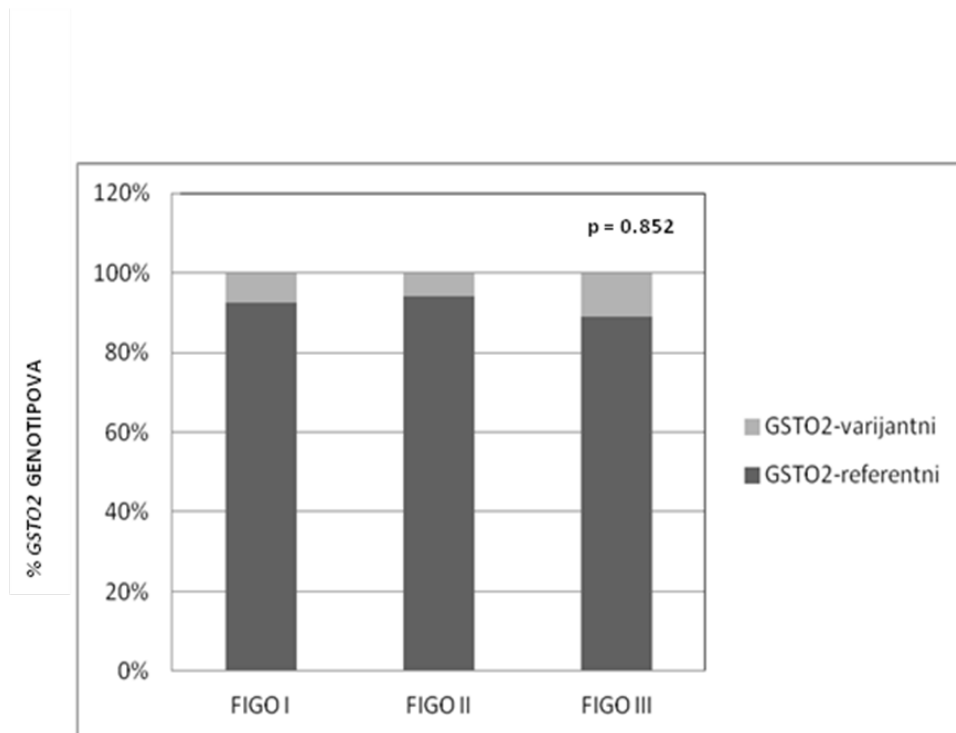
Kao što je prikazano, uočena je statistički značajna povezanost distribucije *GSTAI* genotipova sa FIGO stadijumom ( $p = 0,047$ ), gde je uočeno da se sa progresijom bolesti povećava broj ispitanica nosilaca *GSTAI* genotipa  *smanjene aktivnosti* (Grafikon 3).

Kada je u pitanju *GSTP1* genotip, nije uočena statistički značajna povezanost učestalosti *GSTP1-referentnog*, odnosno *GSTP1-varijantnog* genotipa sa stadijumom karcinoma jajnika ( $p = 0,235$ , Grafikon 4).



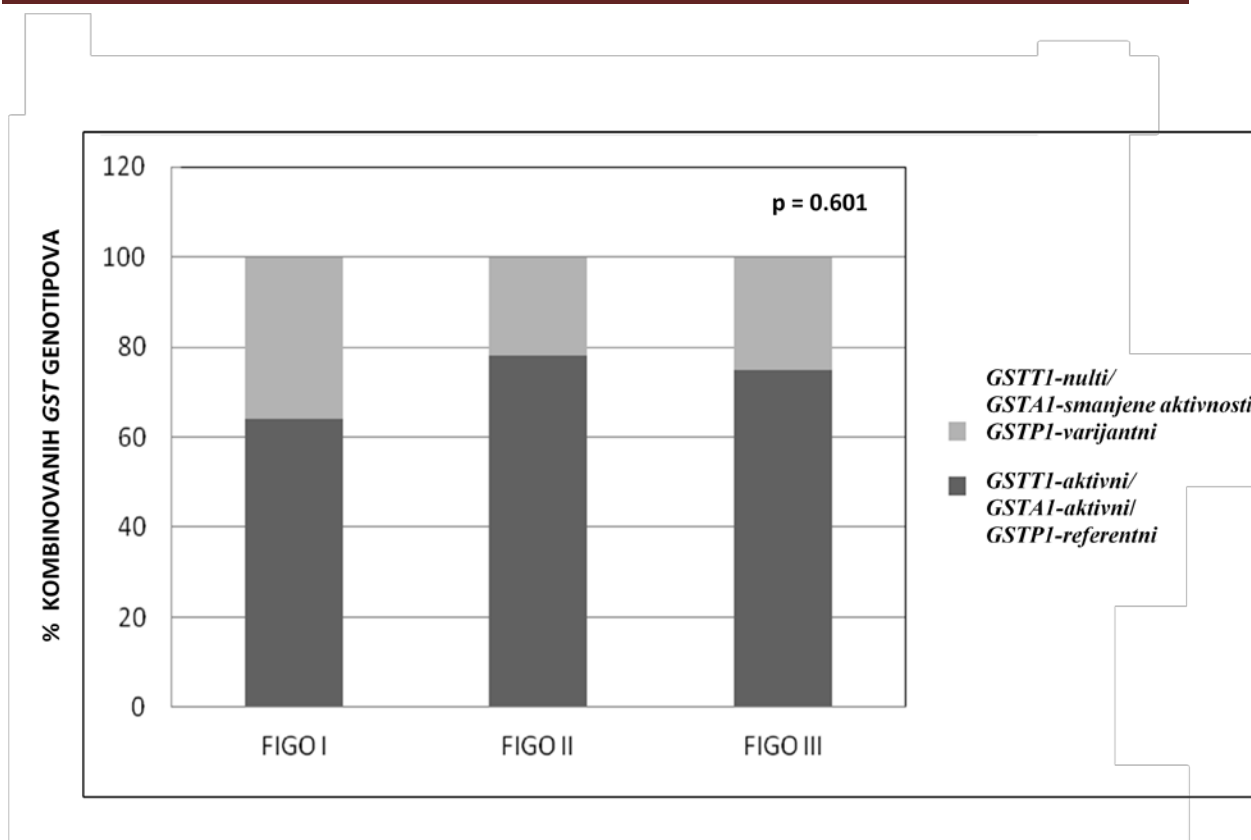
**Grafikon 4.** Distribucija *GSTP1* genotipova prema FIGO klasifikaciji karcinoma jajnika

Statistički značajna povezanost nije uočena ni kada je ispitivana povezanost distribucije *GSTO2* genotipova sa FIGO stadijumom karcinoma jajnika ( $p = 0,852$ , Grafikon 5).



**Grafikon 5.** Distribucija GSTO2 genotipova prema FIGO klasifikaciji karcinoma jajnika

Konačno, analizirana je distribucija pacijentkinja sa kombinacijom “rizičnih” genotipova (*GSTT1*-aktivni/*GSTAI*-aktivni/*GSTP1*-referentni) unutar ukupnog broja ispitanica odgovarajućeg FIGO stadijuma. Interesantno je da je pokazano da su žene nosioci *GSTT1*-aktivni/*GSTAI*-aktivni/*GSTP1*-referentni genotipa predstavljale preko 64% od ukupnog broja ispitanica u bilo kom FIGO stadijumu karcinoma jajnika (64%, 78% i 75% unutar FIGO I, FIGO II, odnosno FIGO III stadijuma) (Grafikon 6).

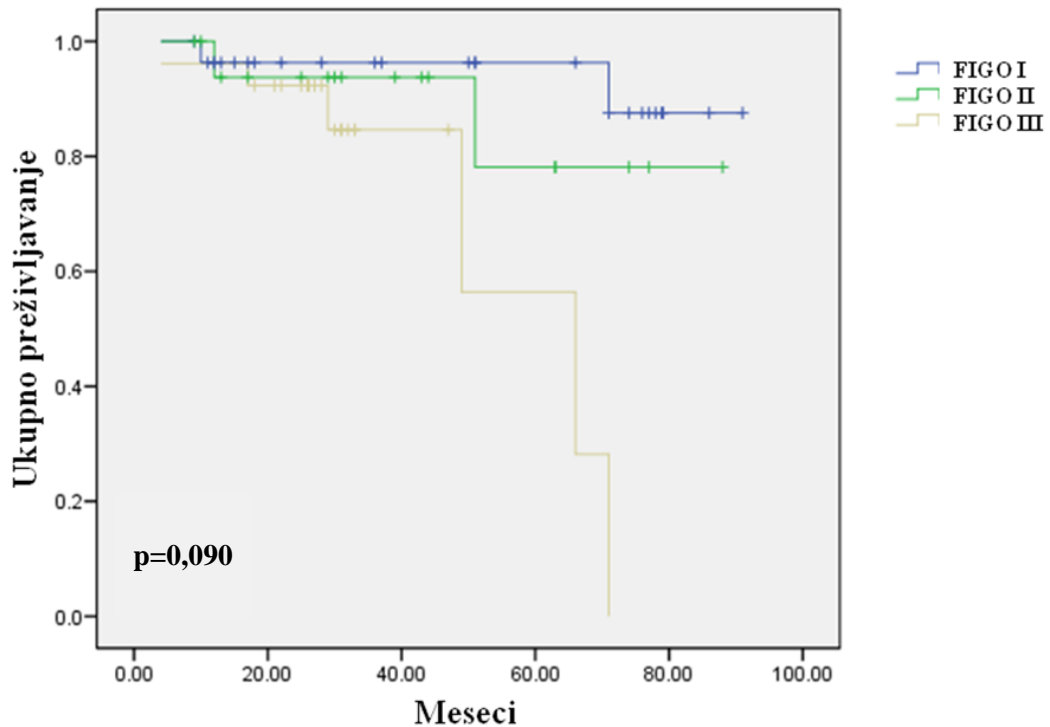


**Grafikon 6.** Distribucija pacijentkinja sa kombinacijom rizičnih GST genotipova (*GSTT1-aktivni/GSTT1-aktivni/GSTP1-referentni*) unutar ukupnog broja pacijentkinja odgovarajućeg FIGO stadijuma

#### 4.6. ZNAČAJ GENSKIH POLIMORFIZAMA GLUTATION TRANSFERAZA KLASE M1, T1, A1, P1 I O2 U PROGNOZI BOLESNICA SA KARCINOMOM JAJNIKA

Za procenu uticaja genskih polimorfizama *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2* na preživljavanje pacijentkinja sa karcinomom jajnika sprovedena je „*case only*“ studija. Srednje vreme praćenja pacijentkinja je iznosilo  $36,45 \pm 2,62$  meseci i sprovedeno je na 89 od 103 (86%) pacijentkinje uključene u istraživanje. Od 89 pacijentkinja sa karcinomom jajnika, u toku trogodišnjeg praćenja umrlo je 13 (14,6%) kod kojih je kao uzrok smrti naveden karcinom jajnika.

Kaplan Meier analizom preživljavanja u grupi pacijentkinja sa karcinomom jajnika, koje su bile stratifikovane prema stepenu progresije karcinoma na osnovu FIGO klasifikacije, pokazano je kao što je i očekivano najduže preživljavanje kod pacijentkinja FIGO I stadijuma, a najkraće kod pacijentkinja FIGO III stadijuma ( $p=0,09$ ) (Slika 14).



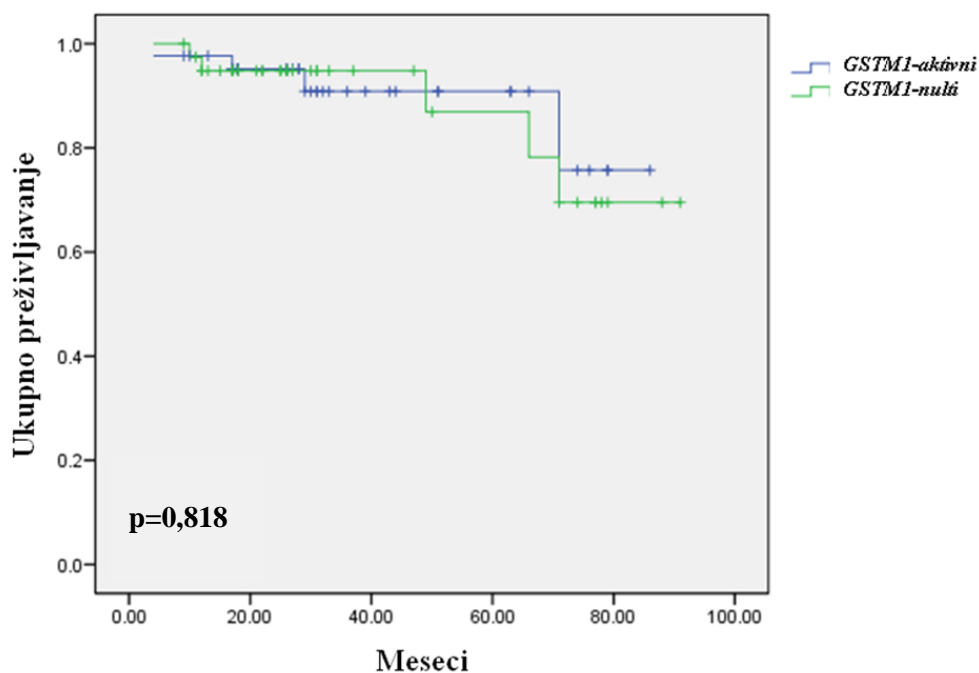
**Slika 14.** Kaplan Meier kriva preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika stratifikovanih prema FIGO klasifikaciji

Na Slikama 15-19 je prikazana Kaplan Meier analiza preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci različitih GST genotipova. Može se videti da *GSTM1* genotip nema značaja u prognozi kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika ( $p=0,818$ ) (Tabela 19, Slika 15).

