

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Иван Љ. Павловић

Прогностички значај клиничко-
патолошких и антиоксидативних
параметара код пацијената оболелих од
тубуларног карцинома бубрега

докторска дисертација

Београд, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivan Lj. Pavlović

Prognostic significance of
clinicopathological and antioxidant
parameters in patients with renal cell
carcinoma

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Комисија за преглед и одбрану:

Ментори:

др Снежана Б. Пајовић, научни саветник
Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду
редовни професор
Медицински факултет, Универзитет у Нишу

др Синиша Ђурашевић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Чланови комисије:

др Снежана Пејић, виши научни сарадник
Институт за нуклеарне науке „Винча“, Универзитет у Београду

др Софија Глумац, доцент
Медицински факултет, Универзитет у Београду

др Небојша Јаснић, ванредни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Датум одбране: _____

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација је урађена у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију, Института за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду, у оквиру пројеката „Гелијске и молекулске основе малигних и кардиоваскуларних обољења - клиничке импликације“ (III 41027, руководилац др Снежана Пејић) финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Искрено се захваљујем ментору, проф. др Снежани Б. Пајовић, на указаном поверењу, разумевању, саветима, корисним критикама као и потпуној слободи у раду током израде ове докторске дисертације.

Захваљујем се ментору, проф. др Синиши Бурашевићу, на корисним сугестијама и помоћи, посебно у финалној фази израде ове тезе.

*Хвала др Снежани Пејић за несебичну помоћ у свим фазама израде ове докторске дисертације као и на „пријатељском шефовању“ током читавог пројектног периода. *Houston, there's no problem anymore!**

Захваљујем се доц. др Софији Глумац на сугестијама и помоћи, посебно у финалној фази израде ове докторске дисертације.

Посебно се захваљујем доц. др Сањи Радојевић Шкодрић на помоћи у прибављању узорака, клиничко-патолошких података и информација о статусу пацијената чиме је у великој мери омогућила да ова студија буде урађена.

Захваљујем се проф. др Зорану Цамићу на помоћи приликом прибављања података о животном статусу пацијената за потребе студије преживљавања.

Велико хвала проф. др Тихомиру Дуганџији и госпођи Бранки Вукоје са Института за онкологију Војводине на уступљеним подацима о инциденти и морталитету од тубуларног кацринома бубрега за АП Војводину.

Захваљујем се свим својим колегицама из групе за стручну помоћ, а посебно др Ани Тодоровић на помоћи током експерименталног рада и „невиђеном закључку“.

Велико хвала колегицама и колегама из Лабораторије за молекуларну биологију и ендокринологију којима сам се обратио за помоћ.

Посебну захвалност дугујем својим родитељима Мирјани и Љубиши Павловић на подршци, пожртвовању и одрицању током мог целокупног школовања. Ова теза је резултат тога.

Низмерно хвала мојој супрузи Маји Медојевић Павловић на безграничној љубави, разумевању, стрпљењу, саветима и подршци током свих ових година, као и сину Димитрију који је свему дао посебан смисао.

Иван Павловић

Прогностички значај клиничко-патолошких и антиоксидативних параметара код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега

САЖЕТАК

Тубуларни карцином бубрега (*renal cell carcinoma, RCC*) је најчешћи облик неоплазије бубрега. Ово је хетерогена болест која укључује хистолошке ентитете које одликују различита етиологија, клиничка манифестација, генетичка предиспозиција и исход. У последње две деценије је забележен константан раст инциденце RCC, посебно у развијеним земљама доброг социо-економског статуса. Инциденца RCC у Србији је релативно ниска у поређењу са већином европских земаља, али број оболелих константно расте, што је праћено и порастом морталитета.

Због интензивне метаболичке активности и добре снабдевености кисеоником епителне ћелије бубрежних тубула су изложене деловању реактивних врста кисеоника (енг. *reactive oxygen species, ROS*). Физиолошки ниво ROS-а, у ћелијама бубрега, одржава антиоксидативни (АО) систем кога чине ензими (бакар цинк супероксид дисмутаза, CuZnSOD; манган супероксид дисмутаза, MnSOD; каталаза, CAT; глутатион пероксидаза, GPx; глутатион редуктаза, GR; глутатион трансфераза, GST) и неензимски молекул глутатион (GSH).

Индикације о исходу RCC у земљама у развоју, укључујући Србију, су засноване на подацима о инциденци и морталитету, услед недостатка информација о преживљавању. И поред бројних студија, постоји потреба за дефинисањем поузданих прогностичких маркера код оболелих од RCC. Ова докторска дисертација је урађена са циљем да обезбеди податке о исходу болести код пацијената оболелих од RCC и идентификује факторе који утичу на укупно преживљавање испитаника. Полазећи од значајне улоге оксидативног стреса за процес канцерогенезе, у другом делу ове докторске дисертације је урађена анализа АО статуса која укључује одређивање параметара оксидативног стреса, липидне пероксидације и АО заштите. Такође, у овој студији је први пут процењен значај активности АО ензима, концентрације GSH и малондиалдехида (MDA) за преживљавање пацијената оболелих од RCC.