**Tabela 19.** *GSTM1* polimorfizam kao prediktor smrti pacijentkinja sa karcinomom jajnika nakon trogodišnjeg praćenja

<b>Rizik za smrtni ishod kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci <i>GSTM1</i>-nultog u odnosu na nosioce <i>GSTM1</i>-aktivnog genotipa</b>	
<b>HR (95%CI)</b>	<b><i>p</i></b>
1,17 (0,31-0,44)	0,820

HR (eng. *Hazard Ratio*), rizik za smrtni ishod  
 CI (eng. *confidence interval*), interval poverenja



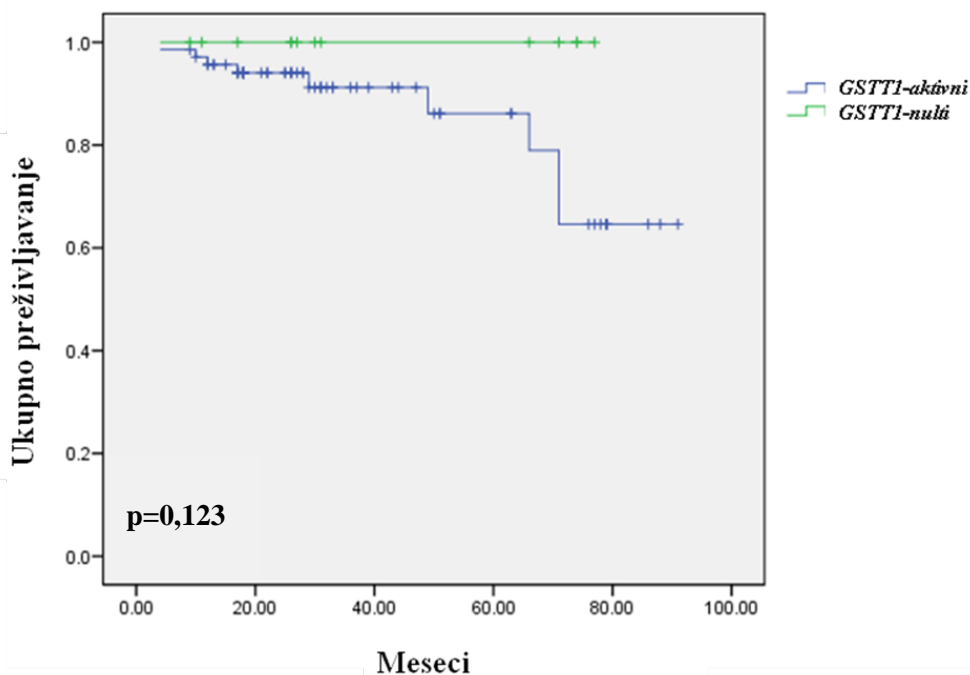
**Slika 15.** *Kaplan Meier kriva preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci različitog *GSTM1* genotipa*

Mada je pokazano da su pacijentkinje nosioci *GSTM1*-aktivnog genotipa imale kraće preživljavanje u odnosu na nosioce *GSTM1*-nultog genotipa, nije pokazana značajna prognostička uloga *GSTM1* genotipa u karcinomu jajnika ( $p = 0,123$ ) (Tabela 20, Slika 16).

**Tabela 20.** *GSTT1* polimorfizam kao prediktor smrti pacijentkinja sa karcinomom jajnika nakon trogodišnjeg praćenja

<b>Rizik za smrtni ishod kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci <i>GSTT1</i>-aktivnog u odnosu na nosioce <i>GSTT1</i>-nultog genotipa</b>	
<b>HR (95%CI)</b>	<b><i>p</i></b>
29,57 (0,26-33,33)	0,345

HR (eng. *Hazard Ratio*), rizik za smrtni ishod  
 CI (eng. *confidence interval*), interval poverenja



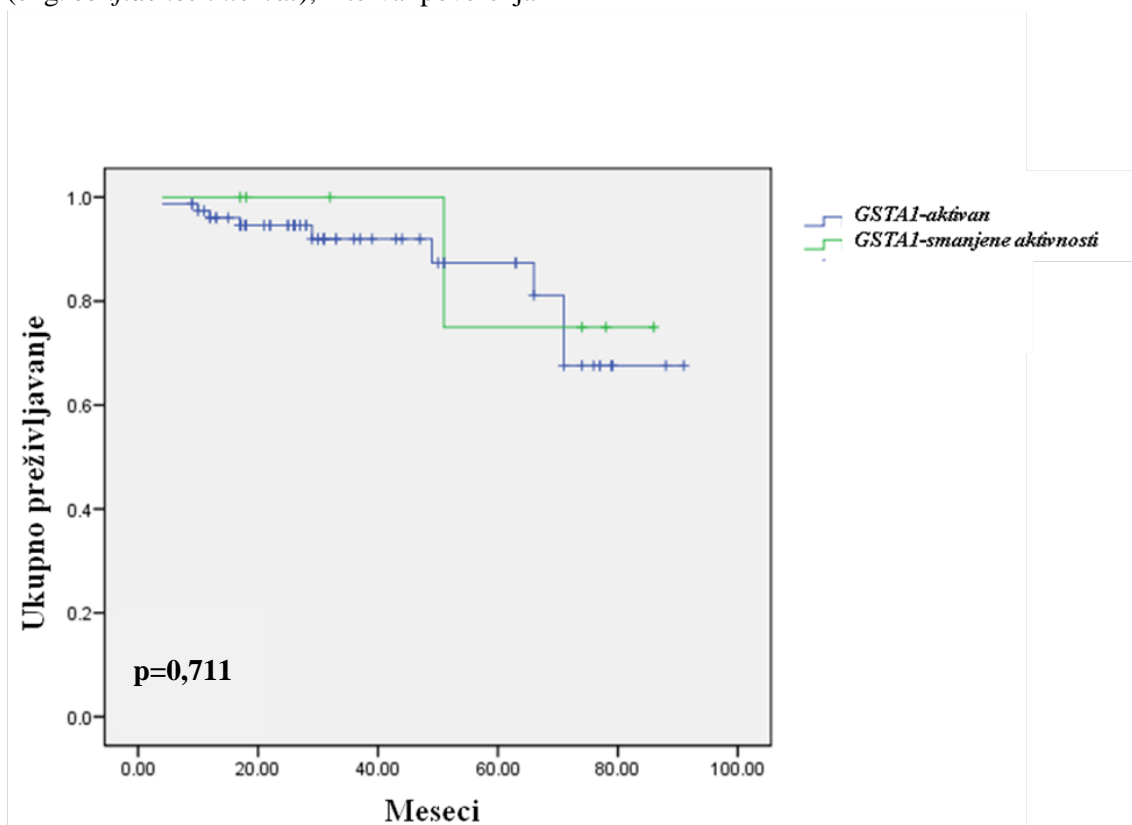
**Slika 16.** *Kaplan Meier kriva preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci različitog *GSTT1* genotipa*

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida *GSTAI* se takođe ne može dovesti u vezu sa preživljavanjem pacijentkinja sa karcinomom jajnika (Tabela 21), kao što je prikazano na Slici 17 ( $p=0,711$ ).

**Tabela 21.** *GSTA1* polimorfizam kao prediktor smrti pacijentkinja sa karcinomom jajnika nakon trogodišnjeg praćenja

<b>Rizik za smrtni ishod kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci <i>GSTA1</i>-aktivnog u odnosu na nosioce <i>GSTA1</i> genotipa smanjene aktivnosti</b>	
<b>HR (95%CI)</b>	<b><i>p</i></b>
0,679 (0,09-5,44)	0,715

HR (eng. *Hazard Ratio*), rizik za smrtni ishod  
 CI (eng. *confidence interval*), interval poverenja



**Slika 17.** *Kaplan Meier kriva preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci različitog *GSTA1* genotipa*

Međutim, rezultati dobijeni Cox regresionom analizom su pokazali da su pacijentkinje sa karcinomom jajnika koje su nosioci *GSTP1*-varijantnog genotipa u 4,79 puta većem riziku za smrtni ishod u odnosu na nosioce *GSTP1*-referentnog genotipa (Tabela



22). Analizom preživljavanja, kod ovih pacijentkinja pokazano je i značajno kraće preživljavanje u poređenju sa nosiocima *GSTP1*-referentnog genotipa ( $p=0.032$ ) (Slika 18).

**Tabela 22.** *GSTP1* polimorfizam kao prediktor smrti pacijentkinja sa karcinomom jajnika nakon trogodišnjeg praćenja

<b>Rizik za smrtni ishod kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci <i>GSTP1</i>-varijantnog u odnosu na nosioce <i>GSTP1</i>-referentnog genotipa</b>	
<b>HR (95%CI)</b>	<b><i>p</i></b>
4,79 (0,96-23,98)	0,057

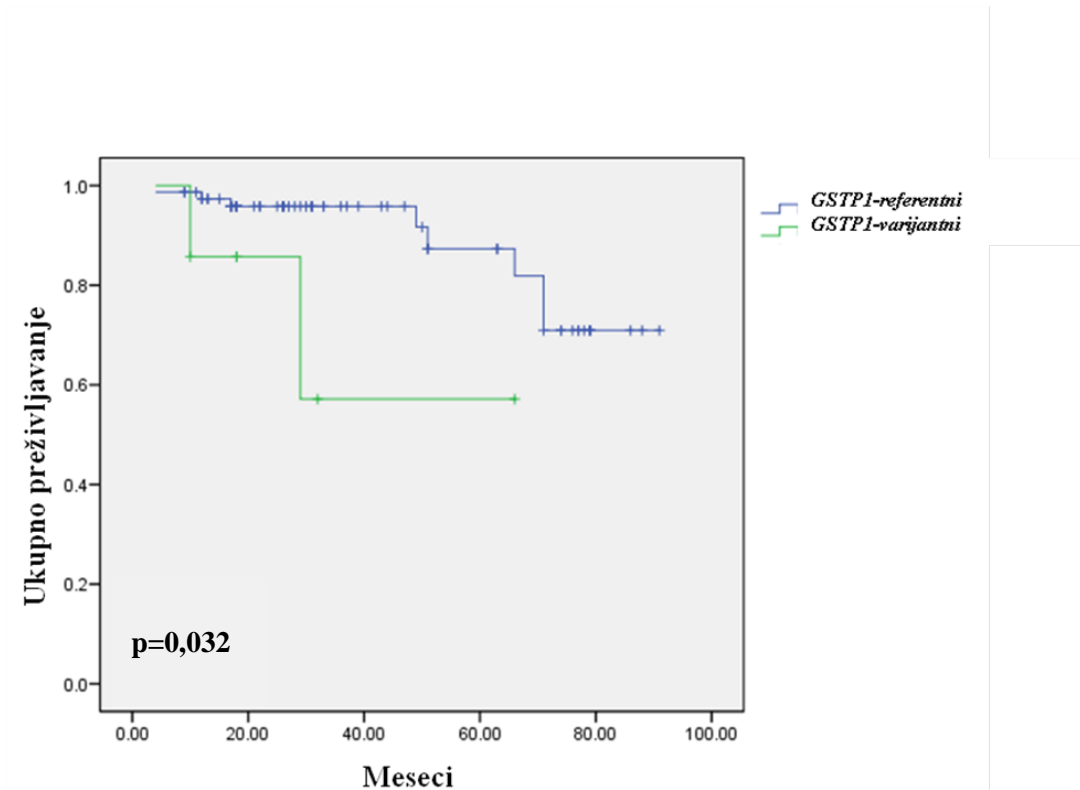
HR (eng. *Hazard Ratio*), rizik za smrtni ishod  
CI (eng. *confidence interval*), interval poverenja

Kada je u pitanju *GSTO2* genotip, dobijeni rezultati su pokazali da su pacijentkinje koje su nosioci *GSTO2*-varijantnog genotipa u 3,11 puta većem riziku za smrtni ishod u odnosu na nosioce *GSTO2*-referentnog genotipa ( $p=0,158$ ) (Tabela 23). Analiza preživljavanja pokazala je i nešto kraće preživljavanje kod ovih pacijentkinja ( $p=0,134$ ) (Slika 19).

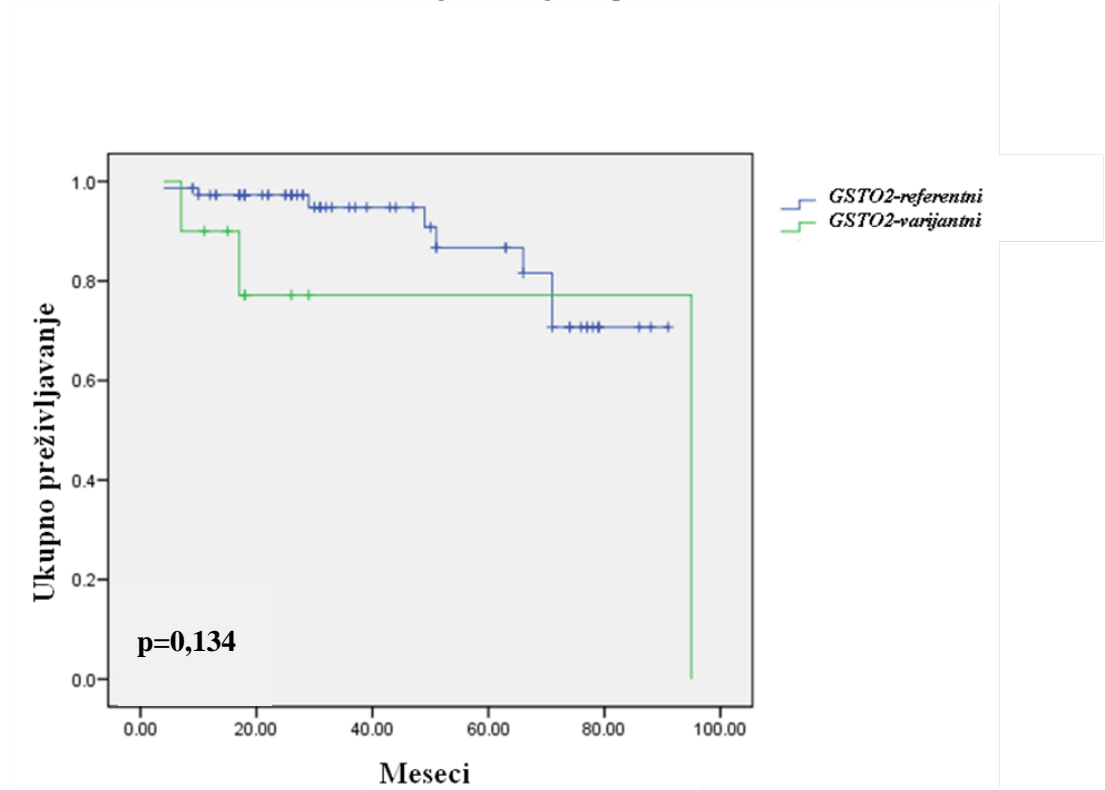
**Tabela 23.** *GSTO2* polimorfizam kao prediktor smrti pacijentkinja sa karcinomom jajnika nakon trogodišnjeg praćenja

<b>Rizik za smrtni ishod kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci <i>GSTO2</i>-varijantnog u odnosu na nosioce <i>GSTO2</i>-referentnog genotipa</b>	
<b>HR (95%CI)</b>	<b><i>p</i></b>
3,11 (0,64-15,00)	0,158

HR (eng. *Hazard Ratio*), rizik za smrtni ishod  
CI (eng. *confidence interval*), interval poverenja

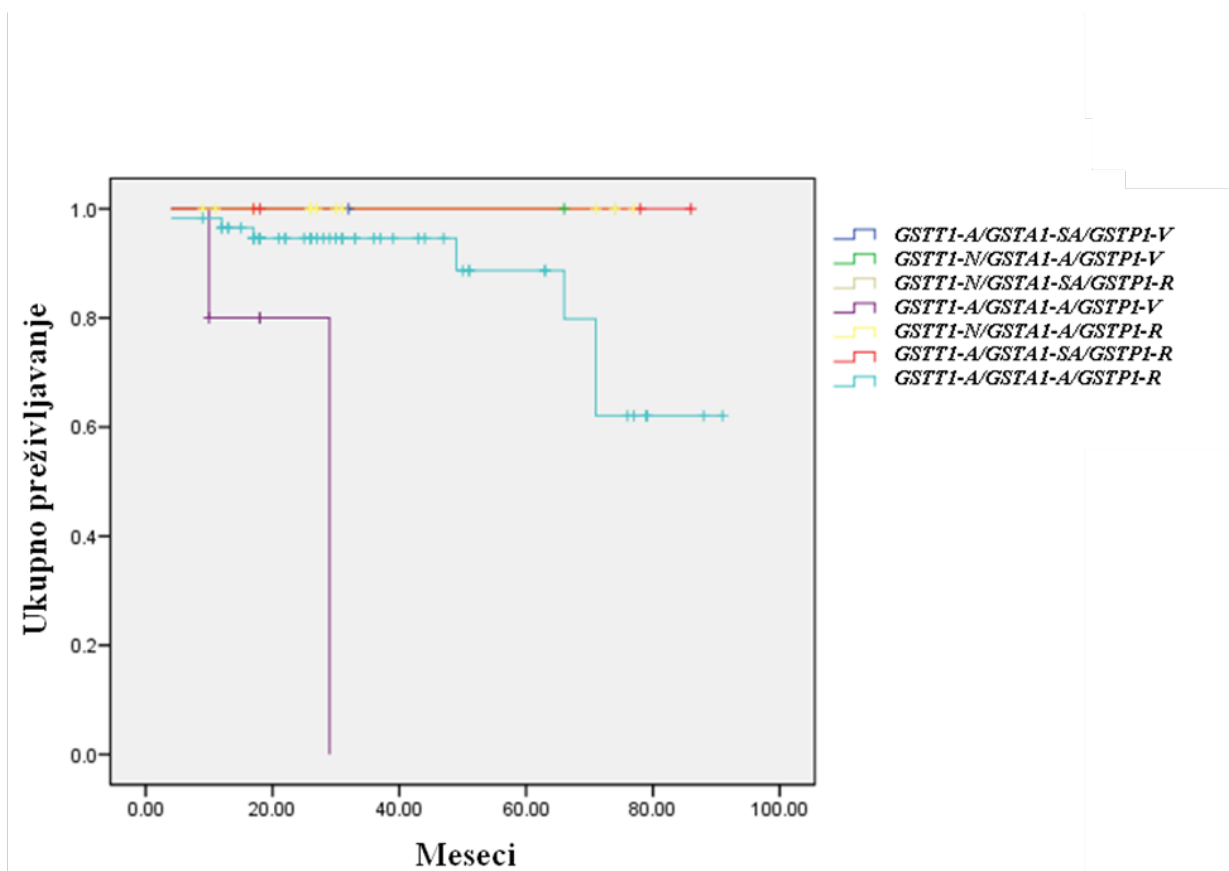


Slika 18. Kaplan Meier kriva preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci različitog GSTP1 genotipa



Slika 19. Kaplan Meier kriva preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci različitog GSTO2 genotipa

Na kraju je analizirano preživljavanje kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci kombinovanog *GSTT1*-aktivan/*GSTAI*-aktivan/*GSTP1*-referentni genotipa, kao i svih ostalih kombinacija *GSTT1*, *GSTAI* i *GSTP1* genotipova (Slika 20).



**Slika 20.** Kaplan Meier kriva preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su nosioci različitih kombinacija *GSTT1*, *GSTAI* i *GSTP1* genotipova (*GSTT1*-A – *GSTT1*-aktivan; *GSTT1*-N – *GSTT1*-nulti; *GSTAI*-A – *GSTAI*-aktivan; *GSTAI*-SM – *GSTAI*-smanjene aktivnosti; *GSTP1*-R – *GSTP1*-referentni; *GSTP1*-V – *GSTP1*-varijantni)

Kao što je prikazano, značajno kraće preživljavanje su imali nosioci kombinovanog *GSTT1*-aktivan/*GSTAI*-aktivan/*GSTP1*-varijantni genotipa ( $p=0,010$ ) u odnosu na kombinovani *GSTT1*-aktivan/*GSTAI*-aktivan/*GSTP1*-referentni genotip, kao i sve ostale kombinacije, što je u skladu sa rezultatima dobijenim analizom povezanosti *GSTP1* genotipa sa preživljavanjem kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika.

## 5. DISKUSIJA

Karcinom jajnika je sedmi po učestalosti karcinom kod žena u svetu i obuhvata skoro 4% od svih novootkrivenih slučajeva karcinoma kod žena (*World Cancer Research Fund and American Institute of Cancer Research. Ovarian Cancer 2014 Report*; Saida i sar., 2016). Veliki stepen smrtnosti kod žena sa karcinomom jajnika je posledica činjenice da se kod oko 60% žena dijagnoza postavlja u uznapredovalom stadijumu bolesti (Cannistra, 2004). Zlatni standard u lečenju ovih pacijentkinja predstavlja maksimalna hirurška citoredukcija praćena hemioterapijom, sa inicijalnom terapijskim odgovorom od 65–80% na hemioterapiju prve linije (du Bois i sar., 2005; Kim i sar., 2012). Ipak, u većini slučajeva, dolazi do relapsa karcinoma, a pacijentkinje razvijaju rezistenciju na dalju hemioterapiju, što sve vodi malom petogodišnjem preživljavanju od oko 30-50% (Cannistra, 2004; Jemal i sar., 2004; Fehrmann i sar., 2007; De Angelis i sar., 2014).

Mada je u toku protekle decenije bilo pokušaja da se uvedu efikasniji hirurški tretmani, kao i da se u protokole lečenja uvedu nove kombinacije citostatskih lekova u cilju poboljšanja efikasnosti primenjenih hemioterapijskih režima, ukupan procenat izlečenja kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika ostaje oko 30% (Bast i sar., 2009). S obzirom da se smatra da karcinom jajnika nastaje kao posledica akumulacije većeg broja genetskih promena (Aunoble i sar., 2010), veruje se da bi se značajnija promena u dugogodišnjem preživljavanju kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika mogla postići jedino uvođenjem individualizovanih terapijskih režima, kao i ranim otkrivanjem bolesti (Bast i sar., 2009). Iz tog razloga, identifikacija interindividualnih genskih varijacija, pre svega u genima koji kodiraju enzime uključene u proces detoksikacije antitumorskih lekova, deluje kao sledeći razuman korak.

U ovom istraživanju je po prvi put ispitivana povezanost polimorfizama glutation S-transferaza sa rizikom za nastanak epitelijalnog karcinoma jajnika u populaciji žena u Srbiji. Pokazano je da su žene nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa u povećanom riziku za obolevanje od karcinoma jajnika u odnosu na žene sa *GSTT1-nultim* genotipom, što se pokazalo još više očigledno u podgrupi ispitanica sa pozitivnom porodičnom anamnezom.

Štaviše, kada je analizirana moguća povezanost tri GST genotipa, koji su se ponaosob mogli dovesti u vezu sa rizikom za nastanak karcinoma ovarijuma (*GSTT1-aktivni*, *GSTA1-aktivni* i *GSTP1-referentni*), učestalost kombinovanog genotipa je bila značajno veća kod pacijentkinja sa karcinomom ovarijuma u odnosu na grupu kontrola. Pokazana je i značajna prediktivna uloga GSTP1 polimorfizama u toku trogodišnjeg praćenja ovih pacijentkinja.

Tokom godina izveden je veći broj istraživanja koja su za cilj imala da se razjasni koji genetski faktor bi mogao predstavljati okidač u procesu kancerogeneze u karcinomu jajnika. U tom kontekstu, najviše je ispitivana povezanost *BRCA1*, *BRCA2* i *p53* tumor supresorskih gena sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika, mada je učestalost mutacija ovih gena dosta mala (Desai i saradnici, 2014). Nedavno su rezultati nekoliko istraživanja ukazali na značaj polimorfizama glutation S-transferaza, koje zbog svoje značajne uloge u modulaciji bioloških efekata kancerogena, mogu uticati i na podložnost za nastanak karcinoma jajnika. Pažnja je posebno posvećena delecionim polimorfizmima glutation S-transferaza, *GSTM1* i *GSTT1*, s obzirom da kod nosilaca *GSTM1-nultog* i *GSTT1-nultog* genotipa postoji potpuno odsustvo enzimske aktivnosti, a samim tim i smanjena sposobnost ćelija da metabolišu toksine (Hayes i Strange, 2000). Međutim, postojeći rezultati o značaju ova dva polimorfizma u podložnosti za nastanak karcinoma jajnika su prilično kontradiktorni (Economopoulos i sar., 2010; Yin i sar., 2013; Xu i sar., 2014; Jin i sar., 2014). Štaviše, rezultati nekoliko meta-analiza ne pružaju značajne dokaze koji bi govorili u prilog povezanosti polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika kod žena pripadnica bele rase (Economopoulos i sar., 2010; Jin i sar., 2014).

*GSTM1* genski lokus se nalazi na hromozomu 1 i prisutan je u 50-55% populacije bele rase (Board i sar., 1981), a njegov proizvod, enzim *GSTM1-1*, detoksikuje kancerogene iz duvanskog dima, kao što su policiklični aromatični ugljovodonici i aromatični amini (Ketterer i sar., 1992). Osobe kojima nedostaje konstitutivna ekspresija *GSTM1* (*GSTM1\*0*), nemaju mogućnost adekvatne detoksikacije ovih kancerogena, zbog čega kod osoba sa *GSTM1-nultim* genotipom može doći do kumulativnih oštećenja molekula DNK i nastanka mutacija, a što za posledicu može imati nastanak karcinoma. U prilog ovome govore brojne molekularno epidemiološke studije, koje su pokazale da su osobe sa *GSTM1-nultim* alelom u povećanom riziku za pojavu karcinoma kolona, larinksa i

pluća (Quiñones i sar., 2001; Ateş i sar., 2005; Ketterer i sar., 1992). Frekvenca *GSTM1-nultog* genotipa u kontrolnoj grupi (50%) koja je dobijena u našem radu odgovara podacima iz literature objavljenim u meta-analizama i *pooled*-analizama kod pripadnika bele rase (Carlsten i sar., 2008). Naši rezultati o odsustvu povezanosti *GSTM1* genskog polimorfizma sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika u populaciji žena u Srbiji su u skladu sa rezultatima meta-analiza koje su izučavale povezanost delecionog polimorfizma *GSTM1* sa podložnošću za nastanak karcinoma jajnika (Economopoulos i sar., 2010; Yin i sar., 2013; Xu i sar., 2014; Jin i sar., 2014).

Drugi najčešće ispitivani polimorfizam GST je *GSTT1*, čiji gen je prisutan u oko 80% populacije bele rase, dok oko 10-20% uopšte nema ovaj enzim, jer poseduje *GSTT1-nulti* genotip (Nelson i sar., 1995). Frekvenca *GSTT1-nultog* genotipa u našoj kohorti (26%) je nešto viša u odnosu na podatke koji su dobijeni kod pripadnika bele rase u srednjoj Evropi (18,1%) (Raimondi i sar., 2006). Poznato je da je kod pripadnika žute rase učestalost *GSTT1-nultog* genotipa veoma visoka i iznosi oko 70%, dok kod crnaca iznosi oko 30% (Nelson i sar., 1995). Pored toga, Lebrun i saradnici (2006) su u svojoj studiji, izvedenoj u Nemačkoj, takođe dobili višu frekvencu *GSTT1-nultog* genotipa (26%) (Lebrun sar., 2006). Velika studija Garte i saradnika (2001) koja je uključivala 15000 osoba govori u prilog tome da frekvenca *GSTT1-nultog* genotipa kod pripadnika bele rase varira mnogo više nego frekvence *GSTM1* i *GSTP1* genotipa (Garte i sar., 2001).

Kada je u pitanju populacija pacijentkinja sa karcinomom jajnika, rezultati našeg istraživanja su pokazali da su žene nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa u značajno većem riziku za obolevanje od karcinoma jajnika. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa studijom Sgambata i saradnika (2002), u kojoj je pokazano da *GSTT1-nulti* genotip ima protektivan efekat u riziku za nastanak ovog karcinoma (Sgambato i sar., 2002). Imajući u vidu da veći broj kancerogena prisutnih u izduvnim gasovima i duvanskom dimu pripadaju grupi supstrata *GSTT1-1* enzima (Meyer i sar., 1991; Hayes i Strange, 2000), naši i rezultati Sgambata i saradnika (2002) mogu delovati kontradiktorno. Međutim, postoje jasni dokazi koji govore u prilog značajne uloge koju *GSTT1-1* enzim, umesto u detoksikaciji, može imati u bioaktivaciji određenog broja bifunkcionalnih alkilirajućih agenasa, koji su prisutni u sredinskom zagađenju i nekim profesionalnim hazardima (Their i sar., 1996). Naime, kao

posledica procesa bioaktivacije ovih alkilirajućih agenasa nastaju potentni elektrofilni, koji mogu modifikovati DNA i potencijalno su genotoksični (Their i sar., 1996; Sherratt i sar., 1997).