За потребе ове студије, ретроспективно су прикупљени клиничко-патолошки подаци пацијената (старост, пол, величина, градус, стадијум и хистолошки подтип тумора) којима је у периоду од 2009. до 2013. године дијагностикован RCC. Преживљавање пацијената је праћено у периоду од пет година, односно, од дана операције до краја студије или до наступања смртог исхода.

За анализу АО статуса су прикупљени узорци здравог и туморског ткива бубрега пацијената након хируршке интервенције. У узорцима је одређен ниво прооксидативно-анитоксидативног баланса (PAB), концентрација GSH и MDA, ниво информационе РНК и протеина, као и активност АО ензима (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx, GR, GST). Поред тога је одређен ниво информационе РНК и протеина транскрипционог фактора Nrf2 и његовог инхибитора Keap1.

Стопа преживљавања пацијената је одређена Каплан-Мајер методом, а процена прогностичког значаја клиничко-патолошких и АО параметара је урађена Коксовом униваријантном и мултиваријантном анализом. Квантитативна анализа експресије гена је урађена методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену (RTq-PCR), а ниво протеина је одређен имуноблот (Westernblot) анализом. Анализа концентрације укупних протеина, PAB, GSH, MDA и активности АО ензима је урађена одговарајућим спектрофотометријским методама.

Резултати студије преживљавања су показали краће укупно преживљавање пацијената у седмој и осмој деценији живота и испитаника са тумором величине изнад 7 cm. Такође, пацијенти који су имали туморе високог градуса (III и IV) и стадијума (3. и 4.) су значајно краће живели у поређењу са онима код којих тумори нису у тој мери напредовали. Пацијенти са туморима III и IV градуса су под значајно већим ризиком од смртог исхода у односу на оне код којих су тумори били I и II градуса. Слично, трећи и четврти стадијум тумора су у вези са значајно већим ризиком за негативан исход болести.

Малигно ткиво бубрега је имало виши ниво PAB и MDA, а нижу концентрацију GSH у поређењу за здравим ткивом. Поред тога, у туморима је регистрована нижа експресија *SOD1*, *CAT*, *GR*, *GSTA1* гена, нижи ниво протеина и пад активности CuZnSOD, CAT, GR и GST. Насупрот томе, малигно ткиво је

показало усходну регулацију експресије *SOD2*, што је праћено вишим нивоом протеина и повећаном активношћу *MnSOD*. Усходна регулација експресије *GPX1* гена у *RCC* није имала ефекта на ензимску активност *GPx*, која је била за 75% нижа него у здравом ткиву. Малигно ткиво је показало стабилну експресију *NRF2* гена и *Nrf2* протеина. Експресија *KEAP1* гена се није значајно мењала у туморима у поређењу са здравим ткивом. Пораст нивоа *Keap1* протеина у туморима трећег и четвртог стадијума није имао ефекта на ниво *Nrf2*.

Пацијенти који су имали повећану концентрацију *GSH* и повишену активност *GPx* и *GR* у туморском ткиву бубрега су имали нижу стопу укупног преживљавања након петогодишњег периода праћења. Такође, виши ниво *GSH*, *GPx* и *GR* је носио готово два пута већи ризик од смртог исхода. Промена активности *SOD*, *CAT* и *GST*, као ни концентрација *MDA*, нису статистички значајно утицали на преживљавање пацијената оболелих од *RCC*.

Резултати ове докторске дисертације су показали да су старост пацијената, величина, градус и стадијум тумора независни клиничко-патолошки параметри који утичу на укупно преживљавање пацијената оболелих од *RCC*, али да само градус и стадијум имају прогностички значај на основу кога се може проценити исход болести након нефректомије.

Малигно трансформисано ткиво бубрега је у стању оксидативног стреса услед смањеног АО капацитета да елиминира *ROS*. Повећана активност *MnSOD* у *RCC* указује на тумор-протективну улогу овог ензима, док смањена активност *CAT* и *GPx* значи умањену способност малиног ткива да елиминира H_2O_2 , што истиче значај овог молекула у процесу канцерогенезе бубрега. Нижа активност *GST* у *RCC* је остала непромењена код унапредовалих форми *RCC*, што сугерише да је опадање активности овог ензима део раних догађаја у процесу канцерогенезе. Опадање функције *GST* би могао бити један од фактора који доприноси малигној трансформацији ткива бубрега. Стабилна експресија *Nrf2* указује да је очување функционалности овог транскрипционог фактора један од кључних догађаја у канцерогенези бубрега.

Повишен ниво *GSH*, *GPx* и *GR* у малижном ткиву бубрега је у вези са лошијом прогнозом, што указује на њихову тумор-протективну улогу. Резултати

указују да глутатион и глутатион зависни ензими могу имати предикциони значај код оболелих од тубуларног карцинома бубрега.

Кључне речи: тубуларни карцином бубрега, клиничко-патолошки параметри, оксидативни стрес, антиоксидативни параметри

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Биомедицина

Prognostic significance of clinicopathological and antioxidant parameters in patients with renal cell carcinoma

SUMMARY

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney neoplasia. This is a heterogeneous disease that includes histological entities characterized with different etiology, clinical manifestation, genetic predisposition, and outcome. In the last two decades, there has been a constant increase of RCC incidence, particularly in developed countries of good socio-economic status. The incidence of RCC in Serbia is relatively low compared to the most European countries, but the number of patients constantly grows accompanied by an increase of mortality rates.

Renal tubular epithelial cells are exposed to detrimental effect of reactive oxygen species (ROS) as result of good oxygen supply and intensive metabolic activity. Antioxidant (AO) system consisting of enzymes (copper-zinc superoxide dismutase, CuZnSOD; manganese superoxide dismutase, MnSOD; catalase, CAT; glutathione peroxidase, GPx; glutathione S-transferase, GST) and small non-enzymatic molecules such as glutathione (GSH), maintains physiological level of ROS in kidney cells.

There is lack of data regarding survival for lower-income countries, including Serbia. Despite numerous studies, the reliable prognostic markers in patients with RCC are still necessary. This doctoral dissertation was conducted to provide the outcome data of Serbian patients with RCC in relation to clinicopathological features and to identify prognostic factors that could affect their overall survival (OS). Taking into account the significance of oxidative stress for the cancer development, in the second part of this doctoral dissertation, the AO status analysis was done, which includes assessment of oxidative stress, lipid peroxidation and AO protection. In this study, for the first time the effect of AO enzymes activity, GSH concentration and malondialdehyde (MDA) level on OS among patients with RCC was assessed.

For survival study, we retrospectively collected clinicopathological data (age, sex, size, grade, stage and histological subtype of tumor) of patients diagnosed with RCC between 2009 and 2013. The follow-up period was five years, starting from the surgery date until death or the last follow-up appointment.

For AO status analysis, we collected tumor and normal kidney tissue specimens of patients who underwent nephrectomy. In all samples, we determined level of prooxidant-antioxidant balance (PAB), concentration of GSH and MDA, activity of AO enzymes (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx, GR, GST) and level of mRNA and proteins. Additionally, the mRNA and protein level of transcription factor Nrf2 and its inhibitor Keap1 were determined.

The OS rate was analyzed with Kaplan-Meier method, and the prognostic significance of clinicopathological and AO parameters was assessed with Cox univariate and multivariate analysis. Quantitative real-time PCR (RTq-PCR) was used for gene expression analysis and the protein level was determined by Western blot. Concentration of total proteins, PAB, GSH, MDA and AO enzyme activity were measured spectrophotometrically.

Patients in the seventh and eighth decade of life and those with a tumor size larger than 7 cm had lower overall survival rate. Also, patients with high grade (III and IV) and high stage (3rd and 4th) tumors lived significantly shorter compared to those in whom tumors had not progressed to that extent. Patients with grade III and IV tumors had significantly higher risk of death than those whose tumors were grade I and II. Similarly, the third and fourth stage of the tumor were high-risk factors for the negative outcome of the disease.

Increased PAB and MDA level and a lower concentration of GSH were measured in RCC compared to normal kidney tissue. Also, tumors had lower *SOD1*, *CAT*, *GR*, *GSTA1* genes expression, and decreased level of proteins, as well as CuZnSOD, CAT, GR and GST activity. In contrast, tumor tissue showed the upregulation of *SOD2* expression, followed by increased protein level and higher activity of MnSOD. The upregulation of *GPX1* expression in RCC did not affect GPx1 activity, which was 75% lower compared to normal kidney tissue. Malignant tissue showed stable expression of *NRF2* gene and unchanged level of Nrf2 protein in comparison to normal kidney. No significant difference in *KEAP1* gene was detected in tumors compared to normal tissue of the kidney. Increased level of Keap1 protein in high stage tumors did not influence the Nrf2 level.

After five years of follow-up, patients with increased GSH concentration and elevated GPx and GR activity in tumors had a lower OS. Also, the increased levels of

GSH, GPx and GR were related to two time higher risk of fatal outcome. The activity of SOD, CAT and GST, as well as MDA concentrations, did not significantly affect the survival of patients with RCC.

The results of this doctoral dissertation have shown that age, size, grade and tumor stage are independent clinicopathological factors affecting OS, but only grade and stage have prognostic significance. Tumor tissue is under oxidative stress due to its reduced capacity to eliminate ROS. Increased MnSOD activity in RCC indicates tumor-protective role of this enzyme, while reduced CAT and GPx activity means decreased ability of tumor tissue to eliminate H₂O₂, emphasizing the significance of this molecule for kidney carcinogenesis.