Gen koji kodira GSTP1 je smešten na hromozomu 11. Najvažniji supstrat za ovu klasu GST su diol-epoksidi policikličnih aromatičnih ugljovodonika, koji su prisutni u duvanskom dimu (Hengstler i sar., 1998). Do sada su opisana 2 SNP-a (eng. *single nucleotide polymorphism*) u okviru *GSTP1* gena. Pažnju istraživača više privlači prvi tip SNP-a (rs1695), koji u osnovi ima zamenu A (adenina) u G (guanin) na 313bp na kodonu 105 (*GSTP1 A1578G, Ile105Val*). To za posledicu ima zamenu amino kiseline izoleucina (Ile) valinom (Val) (Watson i sar., 1998), što može uticati kako na katalitičku, tako i na nekatalitičku aktivnost ovog enzima (Watson i sar., 1998; Thévenin i sar., 2011). Iako nosioci *GSTP1\*Ile105* genotipa imaju veću katalitičku efikasnost prema standardnom supstratu glutation S-transferaza (1-hloro-2,4-dinitrobenzen) u poređenju sa *\*Val105* varijantom (Sundberg i sar., 1998), ova druga varijanta zapravo pokazuje povećanu katalitičku efikasnost u detoksikaciji policikličnih aromatičnih ugljovodoničnih diolepoksida (PAH), koji su prisutni u duvanskom dimu (Kellen i sar., 2007). Pored toga, GSTP1 ima i značajnu nekatalitičku ulogu u regulaciji redoks-senzitivnih signalnih puteva uključenih u procese preživljavanje i apoptoze (Tew i sar., 2011). Naime, protein:proteinskim interakcijama sa određenim MAP kinazama (eng. *Mitogen-activated protein kinases*), poput proapoptotske c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), GSTP1 inhibira njenu aktivnost, i na taj način može imati regulatornu antiapoptotsku ulogu. Šta više, pokazano je da prisustvo specifičnih genskih varijanti GSTP1 može uticati na stepen interakcije između GSTP1 i JNK. Na taj način, zamena aminokiseline izoleucina (*Ile*) valinom (*Val*) na poziciji 105, može modifikovati, ne samo katalitičku aktivnost, već i GSTP1-posredovan inhibitorni efekat aktivnosti JNK.

Distribucija *GSTP1* genotipova koju smo pokazali u našem istraživanju u kontrolnoj grupi (44% AA, 40% AG i 16% GG *GSTP1* genotip) odgovara frekvencama *GSTP1* genotipova kod pripadnika bele rase, s obzirom da je *Ile/Ile* oblik *GSTP1* prisutan u oko 50% populacije, *Ile/Val* u oko 40% populacije, a *Val/Val* u oko 10% populacije (Kellen i

sar., 2007; Ali-Osman i sar., 1997). Naši rezultati su pokazali povećanu podložnost za karcinom jajnika kod nosilaca *GSTP1\*Ile* (referentnog) alela. Štaviše, pokazan je šestostruko povećan riziku od karcinoma jajnika kod žena nosilaca kombinacije “rizičnih” genotipova (*GSTT1-aktivni/GSTP1\*Ile*), što veoma verovatno ukazuje na sinergistički efekat ovih genotipova u procesu kancerogeneze kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika.

Uloga polimorfizma *GSTA1* u proceni rizika za obolevanje od karcinoma jajnika do sada nije ispitivana. Ovaj polimorfizam je predstavljen sa tri povezana polimorfizma pojedinačnih nukleotida, koji za posledicu imaju različitu ekspresiju sa smanjenom transkripcionom aktivnošću varijante *GSTA1\*B* u odnosu na uobičajeni *GSTA1\*A* alel (McIlwain i sar., 2006). Naime, oko 60% osoba bele rase poseduje *GSTA1\*A* (*GSTA1 C*) alel sa T, C i G na pozicijama 567, 69 i 52, dok preostalih 40% poseduje varijantni *GSTA1\*B* (*GSTA1 T*) alel u kome se na ovim pozicijama nalaze G, T i A (Coles BF i sar., 2001). Osobe koje su homozigoti za *GSTA1\*B* poseduju četiri puta manju ekspresiju i aktivnost *GSTA1-1* enzima u jetri. Smatra se da je zamena baze na poziciji 52 odgovorna za smanjenu aktivnost *GSTA1 T* alela (Morel F. i sar., 2002). Rezultati distribucije *GSTA1* genotipa u ovom radu u kontrolnoj grupi (42% *CC*, 43% *CT* i 15% *TT* *GSTA1* genotip) odgovaraju očekivanoj učestalosti *GSTA1* genotipova u populaciji pripadnika bele rase u srednjoj Evropi (Coles i sar., 2001; Ye Z., i sar., 2006).

Mada naši rezultati nisu pokazali značajnu individualnu povezanost polimorfne ekspresije *GSTA1* sa rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika, iznenađujuće, u kombinaciji sa drugim “rizičnim” *GST* genotipovima (*GSTT1-aktivni*, *GSTP1-referentni* i *GSTA1-aktivni*), dobijena je kombinacija genotipova koja je bila prisutna kod čak 72% od svih pacijentkinja sa karcinomom jajnika koje su uključene u istraživanje. Štaviše, nosioci ove kombinacije su predstavljali više od 64 % od ukupnog broja ispitanica unutar bilo kog FIGO stadijuma, ukazujući na povećanu podložnost za hemijski-indukovanu kancerogenezu kod ovih osoba. Samim tim, može se pretpostaviti da varijantna ekspresija *GST* usled genskog polimorfizma verovatno utiče na process kancerogeneze u karcinomu jajnika i na taj način doprinosi individualnoj podložnosti za obolevanje od ovog karcinoma.

Kod glutation transferaza klase omega samo 20% sekvence amino kiselina se poklapa sa ostalim članovima *GST* klase. Enzimi ove klase, *GSTO1-1* i *GSTO2-2*,



poseduju i čitav spektar specifičnih aktivnosti, među kojima se posebno izdvajaju reakcije biotransformacije arsena, tioltransferazna i dehidroaskorbat reduktazna aktivnost (Board i sar., 2000). Šta više, smatra se da u ljudskom organizmu najznačajniju dehidroaskorbat reduktaznu aktivnost zapravo ima GSTO2-2 enzim, i na taj način što regeneriše oksidovanu forme vitamina C u askorbinsku kiselinu. Time se ovaj enzim svrstava u ćelijsku enzimsku antioksidatnu mašineriju (Zhou i sar., 2015). U humanoj populaciji su identifikovana dva gena, *GSTO1* i *GSTO2*, koja se nalaze na hromozomu 10. Kao i kod ostalih pripadnika citosolnih GST i u okviru omega klase uočena je genska heterogenost, nastala zbog prisustva polimorfizma jednog nukleotida ili delecija. Mukerjee B. i saradnici (2006) su opisali čak 66 polimorfizama u *GSTO2* genu, pri čemu su našim istraživanjem obuhvaćeni do sada najviše izučavani polimorfizmi jednog nukleotida, *GSTO2* rs156697.

Do sada je udruženost ovog polimorfizma sa rizikom za nastanak karcinoma jajnika određivana u svega nekoliko studija, ali sa nekonzistentnim rezultatima. U našoj studiji, bolesnice nosioci *GSTO2*\**G/G* varijantnog genotipa bile su pod 2,44 puta većim rizikom za nastanak ovog karcinoma u poređenju sa nosiocima referentnog genotipa, iako dobijeni rezultati nisu bili statistički značajni. Šta više, žene sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma, koje su nosioci *GSTO2*-varijantnog genotipa su bile pod 5,16 puta većim rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Pogstaporna i saradnika koji su pokazali da su žene nosioci *G* alela u 1,73 puta povećanom riziku za obolevanje od karcinoma jajnika (Pongstaporn i sar., 2006). S obzirom na važnu antioksidatnu ulogu GSTO2-2, izmenjena aktivnost ovog enzima bi mogla dovesti do interindividulanih razlika prilikom detoksikacije slobodnih radikala prisutnih u duvanskom dimu, kao i profesionalne izloženosti kancerogenima. Naime, poznato je da slobodni radikali mogu ispoljavati svoj efekat direktno, kao oni prisutni u duvanskom dimu, ili mogu nastati tokom metabolizma hemijskih kancerogena, kao što su policiklični aromatični ugljovodonici (Valavanidis i sar., 2009). Poznato je da tokom maligne transformacije dolazi do značajnih promena ćelijske redoks ravnoteže i posledično oksidativnog stresa, što sve vodi strukturnim promenama i oštećenju DNK i drugih makromolekula. Pored toga, važno je istaći da oksidativni stres ne doprinosi samo nastanku, nego i promociji i progresiji

tumora. Naime, slobodni radikali mogu uticati na različite signalne puteve i ekspresiju gena, naročito onih uključenih u apoptozu i proliferaciju ćelija. Dalje, oksidativni stres, dodatnim strukturnim promenama u DNK može dovesti do razvoja malignijeg fenotipa tumora i tako doprineti njegovoj progresiji (Reuter i sar., 2010). Osim poznate antioksidantne uloge, sve se više ispituje i potencijalna regulatorna uloga askorbinske kiseline. Naime, u ćelijskoj liniji HCT116 karcinoma debelog creva (Catani i sar., 2002), pokazano je da askorbinska kiselina reguliše aktivnost inducibilnog faktora hipoksije (eng. *hypoxia-inducible factor, HIF*), transkripcionog faktora koji učestvuje u regulaciji ekspresije mnogih gena uključenih u rast tumora, energetski metabolizam i apoptozu (Tian i sar., 2014). Štaviše, novija istraživanja ukazuju da bi vitamin C-zavisna inhibicija HIF signalnog puta mogla biti jedan od načina kontrole tumorske progresije i inflamacije (Traber i Stevens, 2011). Ukoliko pretpostavimo da je kod nosilaca *varijantnog GSTO2* genotipa snižena dehidroaskorbat reduktazna aktivnost, to bi za posledicu imalo smanjenu regeneraciju i raspoloživost askorbinske kiseline u tumorskom tkivu i snižen antioksidantni kapacitet.

Nezavisno od uticaja koji može imati na podložnost za obolevanje od karcinoma jajnika, važno je napomenuti da polimorfna ekspresija glutation S-transferaza može uticati kako na prognozu, tako i na efikasnost primenjene hemioterapije kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Naime, Khrunin i saradnici (2010) su pokazali da je *GSTP1\*Ile105Val* polimorfizam značajno povezan sa preživljavanjem (eng. *progression-free survival*) (Khrunin i sar., 2010). U našem istraživanju, pokazano je da prisustvo *GSTP1\*ValVal* genotipa značajno utiče na preživljavanje pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Naime, pacijentkinje nosioci ovog genotipa su imale značajno kraće preživljavanje u toku perioda praćenja od 36 meseci, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (Howelles i sar., 2004; Khrunin i sar., 2010). Moguće objašnjenje kraćeg preživljavanja kod pacijentkinja koje su nosioci *GSTP1 ValVal* genotipa jeste činjenica da kao posledica većeg stepena interakcije sa JNK, ova genska varijanta može imati izraženiji antiapoptotski efekat, dalje utičući na progresiju bolesti (Thevenin i sar., 2011). Pored toga, većina naših pacijentkinja sa karcinomom jajnika, nosilaca *GSTT1-aktivnog*, kao i *GSTO2\*G/G*

varijantnog genotipa je preminula u toku trogodišnjeg praćenja. Jedno od potencijalnih objašnjenja prognostičkog značaja ovih polimorfizama, pored već navedenih uloga u apoptotskim procesima, antioksidantnoj odbrani i regulaciji redoks ravnoteže, nalaze se u rezultatima posednjih istraživanja, koji pružaju dodatnu potporu ulozi zapaljenskog procesa u ovom tumoru.

U prilog ovim rezultatima govore i rezultati o ulozi *GSTP1\*B* alela u nastanku rezistencije na lekove (McIlwain i sar., 2006) i, kao što je sugerisano u radu Ghalije i saradnika nivoi *GSTP1* mogu biti korisni u praćenju efikasnosti primenjene hemioterapije (Ghalia i sar., 2000). U skladu sa ovim su i rezultati o korisnom efektu inhibitora Hsp90 na prekidanje cisplatinske rezistencije u ćelijskoj liniji humanog karcinoma jajnika (*SKOV3*), a koji je posredovan modifikovanjem ekspresije gena koji se dovode u vezu sa nastankom rezistencije na lekove (eng. *multiple drug resistance related genes*), pre svega *GSTP1*, *p53*, *bcl-2*, *survivin*, *BRCA1* i *BRCA2* (Zhang i sar., 2015). Na taj način, pored efekta u modulaciji rizika za nastanak ovog karcinoma, polimorfizam *GSTP1* može značajno uticati na napredovanje ovih tumora, utičući na kapacitet ćelija za proliferaciju, ali i na odgovor na terapiju.

Prikazani rezultati ukazuju na to da polimorfizam glutation transferaza može imati značajnu ulogu kako u proceni rizika, tako i u preživljavanju pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Pored toga, naši rezultati su pokazali modulirajući efekat *GST* polimorfizama kod žena sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma jajnika ili dojke. Pored razjašnjavanja veze između polimorfizama glutation transferaza i kancerogeneze tumora jajnika, rezultati ovog istraživanja bi mogli da ukažu i na nove moguće strategije u terapiji karcinoma jajnika, a mogli bi poslužiti ujedno i kao podsticaj za razvoj različitih kliničkih studija. U tom slučaju, predmet istraživanja bi mogao da bude usmeren na detaljnije proučavanje polimorfizama glutation transferaza u korelaciji sa primenjenom hemioterapijom, što bi moglo omogućiti individualizaciju terapije i potencijalno povećanje njene efikasnosti.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ Prisustvo *GSTT1-aktivnog* genotipa je udruženo sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma jajnika
  - Žene nosioci *GSTT1-aktivnog* genotipa su bile pod 2 puta povećanim rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika, što je bilo još izraženije kod pacijentkinja sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma jajnika ili dojke.
- ❖ Nije uočen efekat pojedinačnih *GSTM1*, *GSTA1*, *GSTP1* i *GSTO2* genotipova na rizik za nastanak karcinoma jajnika
  - Učestalost *GSTM1-aktivnog* i *GSTM1-nultog* genotipa, koja je iznosila 52%, odnosno 48%, nije se značajno razlikovala kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na kontrolnu grupu.
  - Žene nosioci bar jednog *GSTA1-aktivnog* alela bile učestalije u grupi pacijentkinja sa karcinomom jajnika u odnosu na kontrolnu grupu (92% vs. 85%), ali se ova razlika nije pokazala statistički značajnom u odnosu na rizik za obolevanje od ovog karcinoma.
  - Bez obzira na jasan porast odnosa šansi za obolevanje od karcinoma jajnika kod žena nosilaca oba varijantna *G* alela, uticaj *GSTO2* polimorfizma na rizik za nastanak karcinoma jajnika se nije pokazao kao statistički značajan.
- ❖ Rizik za nastanak karcinoma jajnika je izraženiji kod žena sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma jajnika ili dojke
  - Žene sa pozitivnom porodičnom anamnezom karcinoma koje su nosioci *GSTO2-varijantnog* genotipa su bile pod 5,16 puta povećanim rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika
- ❖ Učestalost kombinovanog *GSTT1-aktivan/GSTA1-aktivan/GSTP1-referentni* genotipa je bila statistički značajno veća u grupi pacijentkinja u odnosu na

kontrolnu grupu i može se dovesti u vezu sa rizikom za obolevanje od karcinoma jajnika

- Pacijentkinje nosioci kombinovanog *GSTT1-aktivan/GSTA1-aktivan/GSTP1-referentni* genotipa su predstavljale preko 64% od ukupnog broja pacijentkinja unutar bilo kog FIGO stadijuma karcinoma jajnika
- ❖ Prisustvo različitih genskih varijanti *GSTA1* se može dovesti u vezu sa fenotipskom karakteristikama karcinoma jajnika
  - Učestalost *GSTA1-aktivnog i GSTA1* genotipa  *smanjene aktivnosti* se menja sa progresijom karcinoma izraženom FIGO stadijumom.
- ❖ Funkcionalni polimorfizam *GSTP1* može imati prognostičku ulogu kod pacijentkinja sa karcinomom jajnika
  - Prisustvo *GSTP1 ValVal* genotipa značajno utiče na preživljavanje pacijentkinja sa karcinomom jajnika. Pacijentkinje nosioci ovog genotipa su imale značajno kraće preživljavanje u toku perioda praćenja od 36 meseci.

## 7. SPISAK SKRAĆENICA

ADP	adenozin difosfat
AFP	alfa feto protein
ASK1	eng. apoptosis signal-regulating kinase 1
βHCG	beta horionski gonadotropin
BMI	indeks telesne mase (eng. <i>body mass index</i> )
BRAF	protoonkogen
<i>BRCA-1</i>	gen za Karcinom Dojke 1 (eng. <i>Breast Cancer Gene 1</i> )
<i>BRCA-2</i>	gen za Karcinom Dojke 2 (eng. <i>Breast Cancer Gene 2</i> )
CA 125	karcinom antigen 125
CA 19-9	karcinom antigen 19-9
CI	interval poverenja (eng. <i>confidence interval</i> )
CT	kompjuterizovana tomografija
CYP450	citohrom P450
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EC	endometroidni karcinom
FIGO	Međunarodna federacija za Ginekologiju i akušerstvo (eng. <i>International Federation of Gynaecology and Obstetrics</i> )
G1	dobro diferentovan tumor
G2	srednje diferentovan tumor

G3	loše diferentovan tumor
GSH	redukovani glutation
GST	glutation transferaza
GSTA1	glutation transferaza klase alfa 1
GSTM1	glutation transferaza klase mi 1
GSTO1	glutation transferaza klase omega 1
GSTO2	glutation transferaza klase omega 2
GSTP1	glutation transferaza klase pi 1
GSTT1	glutation transferaza klase teta 1
HE4	humani epididimis protein 4
HGSC	“high-grade” seroznog karcinoma
HNPCC	nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom
HR	eng. <i>Hazard ratio</i>
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
KRAS	protoonkogen
LGSC	“low-grade” serozni karcinom
MAP	mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MAPEG	membranski proteini uključeni u metabolizam eikosaonoida i glutationa (eng. <i>Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism</i> )
MAPK	mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MC	mucinozni karcinom

MR	magnetna rezonanca
NAD	nikotinamid dinukleotid
OR	odnos šansi (eng. <i>odds ratio</i> )
PARP	poli ADP-riboza polimeraza
PCR	reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
PCR-RFLP	analizom proizvoda restrikcione digestije DNK fragmenata nastalih reakcijom lančanog umnožavanja (eng. <i>PCR - restriction fragment length polymorphism</i> )
PET	pozitronska emisiona tomografija
RT-PCR	reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu
ROMA indeks	Rizik Ovarijalnog Maligniteta Algoritam (eng. <i>Risk of Ovarian Malignancy Algorithm</i> )
SD	standardna devijacija
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (eng. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SZO	Svetska Zdravstvena Organizacija
$\bar{x}$	srednja vrednost



## **8. LITERATURA**

- Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996; 107(2): 229–233.
- Acs G. Serous and mucinous borderline (low malignant potential) tumors of the ovary. *Am J Clin Pathol* 2005; 123:S13–S57
- Adang AEP, Brussee J, Van der Gen A, Mulder GJ. The glutathione binding site in glutathione S-transferases. *Biochem J* 1990; 269: 47-54.
- Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, Terry MB, Neugut AI, Eng SM, Zhang Y, Garza C, Ambrosone CB. Effects of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) genotype and potential modifiers on breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2006; 27(9):1876-82.
- Ali-Osman F, Brunner JM, Kutluk TM and Hess K. Prognostic significance of glutathione S-transferase pi expression and subcellular localization in human gliomas. *Clin Cancer res* 1997; 3:2253-2261.
- Anders MW. Glutathione-dependent toxicity: Biosynthesis and bioactivation of cytotoxic S-conjugates. *ISI Alas of Science, Pharmacology* 1988; 2: 99-104.
- Anderson NS, Bermudez Y, Badgwell D, et al. Urinary levels of Bcl-2 are elevated in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2009;112:60-7.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A et al: Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003, 72(5):1117-1130.

- Ateş NA, Tamer L, Ateş C, Ercan B, Elipek T, Ocal K, Camdeviren H. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet.* 2005; 43:149-163.
- Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N et al: Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010, 376(9737):245-251.
- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC: Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 2001, 22(2):255-288.
- Aynacioglu AS, Nacak M, Filiz A, Ekinçi E and Roots I. Protective role of glutathione S-transferase P1(ABTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57: 213-217.
- Baker TR, Piver MS. Etiology, biology, and epidemiology of ovarian cancer. *Semin Surg Oncol* 1994;10:242-8.
- Barnette KG, Sarkar MA, Glover DD, et al. Glutathione S-transferase in human endometrium: Quantitation and interindividual variability in isoform content. *Gynecol Obstet Invest* 1999;47:114-119.
- Bast RC. Molecular approaches to personalizing management of ovarian cancer. *Ann Oncol* 2011; 22 (Suppl 8): viii5- viii15
- Bast RC, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(6): 415–428.
- Bast RC, Brewer M, Zou C, et al. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? *Recent Results Cancer Res* 2007;174:91-100
- Bateman JC. Chemotherapeutic management of advanced ovarian carcinoma. *Med Ann Dist Columbia* 1959; 28: 537-544

- Beeghley A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, Risch H, Jones B, Yu H. Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol* 2006; 100:330-337.
- Bell-McGuinn K, Konner J, Tew W et al. New drugs for ovarian cancer. *Ann Oncol* 2011; 22 (Suppl 8): viii77-viii82
- Ben David Y, Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Friedman E, Beck BD, Beller U, Ben-Baruch G, Fishman A, Levavi H, Lubin F et al: Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J Clin Oncol* 2002, 20(2):463-466.
- Berek J, Hacker N. *Practical Gynecologic Oncology*. 2010. Lippincott, Williams & Wilkins.
- Berhane K, Widerstein M, Engström A, et al: Detoxication of base propenals and other  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1480-1484.
- Bernstein JL, Thompson WD, Risch N, Holford TR: The genetic epidemiology of second primary breast cancer. *Am J Epidemiol* 1992, 136(8):937-948.
- Black SM and Wolf CR. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacol Ther*, 1991; 51:139-154.
- Board PG. Gene deletion and partial deficiency of the glutathione S-transferase (ligandin) system in man. *FEBS Lett*. 1981;135(1):12-4.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem*. 2000;275(32):24798-24806.
- Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3267-88.

- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997; 8(3):444-72.
- Boyd J, Sonoda Y, Federici MG, Bogomolny F, Rhei E, Maresco DL, Saigo PE, Almadrones LA, Barakat RR, Brown CL et al: Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA* 2000, 283(17):2260-2265.
- Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic reagents. *Adv Enzymol* 1969; 32: 173-189.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, et al. Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol Lett*, 1998; 102-103: 173-183.
- Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, et al: Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996; 56: 3915-3925.
- Brodeur I, Goulet I, Tremblay CS, Charbonneau C, Delisle MC, Godin C, Huard C, Khandjian EW, Buchwald M, Levesque G and Carreau M. Regulation of the Fanconi anemia group C protein through proteolytic modification. *J Biol Chem*, 2004; 279:4713-4720.
- Brown PO, Palmer C. The preclinical natural history of serous ovarian cancer: defining the target for early detection. *PLoS Med* 2009;6:e1000114.
- Buys SS, Partridge E, Greene MH, et al. Ovarian cancer screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening trial: findings from the initial screen of a randomized trial. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1630-9.

- Camargo MC, Stayner LT, Straif K, Reina M, Al-Alem U, Demers PA, Landrigan PJ. Occupational exposure to asbestos and ovarian cancer: a meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2011;119(9):1211-7.
- Cao W, Cai L, Rao JY, Pantuck A, Lu ML, Dalbagni G, Reuter V, Scher H, Cordon-Cardo C, Figlin RA, Belldgrun A, Zhang ZF. Tobacco smoking, GSTP1 polymorphism, and bladder carcinoma. *Cancer* 2005; 104(11):2400-8.
- Carlsten C, Sagoo GS, Frodsham AJ, Burke W, Higgins JP. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008; 167(7):759-74.
- Catani MV, Costanzo A, Savini I, Levrero M, de Laurenzi V, et al. Ascorbate upregulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochem J* 2002;364: 441-447.
- Chan Y, Ng T, Lee W, Ngan H, Wong L. Symptoms, coping strategies, and timing of presentations in patients with newly diagnosed ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003;90:651-6.
- Chen LM, Yamada SD, Fu YS, Baldwin RL, Karlan BY: Molecular similarities between primary peritoneal and primary ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 2003, 13(6):749-755.
- Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Ben-David Y, Lubin F, Friedman E, Sadetzki S: Effect of BRCA1/2 mutations on long-term survival of patients with invasive ovarian cancer: the national Israeli study of ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(1):20-25.
- Child F, Lenny W, Clayton S, Davies S, Jones PW, Alldersea JE, Strange RC and Fryer AA. The association of maternal but not paternal genetic variation in GSTP1 with asthma phenotypes in children. *Respire Med*, 2003; 97:1247-1256.
- Chopin D.K., Gattegno B. Superficial bladder tumors. *E Urol*, 2002; 42: 533-541.
- Chornokur G, Amankwah EK, Schildkraut JM, Phelan CM: Global ovarian cancer health disparities. *Gynecol Oncol* 2013, 129(1):258-264.

- Clarke B, Tinker AV, Lee CH, Subramanian S, van de Rijn M, Turbin D, Kalloger S, Han G, Ceballos K, Cadungog MG et al: Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol* 2009, 22(3):393-402.
- Clement KD, Connor PD. Tumors of the female re-productive organs. In: Taylor RB, David AK, Johnson TA Jr, Phillips DM, Scherger JE, eds. *Family Medicine: Principles and Practice*. 5th ed. New York, NY: Springer-Verlag Inc; 1998:916-924.
- Coles B, Ketterer B. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Clin Rev Biochem Mol Biol* 1990; 25: 47-70.
- Coles BF and Kadlubar FF. detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogenesis and chemotherapeutic drugs? *Biofactors*, 2003; 17:115-130.
- Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH, Green B, Lang NP, Kadlubar FF. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics*. 2001; 11:663-669.
- Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 1997; 278:1580-1581.
- Commandeur JNM, Stijntjes GJ and Vermeulen PE. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol rev* 1995;47:271-330.
- Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ, Niemann S, Schmidtke J. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet* 1985;69:201-205.
- Corazziari I, Quinn M, Capocaccia R: Standard cancer patient population for age standardising survival ratios. *Eur J Cancer* 2004, 40(15):2307-2316.
- Corrigan AV and Kirsch RE. Glutathione S-transferase distribution and concentration in human organs. *Biochem Intern* 1988;16:443-448.

- Cote RJ and Datar RH. Therapeutic approach to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. *Clin Rev in Oncol*, 2003; 46:S67-S83.
- Cullen KJ, Newkirk KA, Schumaker LM, et al. Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 2003; 63(23):8097-102.
- Current FIGO staging for cancer of the vagina, fallopian tube, ovary, and gestational trophoblastic neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2009, 105(1):3-4.
- De Angelis R, Sant M, Coleman MP et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15(1): 23–34.
- Dekant W. Bioactivations of nephrotoxins by glutathione S-conjugate formation. *Toxicol Lett* 1993;67:151-160.
- Desai A, Xu J, Aysola K et al. Epithelial ovarian cancer: An overview. *World J Transl Med* 2014; 3(1): 1–8.
- Di Ilio C, Sacchetta P, Angelucci S, Bucciarelli T, Pennelli A, Mazzetti AP, Lo Bello M, Aceto A .Interaction of glutathione transferase P1-1 with captan and captafol. *Biochem Pharmacol* 1996; 52(1):43-8.
- Di Ilio C, Sacchetta P, Iannarelli V, Aceto A. Binding of pesticides to alpha, mu and pi class glutathione transferase. *Toxicol Lett* 1995; 76(2):173-7.
- Di Saia P. *Clinical Gynecologic Oncology*.2011.Lippincott,Williams&Willkins.
- Đurđević S, Kesić V, ured. *Maligni tumori jajnika u Ginekološka onkologija*. Novi Sad. Udruženje za ginekološku onkologiju, 2009.
- Eaton DL and Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*, 1999; 49:156-164.
- Economopoulos KP, Sergentanis TN, Vlahos NF. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* 2010; 20(5):732–7.