Lower GST activity in RCC remained unchanged in advanced forms of tumors, suggesting that declining GST activity is part of early events in the kidney carcinogenesis. Decreasing of GST function could be one of the significant factors contributing to malignant transformation of kidney tissue. Stable Nrf2 expression suggests that preserved functionality of this transcription factor is key event in kidney cancerogenesis.

Increase level of GSH, GPx and GR in RCC is associated with worse prognosis, indicating their tumor-protective role. The results indicate that these parameters might have a predictive significance in patients with renal cell carcinoma.

Keywords: renal cell carcinoma, clinicopathological parameters, oxidative stress, antioxidant parameters

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biomedicine

1. УВОД.....	1
1.1 КАРЦИНОМ БУБРЕГА	1
1.1.1 Тубуларни карцином бубрега (Renal Cell Carcinoma).....	1
1.1.1.1 Фактори ризика.....	2
1.1.1.2 Епидемиологија	4
1.1.1.3 Класификација и основне хистопатолошке одлике тубуларног карцинома бубрега	7
1.1.1.4 Молекулска основа тубуларног карцинома бубрега	10
1.2 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС.....	12
1.3 АНТИОКСИДАТИВНИ СИСТЕМ	13
1.3.1 Супероксид дисмутаза	14
1.3.2 Каталаза.....	17
1.3.3 Глутатион пероксидаза	18
1.3.4 Глутатион редуктаза	19
1.3.5 Глутатион трансфераза	20
1.3.6 Глутатион.....	20
1.4 KEAP1/NRF2 СИСТЕМ	22
2. ЦИЉЕВИ.....	24
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	26
3.1 ОПШТЕ НАПОМЕНЕ	26
3.2 ИНФОРМАЦИЈЕ О ПАЦИЈЕНТИМА	26
3.3 УЗИМАЊЕ УЗОРАКА ТКИВА БУБРЕГА	27
3.4 АНАЛИЗА УЗОРАКА	27
3.4.1 Припрема узорака здравог и туморског ткива бубрега	28
3.4.1.1 Мерење концентрације укупних протеина	28
3.4.2 Мерење прооксидативно-анитоксидативног баланса.....	29
3.4.3 Мерење концентрације редукованог глутатиона.....	29
3.4.4 Мерење концентрације укупног малондиалдехида	30
3.4.5 Мерење активности антиоксидативних ензима	30
3.4.5.1 Мерење активности супероксид дисмутаза	30
3.4.5.2 Мерење активности каталазе.....	31
3.4.5.3 Мерење активности глутатион пероксидазе.....	31
3.4.5.4 Мерење активности глутатион редуктазе	32
3.4.5.5 Мерење активности глутатион трансферазе.....	32
3.4.6 Раздвајање протеина електрофорезом и имуноблот анализа.....	32
3.4.6.1 Припрема узорака за електрофорезу	32
3.4.6.2 Електрофореза на полиакриламидном гелу.....	33
3.4.6.3 Трансфер протеина са гела на нитроцелулозну мембрану.....	33
3.4.6.4 Имуноблот (Western blot) анализа	34
3.4.7 Анализа експресије гена	35
3.4.7.1 Изолација РНК.....	35
3.4.7.2 Синтеза комплементарне ДНК.....	36
3.4.7.3 Квантификација експресије гена у реалном времену (RTq-PCR).....	37
3.5 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	38
4. РЕЗУЛТАТИ	39
4.1 СТУДИЈА ПРЕЖИВЉАВАЊА	39
4.1.1 Клиничко-патолошке одлике пацијената.....	39

4.1.2 Клиничко-патолошке одлике пацијената стратификоване према хистолошком подтипу тумора	40
4.1.3 Укупно преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега.....	42
4.1.4 Утицај клиничко-патолошких одлика на укупно преживљавања пацијената	44
4.1.5 Предикциони потенцијал клиничко-патолошких одлика	50
4.2 АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС МАЛИГНО ТРАНСФОРМИСАНОГ ТКИВА БУБРЕГА.....	52
4.2.1 Прооксидативно-антиоксидативни баланс у ткиву бубрега у односу на градус и стадијум тумора	52
4.2.2 Концентрација глутатиона у ткиву бубрега у односу на градус и стадијум тумора.....	53
4.2.3 Концентрација малондиалдехида у ткиву бубрега у односу на градус и стадијум тумора.....	54
4.2.4 Експресија ензима антиоксидативне заштите у ткиву бубрега у односу на градус тумора.....	55
4.2.4.1 Експресија бакар-цинк супероксид дисмутазе у односу на градус тумора	55
4.2.4.2 Експресија манган супероксид дисмутазе у односу на градус тумора	56
4.2.4.3 Експресија каталазе у односу на градус тумора.....	58
4.2.4.4 Експресија глутатион пероксидазе у односу на градус тумора.....	59
4.2.4.5 Експресија глутатион редуктазе у односу на градус тумора	61
4.2.4.6 Експресија глутатион трансферазе у односу на градус тумора.....	62
4.2.5 Експресија ензима антиоксидативне заштите у ткиву бубрега у односу на стадијум тумора.....	64
4.2.5.1 Експресија бакар цинк супероксид дисмутазе у односу на стадијум тумора	64
4.2.5.2 Експресија манган супероксид дисмутазе у односу на стадијум тумора	65
4.2.5.3 Експресија каталазе у односу на стадијум тумора.....	67
4.2.5.4 Експресија глутатион пероксидазе у односу на стадијум тумора....	68
4.2.5.5 Експресија глутатион редуктазе у односу на стадијум тумора	70
4.2.5.6 Експресија глутатион трансферазе у односу на стадијум тумора....	71
4.2.6 Експресија Nrf2 у односу на градус тумора	73
4.2.7 Експресија Nrf2 у односу на стадијум тумора	74
4.2.8 Експресија Keap1 у односу на градус тумора	75
4.2.9 Експресија Keap1 у односу на стадијум тумора	76
4.3 УТИЦАЈ ПАРАМЕТАРА АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ И ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ НА УКУПНО ПРЕЖИВЉАВАЉЕ ПАЦИЈЕНАТА	77
4.3.1 Опште одлике пацијената од којих је узорковано ткиво.....	78
4.3.2 Утицај активности антиоксидативних ензима, концентрације глутатиона и малондиалдехида на укупно преживљавање пацијената	79
4.3.3 Утицај клиничко-патолошких одлика на преживљавање пацијената.....	87
4.3.4 Предикциони потенцијал антиоксидативних параметара.....	93
5. ДИСКУСИЈА	96

5.1 ПЕТОГОДИШЊЕ ПРЕЖИВЉАВАЊЕ ПАЦИЈЕНАТА У ЗАВИСНОСТИ ОД КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИХ ОДЛИКА ТУМОРА.....	96
5.2 АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС ПАЦИЈЕНАТА ОБОЛЕЛИХ ОД ТУБУЛАРНОГ КАРЦИНОМА БУБРЕГА	101
5.2.1 Малигно ткиво бубрега је у стању оксидативног стреса и измењеног редокс баланса	103
5.2.2 Липидна пероксидација као молекуларни механизам неопластичних промена у бубрегу	106
5.2.3 Малигно ткиво бубрега се одликује измењним антиоксидативним статусом	108
5.3 ПЕТОГОДИШЊЕ ПРЕЖИВЉАВАЊЕ ПАЦИЈЕНАТА У ЗАВИСНОСТИ ОД АНТИОКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА	122
6. ЗАКЉУЧАК	125
7. ЛИТЕРАТУРА	132
8. БИОГРАФИЈА АУТОРА	163
9. ПРИЛОЗИ.....	164

1. УВОД

1.1 КАРЦИНОМ БУБРЕГА

Карцином бубрега представља велику и хетерогену групу малигних тумора који су према Међународној класификацији онколошких болести (енг. *International Classification of Diseases for Oncology, ICD-O*) [1] сврстани у категорије С64 и С65. Категорија С64 укључује злоћудне туморе бубрежног паренхима, док у категорију С65 спадају злоћудни тумори бубрежне карлице. У 2008. години је регистровано 271.000 оболелих [2] од карцинома бубрега док је 2012. године тај број износио 338.000 оболелих широм света [3]. Ово указује на тренд повећања инциденце и ставља карцином бубрега на девето место по учесталости међу мушкарцима, а на четрнаесто место по учесталости код жена. У 2012. години је забележено 144.000 смртних случајева од карцинома бубрега што представља шеснаести најчешћи узрок смрти од канцера у свету [4].

1.1.1 Тубуларни карцином бубрега (Renal Cell Carcinoma)

Тубуларни карцином бубрега представља групу малигних промена на бубрегу, изузев бубрежне карлице и практично чини поменути категорију С64. Ово је хетерогена болест која укључује хистолошке ентитете са различитом етиологијом, морфологијом и исходом. Заједничко за све хистолошке подтипове је да углавном воде порекло од измењених епителних ћелија бубрежних каналића (тубула) па су од стране Светске здравствене организације (енг. *World Health Organization, WHO*) и Међународне агенције за истраживање рака (енг. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) обједињени под називом *renal cell carcinoma (RCC)* [5].

Тубуларни карцином бубрега (RCC) је асимптоматска болест коју одликује одсуство раних знакова упозорења, јер мали тумори не продукују готово никакве симптоме. Болест се често дијагностикује у тренутку када је карцином већ локално напредовао или су се јавиле удаљене метастазе. Симптоми

специфични за RCC се јављају као последица директног, локалног утицаја примарног тумора на бубрег и то су слабински бол, палпабилна маса у абдомену и крв у мокраћи (хематурија). Ова три симптома, тзв. тријада, се јављају код свега 10% пацијената [6]. Поред ових постоје и системски симптоми (паранеопластични) који не указују непосредно на карцином бубрега и присутни су код трећине пацијената са дијагностикованим RCC [7]. Због нејасне клиничке слике RCC се код половине пацијената открије случајно. Употребом нових техника, попут компјутеризоване томографије и ултразвука (ултрасонографије), повећан је број случајно откривених RCC [8], што доприноси бољој прогнози за пацијенте услед раног откривања. Упркос томе, није дошло до смањења морталитета, већ управо супротно [9]. Један од разлога је што и даље постоји недостатак објективних дијагностичких биомаркера и ефикасних терапеутика за третман оболелих од RCC [10]. Метастазе се могу јавити на било ком органу, а најчешће су метастазе паренхима плућа (код 50-60% пацијената са метастазама), јетре, костију и мозга [11]. У тренутку дијагностиковања RCC, трећина пацијената има метастазе што је повезано са веома лошом прогнозом.