- Eds: Barakat RR, Perelman RO. In: Markman M and Randall M, Principles and Practice of Gynecologic Oncology, 6th Edition 2013, Lippincott Williams & Wilkins.
- Fang J, Wang S, Zhang S et al. Association of the glutathione S-transferase M1, T1 polymorphisms with cancer: evidence from a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(11): e78707.
- Fathalla MF: Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971, 2(7716):163.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available at: <http://globocan.iarc.fr>, Last accessed 18/01/2016.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 16/01/2015.
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
- Fernandes ET, Manivel JC, Reddy PK, Ercole CJ. Cyclophosphamide associated bladder cancer--a highly aggressive disease: analysis of 12 cases. *J Urol* 1996; 156(6):1931-3.
- Folkins AK, Jarboe EA, Roh MH, Crum CP. Precursors to pelvic serous carcinoma and their clinical implications. *Gynecol. Oncol.* 2009; 113(3):391–396.
- Fong MY and Kakar SS. Ovarian cancer mouse models: a summary of current models and their limitations. *Journal of Ovarian Research* 2009; doi: 10.1186/1157-2215-2-12.



- Fong PC, Yap TA, Boss DS, Carden CP, Mergui-Roelvink M, Gourley C, De Greve J, Lubinski J, Shanley S, Messiou C et al: Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 2010, 28(15):2512-2519.
- Fountain J, Trimble E, Birrer MJ: Summary and discussion of session recommendations. *Gynecol Oncol* 2006, 103:S23-25.
- Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC and Spiteri MA. Polimorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsivness and asthma. *Am j respir Crit care Med* 2000; 161:1437-1442.
- Gabbani G, Hou SM, Nardini B, et al. GSTM1 and NAT2 genotypes and urinary mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1677-1681.
- Gammon MD, Sagiv SK, Eng SM, Shantakumar S, Gaudet MM, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Wang LW, Wang Q, Stellman SD, Beyea J, Hatch M, Kabat GC, Wolff MS, Levin B, Neugut AI, Santella RM. Polycyclic Aromatic hydrocarbon-DNA adducts and breast cancer: a pooled analysis. *Arch environ Health*. 2004;59(12):640-9.
- García-Closas M, Kelsey KT, Hankinson SE, Spiegelman D, Springer K, Willett WC, Speizer FE, Hunter DJ. Glutathione S-transferase mu and theta polymorphisms and breast cancer susceptibility. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(22):1960-4.
- García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Yeager M, Welch R, Chanock S, Chatterjee N, Wacholder S, Samanic C, Torà M, Fernández F, Real FX, Rothman N. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*. 2005; 366(9486):649-59.

- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(12):1239-48.
- Gershenson D. *Surgical Gynecologic Oncology*. 2010. Lippincott, Williams & Wilkins.
- Ghalia AA, Rabboh NA, el Shalakani A, Seada L, Khalifa A. Estimation of glutathione S-transferase and its Pi isoenzyme in tumor tissues and sera of patients with ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000; 20(2B): 1229–1235.
- Gilks CB, Ionescu DN, Kalloger SE, Kobel M, Irving J, Clarke B, Santos J, Le N, Moravan V, Swenerton K: Tumor cell type can be reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2008, 39(8):1239-1251.
- Gilks CB, Prat J: Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum Pathol* 2009, 40(9):1213-1223.
- Gilliland FD, Li YF, Dubeau L, Berhane K, Avol E, Mc Connell R, Gauderman WJ and Peters J. Effects of glutathione S-transferase M1, maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Crit Care Med* 2002; 166:457-463.
- Goff B, Mandel L, Melancon C, Muntz H. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA* 2004 ;291:2705 -12 .

- Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian cancer diagnosis: results of a national ovarian cancer survey. *Cancer*. 2000;89:2068-2075
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M: Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010, 140(6):883-899.
- Grosse SD, Kalman L, Khoury MJ. Evaluation of the validity and utility of genetic testing for rare diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2010;686:115-31
- Guengerich FP, Their R, Persmark M, Taylor JB, Pemble SE and Ketterer B. Conjugation of carcinogens by class glutathione S-transferases: mechanisms and relevance to variations in human risk. *Pharmacogenetics* 1995; 5:103-107.
- Gulick AM and Fahl WE. Mammalian glutathione S-transferase: regulation of an enzyme system to achieve chemotherapeutic efficacy. *Pharmacol Ther* 1995; 66:237-257.
- Gwinn ML, Lee NC, Rhodes PH, Layde PM, Rubin GL: Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *J Clin Epidemiol* 1990, 43(6):559-568.
- Habdous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M and Visvikis S. Polymorphismes des glutathione S-transferases et pathologies humaines: Bilan des études épidémiologiques. *Ann Biol Clin*, 2004; 62:15-24.
- Habig WH, Pabst MJ, Jackoby WB: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- Halkia E, Spiliotis J. The role of cytoreductive surgery and HIPEC in epithelial ovarian cancer. *J BUON* 2015; 20 Suppl 1: S12–28.
- Halperin R, Zehavi S, Hadas E, Habler L, Bukovsky I, Schneider D: Immunohistochemical comparison of primary peritoneal and primary ovarian serous papillary carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2001, 20(4):341-345.

- Halperin R, Zehavi S, Langer R, Hadas E, Bukovsky I, Schneider D: Primary peritoneal serous papillary carcinoma: a new epidemiologic trend? A matched-case comparison with ovarian serous papillary cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2001, 11(5):403-408.
- Hamilton W, Peters T J, Bankhead C, Sharp D. Risk of ovarian cancer in women with symptoms in primary care: population based case-control study. *BMJ* 2009;339:b2998
- Harada S, Misawa S, Nakamura T, Tanaka N, Ueno E and Nozoe M. Detection of GSTT1 gene deletion by the polimerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. *Hum Genet* 1992;90:62-64.
- Hartge P. Designing early detection programs for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:3-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004271824>. Lu KH, Skates S, Bevers TB, et al. A prospective U.S. ovarian cancer screening study using the risk of ovarian cancer algorithm (ROCA) [abstract]. *J Clin Oncol* 2010;28 (Suppl 15): Abstract 5003. Available at: [http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/28/15\\_suppl/5003](http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/28/15_suppl/5003)
- Hartge P. Designing early detection programs for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:3-4.
- Hayes JD and Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445-600.
- Hayes JD and Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000; 61:154-166.
- Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR. Glutathione S-transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005; 45:51-88.
- Hayes JD, Kerr LA, Cronshaw AD. Evidence that glutathione S-transferase B1B1 and B2B2 are the products of separate genes and that their expression in human liver is subject to inter-individual variation. Molecular relationship between the B1 and B2 subunits and other Alpha class glutathione S-transferases. *Biochem J* 1989;264:437-445.

- Hayes JD, McLellan LE. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad Res* 1999;31:273-300.
- Henderson CJ and Wolf CR. Disruption of the Glutathione Transferase Pi Class Genes. In: *Methods in Enzymology, Volume 401, Glutathione Transferases and gamma-Glutamyl Transpeptidases*. Ed. Helmut Sies and Lester Packer, Elsevier Inc San Diego 2005; pp116-135.
- Henderson CJ, Smith AG, Ure J, et al. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5275-5280.
- Hengstler JG, Böttger T, Tanner B, Dietrich B, Henrich M, Knapstein PG, Junginger T, Oesch F. Resistance factors in colon cancer tissue and the adjacent normal colon tissue: glutathione S-transferases alpha and pi, glutathione and aldehyde dehydrogenase. *Cancer Lett* 1998; 128(1):105-12.
- Hennessy BT, Coleman RL, Markman M: Ovarian cancer. *Lancet* 2009, 374(9698):1371–1382.
- Henrion-Caude A, Flamant C, Roussey M, Housset C, Flahault A, Fryer AA, Chadelat K, Strange RC and Clement A. Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Hepatology* 2002; 11:451-458.
- Hess V, A'Hern R, Nasiri N, King DM, Blake PR, Barton DP, Shepherd JH, Ind T, Bridges J, Harrington K et al: Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J Clin Oncol* 2004, 22(6):1040- 1044.
- Hofker MH, Skraastad MI, Bergen AA, Wapenaar MC, Bakker E, Millington-Ward A, van Ommen GJ, Pearson PL. The X chromosome shows less genetic variation at restriction sites than the autosomes. *Am J Hum Genet* 1986; 39:438-451.
- Homma H, Maruyama H, Niitsu Y, Listowsky I. A subclass of glutathione S-transferases as intracellular high-capacity and high affinity aterodi binding proteins. *Biochem J* 1986; 235: 763-768.

- Howells RE, Dhar KK, Hoban PR, Jones PW, Fryer AA, Redman CW, Strange RC. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14:242-250.
- Howie AF, Forrester LM, Glancey MJ, et al. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumor human tissues. *Carcinogenesis* 1990;11:451-458.
- Hu X, Xia H, Srivastava SK, Herzog C, Awasthi YC, Ji X, Zimniak P and Singh SV. Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238(2):397-402.
- Hu X, Xia H, Srivastava SK, Pal A, Awasthi YC, Zimniak P, Singh SV. Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenanthrene and benzo[g]chrysene. *Cancer Res* 1998; 58(23):5340-3.
- Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Hautefeuille A, Donato F, Gelatti U, Spaliviero M, Placidi D, Carta A, Scotto di Carlo A, Porru S. GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer* 2004; 110(4):598-604.
- Hussain SA and James ND. Molecular markers in bladder cancer. *Seminars in Radiation Oncology* 2005; 15:3-9.
- Hussain SP, Harris CC: Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 1998, 58(18):4023-4037.
- Hussey AJ and Heyes JD. Characterization of human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem J* 1992;286:929-935.
- Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y and Ouchi Y. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54:693-696.

- Jacobs I, Bast RC, Jr. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989;4:1-12.
- Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:355-66.
- Jaitovitch-Groisman I, Fotouhi-Ardakani N, Schechter RL, Woo A, Alaoui-Jamali MA, Batist G. Modulation of glutathione S-transferase alpha by hepatitis B virus and the chemopreventive drug oltipraz. *J Biol Chem* 2000; 275(43):33395-403.
- Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, et al. Common structural features of MAPEG- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* 1999; 8:689-692.
- Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7220-7225.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ: Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009, 59(4):225–249.
- Jemth P, Stenberg G, Chaga G and Mannervik B. Heterologous expression, purification and characterization of rat class theta glutathione transferase T2-2. *Biochem J* 1996;316:131-136.
- Ji J, Försti A, Sundquist J, Hemminki K. Risk of breast, endometrial and ovarian cancer after twin births. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):703-11.
- Jin Y, Hao Z. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) in ovarian cancer risk. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2014; 35(6): 5267–5272.
- Kaderlik KR, Kadlubar FF. Metabolic polymorphisms and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. *Pharmacogenetics* 1995;5:S108-17.

- Kaku T, Ogawa C, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H et al. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 2003; 36:9–17
- Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, Pettersson F, Langmark F, Pedersen D, Prior P, Neal F, Karjalainen S, Bell J, et al. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 1995; 63(1):1-6.
- Karagas MR, Park S, Warren A, Hamilton J, Nelson HH, Mott LA, Kelsey KT. Gender, smoking, glutathione-S-transferase variants and bladder cancer incidence: a population-based study. *Cancer Lett* 2005; 219(1):63-9.
- Katoh T, Inatomi H, Kim H, Yang M, Matsumoto T, Kawamoto T. Effects of glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 genotypes on urothelial cancer risk. *Cancer Lett* 1998; 132: 147-152.
- Katsube Y, Berg JW, Silverberg SG. Epidemiologic pathology of ovarian tumors: a histopathologic review of primary ovarian neoplasms diagnosed in the Denver Standard Metropolitan Statistical Area, 1 July-31 December 1969 and 1 July-31 December 1979. *Int J Gynecol Pathol.* 1982;1:3-16.
- Kellen E, Hemelt M, Broberg K et al. Pooled analysis and meta-analysis of the glutathione S-transferase P1 Ile 105Val polymorphism and bladder cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2007; 165(11): 1221–1230.
- Kempkes M, Golka K, Reich S, Reckwitz T, Bolt HM. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder. *Arch Toxicol* 1996; 71(1-2):123-6.
- Ketterer B and Christodules LG. Enzymology of cytosolic glutathione S-transferases. *Adv Pharmacol* 1994;2:157-160.
- Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, Lang NP, Kadlubar FF. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992; 98:87-94.
- Ketterer B, Meyer DJ, Clark AG. Soluble glutathione isoenzymes. U: Glutathione



- conjugation. Eds. Sies H, Ketterer B. Academic Press, London 1988; pp 73-82.
- Ketterer B., Chrichtodules L.G. Enzymology of cytosolic glutathione S-transferases. *Adv Pharmacol* 1994; 2: 813-815.
  - Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J* 2010;10(1):54–61.
  - Kim A, Ueda Y, Naka T et al. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J Exp & Clin Cancer Res* 2012; 31: 14- 21
  - Kim W-J, Kim H, Kim C-H, Lee MS, Oh BR, Lee HM, Katoh T. GSTT1-null genotype is a protective factor against bladder cancer. *Urology* 2002; 60: 913-918.
  - Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, Callahan MJ, Garner EO, Gordon RW, Birch C et al: Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol* 2007, 31(2):161-169.
  - Kleinerman RA, Boice JD Jr, Storm HH, Sparen P, Andersen A, Pukkala E, Lynch CF, Hankey BF, Flannery JT. Second primary cancer after treatment for cervical cancer. An international cancer registries study. *Cancer* 1995; 76(3):442-52.
  - Knežević T, Ivanović I, Radović Lj, Gajić S, Maja Krstić, Goranka Lončarević, Dragan Miljuš, Dušica Nikosavić, Dejan Živadinović, Branislava Matić,. *Health Statistical Yearbook of Republic of Serbia 2010, Zdravstvenostatistički godišnjak Republike Srbije 2010*. Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", Institut - Batut, Beograd, 2011. Available at: <http://www.batut.org.rs>
  - Kobel M, Kalloger SE, Baker PM, Ewanowich CA, Arseneau J, Zhrebetskiy V, Abdulkarim S, Leung S, Duggan MA, Fontaine D et al: Diagnosis of ovarian carcinoma cell type is highly reproducible: a transcanadian study. *Am J Surg Pathol* 2010, 34(7):984-993.

- Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A et al: Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med* 2008, 5(12):e232. 65
- Kobel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, Gilks CB: Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2010, 29(3):203-211.
- Kobel M, Kalloger SE, Santos JL, Huntsman DG, Gilks CB, Swenerton KD: Tumor type and substage predict survival in stage I and II ovarian carcinoma: insights and implications. *Gynecol Oncol* 2010, 116(1):50-56.
- Komiya Y, Tsukino H, Nakao H, Kuroda Y, Imai H, Katoh T. Human glutathion S-transferase A1 polymorphism and susceptibility to urothelial cancer in the Japanese population. *Cancer Lett* 2005; 221(1):55-9.
- Koonings PP, Campbell K, Mishell DR Jr, et al. Relative frequency of primary ovarian neoplasms: a 10-year review. *Obstet Gynecol.* 1989;74:921-926.
- Kowalski LD, Kanbour AI, Price FV, Finkelstein SD, Christopherson WA, Seski JC, Naus GJ, Burnham JA, Kanbour-Shakir A, Edwards RP: A case-matched molecular comparison of extraovarian versus primary ovarian adenocarcinoma. *Cancer* 1997, 79(8):1587-1594.
- Krivokuca A, Dobricic J, Brankovic-Magic M. CHEK2 1100delC and Del5395bp mutations in BRCA-negative individuals from Serbian hereditary breast and ovarian cancer families. *J BUON* 2013; 18(3): 594–600.
- Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, editors. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014, p 307.
- Kwok P-Y, Deng Q, Zakeri H, Taylor SL, Nickerson DA. Increasing the information content of STS-based genome maps: Identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics* 1996; 31:123-126.

- L.A.G. Ries JLY, G.E. Keel, M.P. Eisner, Y.D Lin, M-J. Horner: SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program , 1988- 2001, Patient and Tumor Characteristics. National Cancer Institute SEER Program, NIH 2007, Pub.No. 07-6215.
- Lacy MQ, Hartmann LC, Keeney GL, Cha SC, Wieand HS, Podratz KC, Roche PC: c-erbB-2 and p53 expression in fallopian tube carcinoma. *Cancer* 1995, 75(12):2891-2896.
- Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000; 463: 247-283.
- Latifeh I, Marsden DE, Robertson G, Gebiski V, Hacker NF. Presenting symptoms of epithelial ovarian cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005 ;45:211-4.
- Le T, Adolph A, Krepert GV, Lotocki R, Heywood MS: The benefits of comprehensive surgical staging in the management of early-stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2002, 85(2):351-355.
- Lebrun S, Golka K, Schulze H, Föllmann W. Glutathione S-transferase polymorphisms and ochratoxin A toxicity in primary human urothelial cells. *Toxicology* 2006; 224(1-2):81-90.
- Lee J-Y, Kim HS, Suh DH, Kim M-K, Chung HH, Song Y-S. Ovarian cancer biomarker discovery based on genomic approaches. *J Cancer Prev* 2013; 18(4): 298–312.
- Lee SJ, Cho SH, Park SK, Kim SW, Park MS, Choi HY, Choi JY, Lee SY, Im HJ, Kim JY, Yoon KJ, Choi H, Shin SG, Park TW, Rothman N, Hirvonen A, Kang D. Combined effect of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on bladder cancer risk. *Cancer Lett* 2002; 177(2):173-9.
- Lengyel E: Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2010, 177(3):1053-1064.

- Levi PE, Hodgson E. Oxidation of pesticides by purified cytochrome P-450 isozymes from mouse liver. *Toxicol Lett* 1985; 24(2-3):221-8.
- Levine DA, De Los Santos J, Fleming J, Barakat RR, Markman M, Randall ME: *Handbook for Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. Lippincott, Williams & Wilkins, 2010.
- Li W-H, Grauer D. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland MA 1991.
- Lien S, Larsson AK, Mannervik B: The polymorphic human glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of the anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 191-197.
- Lin D., Meier D.J., Ketterer B., Lang N.P., Kadulbar F.F. Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-actoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogenesis in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4920-4926.
- Listowsky I, Abramovitz M, Homma H, Nutsu Y. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferase. *Drug Metab Rev* 1998; 18:305-318.
- Lockwood-Rayermann S, Donovan HS, Rambo D, Kuo CW: Women's awareness of ovarian cancer risks and symptoms. *Am J Nurs* 2009, 109(9):36-45; quiz 46.
- Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, Godwin AK: Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* 2009, 3(2):97-137.
- MacDonald ND, Rosenthal AN, Jacobs IJ. Screening for ovarian cancer. *Ann Acad Med Singapore* 1998; 27:676-82.

- Magagnotti C, Pastorelli R, Pozzi S, Andreoni B, Fanelli R, Airoidi L. Genetic polymorphisms and modulation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-DNA adducts in human lymphocytes. *Int J Cancer*. 2003; 107:878-884.
- Mannervik B and Danielson UH. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *Crit Rev Biochem* 1988;23:283-337.
- Mannervik B and Jansson H. Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J Biol Chem* 1982; 257:9909-9912.
- Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82:7202-7206.
- Mannervik B, Awasthi YC, Board B, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* 1992; 282:305-308.
- Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I and Pearson WR. Nomenclature for Mammalian Soluble Glutathione Transferases. In: *Methods in Enzymology, Volume 401, Glutathione Transferases and gamma-Glutamyl Transpeptidases*. Ed. Helmut Sies and Lester Packer, Elsevier Inc, San Diego, 2005; pp1-8.
- Mannervik B, Wilderstein M. Human glutathione transferases: classification, tissue distribution, structure and functional properties; in Pacifici GM, Fracchia GN: *Advances in Drug Metabolism in Man*. European Commission 1995, pp 407-459.
- Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. U: *advances in enzymology*. Ed. Meister A. John, Wiley & Sons, inc 1985; pp357-417.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454(7203):436-444.
- Marahatta SB, Punyarit P, Bhudisawasdi V, Paupairoj A, Wongkham S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett*. 2006;236(2):276-81.

- Masetti S, Botto N, Manfredi S, Colombo MG, Rizza A, Vassalle C, Clerico A, Biagini A and Andreassi MG. Interactive effect of glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on occurrence and severity of coronary artery risk. *J Mol Med* 2003; 81:488-494.
- Mayr D, Diebold J. Grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2000;19:348–353.
- McGrath M, Michaud D, De Vivo I. Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer* 2006; 6:239.
- McGuire S, Daggett DA, Bostad E, Nelson S, Wright LS, Siegel FL, Kornguth S, McLellan RA, Oscarson M, Alexandric AK, et al. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol* 1997; 52:958-965.
- McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene.* 2006;25(11):1639-48.
- McMeekin DS, Burger RA, Manetta A, DiSaia P, Berman ML. Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and its relationship to endometriosis. *Gynecol. Oncol.* 59(1),81–86 (1995).
- Menendez JA, Folguera-Blasco N, Cuyàs E, Fernández-Arroyo S, Joven J, Alarcón T. Accelerated geroncogenesis in hereditary breast-ovarian cancer syndrome. *Oncotarget.* 2016;7(11):11959-71.
- Menon U, Jacobs IJ. Ovarian cancer screening in the general population: current status. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11 Suppl 1:3-6.
- Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, et al. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 1991; 274:409-414.
- Miettinen OS. Simple interval estimations of risk ratio. *Am J Epidemiol* 1974; 100:515-516.

- Mills AM, Longacre TA. Lynch Syndrome Screening in the Gynecologic Tract: Current State of the Art. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(4):e35-44.
- Miljuš D, Živković S, Savković S. Cancer Incidence and Mortality in Central Serbia – 2010, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji – 2010. Registar za rak u centralnoj Srbiji, Institut za zaštitu zdravlja Srbije, Beograd, 2012. Available at: <http://www.batut.org.rs/>
- Modesitt SC, Tortolero-Luna G, Robinson JB, Gershenson DM, Wolf JK. Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet. Gynecol.* 100(4),788–795 (2002).
- Monks TJ, Anders MW, Dekant W. Contemporary issues in toxicology. Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 106: 1-19.
- Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, Leite JL, Granja F, Ward LS. Role of glutathione S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132:521-528.
- Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics.* 2002; 12:277-286.
- Moscow JA, Townsend AJ, Cowan KH. Elevation of pi class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mol Pharmacol* 1989; 36:22-28.
- Mukherjee B, Salavaggione OE, Pellemounter LL, Moon I, Eckloff BW, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboum RM. Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos.* 2006 ;34(7):1237-46.
- Nagle CM, Chenevix-Trench G, Spurdle AB, Webb PM. The role of glutathione S-transferase polymorphism in ovarian cancer survival. *Eur J Cancer* 2007; 43:283-290.
- Naora H: Developmental patterning in the wrong context: the paradox of epithelial ovarian cancers. *Cell Cycle* 2005, 4(8):1033-1035.

- Narod SA. Talc and ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2016. pii: S0090-8258(16)30139-1. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.04.011.
- Nasca PC, Greenwald P, Chorost S, Richart R, Caputo T: An epidemiologic case-control study of ovarian cancer and reproductive factors. *Am J Epidemiol* 1984, 119(5):705-713.
- Negus RP, Stamp GW, Relf MG, Burke F, Malik ST, Bernasconi S, Allavena P, Sozzani S, Mantovani A, Balkwill FR: The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* 1995, 95(5):2391-2396.
- Wang M, Xu X, et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995; 16(5):1243-5.
- Ness RB, Cottreau C: Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91(17):1459-1467.
- Oliveira C, Lourenço GJ, Sagarra RAM, Derchain SFM, Segalla JG, Lima CSP. Polymorphisms of glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1), Theta 1 (GSTT1), and Pi 1 (GSTP1) genes and epithelial ovarian cancer risk. *Dis Markers* 2012; 33(3): 155–159.
- Olson SH, Mignone L, Nakraseive C, Caputo TA, Barakat RR, Harlap S. Symptoms of ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2001;98:212-217.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herrtuaala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D and Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86:1372-1376.
- Pastovsky YV, Huang M-Q, Takayama T, et al. Distinctive structure of the human GSTM3 gene-inverted orientation relative to the Mu class glutathione transferase gene cluster. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361:85-93.



- Pectasides D, Fountzilas G, Aravantinos G, Kalofonos C, Efstathiou H, Farmakis D, Skarlos D, Pavlidis N, Economopoulos T, Dimopoulos MA: Advanced stage clear-cell epithelial ovarian cancer: the Hellenic Cooperative Oncology Group experience. *Gynecol Oncol* 2006, 102(2):285-291.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300:271-6.
- Pere H, Tapper J, Seppala M, Knuutila S, Butzow R: Genomic alterations in fallopian tube carcinoma: comparison to serous uterine and ovarian carcinomas reveals similarity suggesting likeness in molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1998, 58(19):4274-4276.
- Pereira D, Assis J, Gomes M, Nogueira A, Medeiros R. Improvement of a predictive model in ovarian cancer patients submitted to platinum-based chemotherapy: implications of a GST activity profile. *Eur J Clin Pharmacol* 2016;1-4.
- Petignat P, Gaudin G, Vajda D, Joris F, Obrist R. Ovarian cancer: the symptoms and pathology: the cases of the Cantonal Cancer Registry (1989-1995). *Schweiz Med Wochenschr.* 1997;127:1993-1999.
- Phillips DH, Schoket B, Hewer A, Grover PL. Human DNA adducts due to smoking and other exposures to carcinogens. *Prog Clin Biol Res* 1990; 340C:283-92.
- Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP *et al.* Dysplastic changes in prophylactically removed fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J. Pathol.* 195(4),451–456 (2001).
- Ping J, Wang H, Huang M, Liu Z-S. Genetic analysis of glutathione S-transferase A1 polymorphism in the Chinese population and the influence of genotype on enzymatic properties. *Toxicol Sci Of J Soc Toxicol* 2006; 89(2): 438–443.
- Ping J, Wang H, Huang M, Liu ZS. Genetic analysis of glutathione S transferase A1 polymorphism in the Chinese population and the influence porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chem Res Toxicol.* 1999;12(11):1066-76.

- Pongstaporn W, Rochanawutanon M, Wilailak S, Linasamita V, Weerakiat S, Petmitr S. Genetic alterations in chromosome 10q24.3 and glutathione S-transferase omega 2 gene polymorphism in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006;25(1):107-14.
- Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet* 2014; 124(1):1–5.
- Quiñones L, Lucas D, Godoy J, Cáceres D, Berthou F, Varela N, Lee K, Acevedo C, Martínez L, Aguilera AM, Gil L. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett.* 2001; 174:35-44
- Raimondi S, Paracchini V, Autrup H, Barros-Dios JM, Benhamou S, Boffetta P, Cote ML, Dialyna IA, Dolzan V, Filiberti R, Garte S, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Imyanitov EN, Kalina I, Kang D, Kiyohara C, Kohno T, Kremers P, Lan Q, London S, Povey AC, Rannug A, Reszka E, Risch A, Romkes M, Schneider J, Seow A, Shields PG, Sobti RC, Sørensen M, Spinola M, Spitz MR, Strange RC, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Tokudome S, Yang P, Yuan JM, Warholm M, Taioli E. Meta- and pooled analysis of GSTT1 and lung cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2006; 164(11):1027-42.
- Ranganathan PN, Whalen R and Boyer TD. Characterization of the molecular forms of glutathione S-transferase P1 in human gastric cancer cells (Kato III) and in normal human erythrocytes. *Biochem J* 2005; 386:525-533.
- Ranson H, Collins F and Hemingway J. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:14284-14289.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49:1603–1616.

- Rhoads DM, Zarlengo RP, Tu C-PD. The basic glutathione S-transferases from human livers are products of separate genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;145:474-481.
- Ribeiro JR, Lovasco LA, Vanderhyden BC and Freiman RN. Targeting TBP-associated factors in ovarian cancer HYPOTHESIS & THEORY ARTICLE *Front. Oncol.*, 11 March 2014 | <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00045>
- Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact.* 2006; 159(1):18-46.
- Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE *et al.* Prevalence and penetrance of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68(3):700–710.
- Risch HA: Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(23):1774-1786.
- Rohrdanz E, Nguyen T, Pickett CB. Isolation and characterization of the human glutathione S-transferase A2 subunit gene. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:747-752.
- Roth LM, Recent Advances in the Pathology and Classification of Ovarian Sex Cord-Stromal Tumors. *Int J Gynecol Pathol*, 2006; Vol. 25, No. 3.
- Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K, et al. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA 1. *N Engl J Med.* 1996; 335:1413-1416.
- Rydberg D, Skaug V, Hewer A, Philips DH, Harries LW, Wolf CR, Ogreid D, Ulvik A, Vu P and Haugen A. Genotypes of glutathione transferase m1 and p1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, 1997; 18:1285-1289.
- Sachidanandam R et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928–933.