1.1.1.1 Фактори ризика

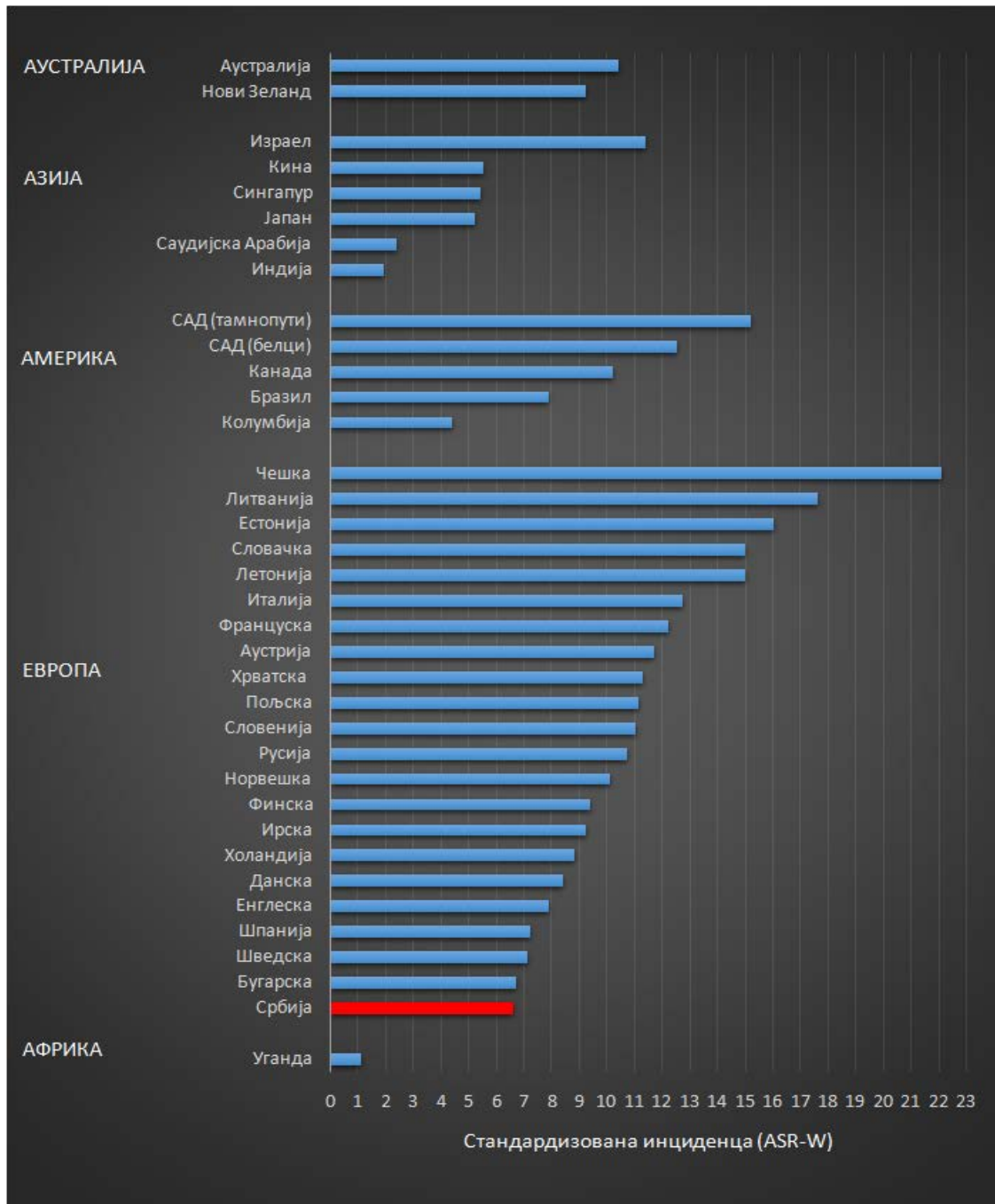
Међу факторима ризика за RCC доминирају средински фактори у односу на наследне. Опште прихваћени фактори ризика су пушење, мушки пол, хипертензија и гојазност [4]. Ово је болест старије доби и већина случајева (80%) укључује особе старије од 40 година [12], а врхунац инциденце је између шесте и седме деценије живота [13]. Према подацима Европског удружења за урологију, RCC се чешће јавља код мушкараца (1,5:1) [13] док неке студије говоре да је тај однос двоструко већи у корист мушког пола [14]. Пушење је један од фактора који носи највећи ризик за настанак тубуларног карцинома бубрега и за који је установљена дозна зависност код оба пола [15]. Изложеност дуванском диму није повезана само са настанком RCC већ и са прогресијом болести. Уочено је да активни и бивши пушачи имају 59%, односно 45% веће изгледе за узрапредовалу форму RCC у поређењу са непушачима [16]. Гојазне особе, нарочито жене, имају веће шансе за обољевање од RCC [17]. Инциденца за RCC код гојазних људи

(BMI >29 kg/m²) је двоструко већа у односу на нормално ухрањене особе, а за 50% већа у односу на оне са прекомерном телесном масом (BMI од 25-29 kg/m²) [5]. Исхрана намирницама богатим протеинима и мастима је позитивно корелисана са повећаним ризиком од настанка RCC [18] док повећан унос воћа и поврћа делује протективно [19]. Показана је негативна асоцијација између умереног конзумирања алкохола и ризика за развој RCC [20]. Међутим, није познато којим механизмима алкохол остварује протективни ефекат. Повишен крвни притисак (хипертензија) је идентификован као независни фактор ризика од настанка RCC [21]. Особе са хипертензијом имају до 2,5 пута већи ризик од настанака RCC [22] у поређењу са онима код којих је крвни притисак у физиолошким границама. Занимљиво је да хипертензија може имати улогу биомаркера који указује на успешан третман узнапредовалих форми RCC. Појава хипертензије услед третмана антиангиогеним лековима (бевацизумаб, сунитиниб, сорафениб и др.) је у вези са побољшаним исходом код пацијената са RCC [23]. Међутим, хипертензија није неопходна за успешан третман већ је нежељени ефекат лека који може имати својство потенцијалног биомаркера. Бројне студије су показале да се одређена занимања могу повезати са малигним болестима бубрега услед излагања појединаца хемијским једињењима за које је утврђено или се претпоставља да поседују канцерогена својства. На основу истраживања спроведеног у Немачкој [24] уочен је повишен ризик за настанак RCC код радника у хемијској, штампарској и индустрији гуме услед излагања органским растварачима док су *Пукала и сар. (1998)* [25] указали на повећан број оболелих од RCC међу радницима у нафтној индустрији. Поред бројних студија које су се бавиле проценом ризика за настанак RCC код одређених занимања ипак преовладава став да RCC није довољно корелисан са ризиком везаним за радно место. Разлог за то су међусобно опречни подаци добијени у различитим студијама који онемогућавају извођење релевантних закључака. Између 2-4% RCC има наследну основу и најчешће су у вези са фон Хипел-Линдау синдромом (енг. *von Hippel-Lindau syndrome*). Оболели од овог синдрома имају снажну предиспозицију ка билатералним RCC светлоћелијског подтипа који настају у просеку око 37. године живота и склони су развоју метастаза нарочито ако

величина тумора пређе 3 cm [26]. У основи ове болести је мутација на *VHL* тумор супресор гену који се налази на трећем хромозому (3p25-26).