- Saida T, Tanaka YO, Matsumoto K, Satoh T, Yoshikawa H, Minami M. Revised FIGO staging system for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: important implications for radiologists. *Jpn J Radiol* 2016; 34(2): 117–124.
- Salagovic J, Kalina I, Stubna J, Habalová V, Hrivnák M, Valanský L, Kohút A, Biros E. Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. *Neoplasma* 1998; 45(5):312-7.
- Satoh K, Hatayama I, Tateoka N, Tamai K, Shimizu T, Tatematsu M, Ito N and Sato K. Transient induction of single GST-P positive hepatocytes by DEN. *Carcinogenesis* 1989; 10:2107-2111.
- Savic-Radojevic A, Radic T. GSTA1 (glutathione S-transferase alpha 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2014;18(9):645-649.
- Sawers L, Ferguson MJ, Ihrig BR et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) directly influences platinum drug chemosensitivity in ovarian tumour cell lines. *Br J Cancer* 2014; 111(6): 1150–1158.
- Scarpato R, Migliore L, Hirvonen A, Falck G, Norppa H. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of GSTM1, GSTT1, and NAT2 genotypes. *Environ Mol Mutagen* 1996; 27(4):263-9.
- Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, Evanoff A, Hughes C: Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1996, 88(4 Pt 1):554-559.
- Schipper DL, Wagenmans MJH, Wagener DJT and Peters WHM. Glutathione S-transferases and cancer (review). *Int J Oncol* 1997; 10:1261-1264.
- Schisselbauer JC, Silber R, Papadopoulos E, et al. Characterization of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Res* 1990; 50: 3562-3568.
- Schultz M, Dutta S, Tew K. Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Rev* 1997; 26:91-104.

- Schwede M, Spentzos D, Bentink S, Hofmann O, Haibe-Kains B, Harrington D, Quackenbush J, Culhane AC: Stem cell-like gene expression in ovarian cancer predicts type II subtype and prognosis. *PLoS One* 2013, 8(3):e57799.
- Scully RE, Young RH, Clement PB Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. In: *Atlas of tumor pathology, 3rd series, fasc 23.* Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC(1998)
- Seidegard J, Pero RW, Markowitz MM, et al. Isoenzymes of glutathione S-transferase (class mu) as a marker for susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis* 1990; 37:8-14.
- Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.W., Pearson R.W. Herediatry difference in the expression of the human glutathione S-transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:7293-7297.
- Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian serous borderline tumors. A critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Hum Pathol.* 2000; 31:539-557.
- Sgambato A, Campisi B, Zupa A et al. Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms as risk factors for cancer in a highly homogeneous population from southern Italy. *Anticancer Res* 2002; 22(6B): 3647–3652.
- Sherat PJ and Hayes JD. *Glutathione S-transferases.* M Wiley & Sons, 2002, New York.
- Sherman M, Titmuss S, Kirsch RE. Glutathione S-transferase in human organs. *Biochem Int* 1983; 6:109-118.
- Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, et al: Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. *Biochem J* 1997; 326:837-846.

- Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Hasumi K, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features—problems involved in the architectural grading system. *Gynecol Oncol.* 1998;70:2–12.
- Silverberg S. Borderline ovarian tumors: consensus, controversy, and continuing challenges. *Pathol Case Rev* 2006; 11:9–17
- Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol.* 2000;19:7– 15.
- Simone CG, Markham MJ, Dizon DS. Chemotherapy in ovarian germ cell tumors: A systematic review. *Gynecol Oncol.* 2016. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.02.007.
- Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A and Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis* 2001; 22:67-72.
- Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: Influence of polymorphism on susceptibility to cancer; in Boffetta P, Caporaso N, Cuzick J, Lang M, Vincis P: *Metabolic Polymorphism and Cancer*, Lyon, IARC Scientific Publications 1999, 148; 231-249.
- Straub RH: The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 2007, 28(5):521-574.
- Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Siedel A, Mannervik B and Jernstrom B. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 1998; 19:433-436.
- Suzuki T, Coggan M, Shaw DC, Board PG. Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isoenzymes. *Ann Hum Genet* 1987; 51:95-99.

- Sweeney C, Coles BF, Nowell S, Lang NP, Kadlubar FF. Novel markers of susceptibility to carcinogens in diet: associations with colorectal cancer. *Toxicology*. 2002; 181-182:83-7
- Sweeny C, Farrow DC, Schwartz SM, Eaton DL, Checkoway H and Vaughan TL. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphism as risk factors for renal cell carcinoma: a case control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2000; 9:449-454.
- Tavassoli FA, Devilee P, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Tract*. Lyon: IARC Press, 2003.
- Tavassoli FA: *World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics. Tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press 2003.
- Terry KL, Schock H, Fortner RT et al. A prospective evaluation of early detection biomarkers for ovarian cancer in the European EPIC cohort. *Clin Cancer Res Of J Am Assoc Cancer Res*. 2016; pii: clincanres.0316.2016
- Tew K and Ronai Z. GST function in drug and stress response. *Drug Resistance Updates* 1999; 2:143-147
- Tew KD, Manevich Y, Grek C, Xiong Y, Uys J, Townsend DM. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(2): 299–313.
- Their R, Golka K, Brüning T, et al. Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts. *Toxicol Lett* 2002; 127:321-327.
- Their R, Muller M, Taylor JB, et al. Enhancement of bacterial mutagenicity of bifunctional alkylating agents by expression of mammalian glutathione S-transferase. *Chem Res Toxicol* 1995; 8:465-472.

- Their R, Wiebel FA, Hinkel A, et al. Species differences in the glutathione transferase GST1-1 activity towards the model substrates methyl chloride and dichloromethane in liver and kidney. *Arch Toxicol* 1998; 72:622-629.
- Thévenin AF, Zony CL, Bahnson BJ, Colman RF. GST pi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2. *Protein Sci Publ Protein Soc* 2011; 20(5): 834–848.
- Thieman i Palladino. *Introduction to Biotechnology*, 2nd edition, Pearson Benjamin Cummings, 2008.
- Thier R, Pemble SE, Kramer H, Taylor JB, Guengerich FP, Ketterer B. Human glutathione S-transferase T1-1 enhances mutagenicity of 1,2-dibromoethane, dibromomethane and 1,2,3,4-diepoxybutane in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis* 1996; 17(1): 163–166.
- Tian W, Wang Y, Xu Y, Guo X, Wang B, Sun L, Liu L, Cui F, Zhuang Q, Bao X, Schley G, Chung TL, Laslett AL, Willam C, Qin B, Maxwell PH, Esteban MA. The hypoxia-inducible factor renders cancer cells more sensitive to vitamin C-induced toxicity. *J BiolChem* 2014; 289(6):3339-3351.
- Townsend D, Tew K. Cancer drugs, genetic variation and the glutathione S-transferase gene family. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3:157-172.
- Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free RadicBiol Med* 2011;51(5):1000-1013.
- Trimble CL, Kosary C, Trimble EL. Long-term survival and patterns of care in women with ovarian tumors of low malignant potential. *Gynecol Oncol*.2002;86:34-37.
- Trimble EL. NCI Clinical Announcement of Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer Accessed March 1,2009.
- Tsuchida S, Sato K. Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992; 27:337-384.



- Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK et al: Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010, 376(9737):235-244.
- van der Burg ME, van Lent M, Buyse M, et al. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Eng J Med.* 1995;332:629-634.
- Varga D, Deniz M, Schwentner L, Wiesmuller L: Ovarian cancer: in search of better marker systems based on DNA repair defects. *Int J Mol Sci* 2013, 14(1):640-673.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health.* 2009;6:445-462.
- Venter JC et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304–1351.
- Vine MF, Ness RB, Calingaert B, Schildkraut JM, Berchuck A. Types and duration of symptoms prior to diagnosis of invasive or borderline ovarian tumor. *Gynecol Oncol.* 2001;83:466-471.
- Vineis P, Alavanja M, Garte S. Dose-response relationship in tobacco-related cancers of bladder and lung: a biochemical interpretation. *Int J Cancer* 2004; 108(1):2-7.
- Vineis P, and Simonato L. Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systemic approach. *Arch Environ Health* 1991; 46:6-10.
- Vos RM, Van Bladeren PJ. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 1990; 75(3):241-65.

- Waalkes PW, Ward JM and Diwan BA. Induction of tumors of the liver, lung, ovary and adrenal in adult mice after brief maternal gestational exposure to inorganic arsenic: promotional effects of postnatal phorbol ester exposure on hepatic and pulmonary, but not dermal cancers. *Carcinogenesis* 2004; 25:133-141.
- Walker JL, Powell CB, Chen LM, Carter J, Bae Jump VL, Parker LP, Borowsky ME, Gibb RK. Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer*. 2015;121(13):2108-20.
- Wallace L, Pellizzari E, Hartwell TD, Perritt R, Ziegenfus R. Exposures to benzene and other volatile compounds from active and passive smoking. *Arch Environ Health* 1987; 42(5):272-9
- Wang T, Arifoglu P, Ronai Z and Tew K. Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C-terminus. *J Biol Chem* 2001; 276:20999-21003.
- Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 6th edition, Pearson,
- Webb P, Purdie D, Grover S, Jordan S, Dick L-M, Green A. Symptoms and diagnosis of borderline, early and advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;92:232-9.
- Whalen R, Boyer TD. Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis* 1998;18:345-358.
- Whittemore AS, Harris R, Itnyre J: Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992, 136(10):1212-1220.
- WHO. Cancer Mortality Database, International Agency for Research on Cancer - IARC, Lyon, France, 2012. Available at: <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>, Last update: 06-Nov-2012

- Wiencke JK, Pemble S, Ketterer B, Kelsey KT. Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(3):253-9.
- Wildersten M, Pearson WR, Engstrom A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases mu and psi. *Biochem J* 1991; 276:519-524.
- Wilson MH, Grant PJ, Kain K, Warner DP and Wild CP. Association between the risk of coronary artery disease in South Asians and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase M1. *Biomarkers* 2003; 8:43-50.
- Witzmann FA, Daggett DA, Fultz CD, Nelson SA, Wright LS, Kornguth SE, Siegel FL. Glutathione S-transferases: two-dimensional electrophoretic protein markers of lead exposure. *Electrophoresis* 1998; 19(8-9):1332-5.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2004 Dec;14(6):473-86.
- Woolas RP, Xu FJ, Jacobs IJ, et al. Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1748-51.
- World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Ovarian Cancer 2014. Available at [http://www.dietandcancerreport.org/cup/cup\\_resources.php](http://www.dietandcancerreport.org/cup/cup_resources.php).
- Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33(12): 656–668.
- Xu BH, Gupta V, and Singh SV. Mitomycin C sensitivity in human bladder cancer cells: possible role of glutathione and glutathione transferase in resistance. *Arch Biochem Biophys* 1994; 308:164-170.

- Xu C, Chen S, Wang T et al. Quantitative assessment of the influence of glutathione S-transferase M1 null variant on ovarian cancer risk. *J Cancer Res Ther* 2014; 10 Suppl: C201–205.
- Xu S, Wang Y, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998; 273:3517-3527.
- Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Danesh J. Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *PLoS Med* 2006; 3(4):e91.
- Yin Y, Feng L, Sun J. Association between glutathione S-transferase M 1 null genotype and risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2013; 34(6): 4059–4063.
- Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY: BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* 1999, 59(15):3547-3551.
- Zeng FF, Liu SY, Wei W, Yao SP, Zhu S, Li KS, Wan G, Zhang HT, Zhong M, Wang BY. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1 and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Clin Exp Med* 2010; 10(1):59-68.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN et al: Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003, 348(3):203-213.
- Zhang Z, Xie Z, Sun G, Yang P, Li J, Yang H, et al. Reversing drug resistance of cisplatin by hsp90 inhibitors in human ovarian cancer cells. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(5): 6687–6701.
- Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spur NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993;14:1821-1824.

- Zhou H, Brock J, Liu D, Board PG and Oakley AJ. Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases. *J. Mol. Biol.* 2015;420:190-203
- Zimniak P, Nanduri B, Pikuła S, Bandorowicz-Pikuła J, Singhal SS, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994; 224(3):893-9.

## 9. BIOGRAFIJA

Dr Igor Plješa je rođen 22.07.1972. godine u Zemunu, gde je završio Osnovnu školu i Zemunsku I gimnaziju. Medicinski fakultet u Beogradu je upisao školske 1991/92 godine i završio 29.06.1998. godine. Obavezni lekarski staž je obavio u Kliničko Bolničkom Centru Zemun i 1999. je započeo specijalizaciju iz Ginekologije i akušerstva, a u februaru 2004. godine je položio Specijalistički ispit. Magistarske studije iz Humane reprodukcije je završio na Medicinskom fakultetu u Beogradu gde je 2006. godine odbranio Magistarsku tezu pod nazivom *"Uporedna analiza bakterijskih uzročnika tuboovarijalnih abscesa kod korisnica intrauterinih uložaka i pelvičnih inflamatornih bolesti druge etiologije"* kod mentora Prof. dr Milice Berisavac. Užu specijalizaciju iz oblasti Onkologije započeo je 2008. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a 2012. godine je odbranio rada uže specijalizacije pod nazivom: *„Iskustvo operatora kao prognostički faktor u lečenju premalignih promena grlića materice“* kod mentora Prof. dr Vesna Kesić. U 2012. godini je stekao titulu Primarijusa u Srpskom Lekarskom Društvu. Mentor je za specijalizaciju iz ginekologije i akušerstva na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Član je Internacionalnog udruženje ginekološke onkologije (IGCS), Evropskog udruženje ginekološke onkologije (ESGO), Udruženja za ginekološku onkologiju Srbije (UGOS), Član Skupštine Ginekološko-akušerske sekcije SLD, počasni član Udruženja ginekologa i akušera Makedonije i počasni član Makedonskog Lekarskog Društva.

Od 2000. godine je stalno zaposlen u Kliničko Bolničkom Centru Zemun.

Koautor je monografije Patologija trudnoće i autor i koautor u 42 naučna rada.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani **Igor Plješa**

broj upisa \_\_\_\_\_

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Uloga glutation transferaza kao biomarkera rizika za nastanak karcinoma jajnika“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18.05.2016.



\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Igor Plješa**

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada „**Uloga glutation transferaza kao biomarkera rizika za nastanak karcinoma jajnika**“

Mentor Prof. dr Milica Berisavac

Potpisani **Igor Plješa**

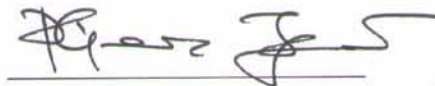
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18.05.2016.





**Prilog 3.**

**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Uloga glutation transferaza kao biomarkera rizika za nastanak karcinoma jajnika“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

**3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 18.05.2016.