1.1.1.2 Епидемиологија

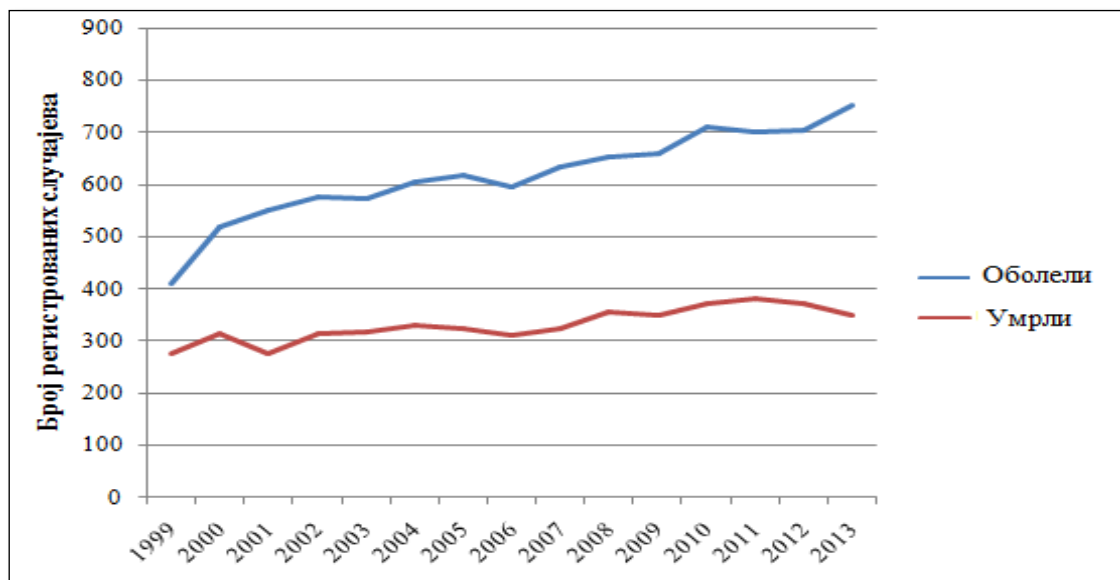
Међу бројним групама злоћудних тумора бубрега RCC се издваја по својој учесталости и стопи морталитета. Он чини 90% свих неопластичних промена бубрега код одраслих особа оба пола због чега се у литератури често повлачи знак једнакости између термина карцином бубрега и RCC. Инциденца RCC показује просторну и временску варијабилност. У последње две деценије широм света је забележен константан годишњи раст инциденце RCC од 2% [13], али се удео овог карцинома у укупној инциденци малигних болести није значајније мењао. Пораст стопе инциденце је регистрован у Северној Америци и неким деловима Европе [27], са изузетком Финске и Естоније [4]. Највеће стопе обољевања и умирања од RCC су забележене у развијеним земљама, доброг социо-економског статуса. Код мушкараца, стандардизована стопа обољевања већа од 15/100.000 је забележена међу тамнопутном популацијом у САД, затим у балтичким земљама и Чешкој. Умерене стопе обољевања (<15/100.000) су регистроване у западној Европи, Новом Зеланду, Аустралији, Канади и међу белом популацијом у САД. Значајно ниже стопе обољевања присутне су у Јужној Америци (<5/100.000), а најниже (<2/100.000) у Азији и Африци (**Слика 1**) [4]. Стопа морталитета прати географску дистрибуцију стопе обољевања код оба пола, али су вредности за женску популацију значајно ниже [28]. Ниже вредности инциденце и морталитета у слабије развијеним земљама Африке и Азије, према неким ауторима, не одражавају право стање на терену. Као разлог наводе недостатак напредних дијагностичких техника, њихову недовољну примену у општој популацији, као и непотпуне популационе регистре [29].



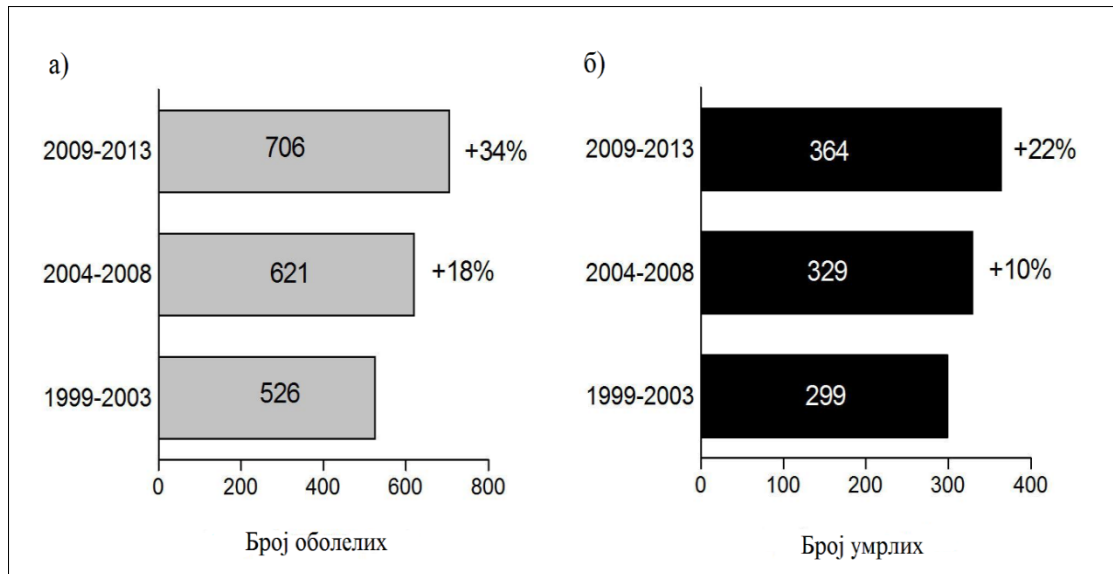
Слика 1. Учесталост тубуларног карцинома бубрега (RCC) код мушкараца на пет континената у периоду 2003-2007. Подаци о учесталости су приказани као стандардизована инциденца (енг. *age standardised rate-world, ASR-W*). ASR-W представља број регистрованих случајева у појединачној земљи узрасно стандардизован у односу на светску (стандардну) популацију и изражава се на 100.000 становника стандардне популације. Модификовано из *Знаор и сар. 2015* [4].

На основу базе података GLOBOCAN за 2012. годину, процењено је да ће до 2030. године у слабо и средње развијеним земљама инциденца од карцинома

бубрега пораста за 62%, а у развијеним и високо развијеним земљама за 39% [30]. Такође, постоји недостатак података о преживљавању пацијената у слабије развијеним земљама, укључујући Србију [4]. Србија спада у европске земље са релативно ниском стопом обољевања од RCC (6,6/100.000) [31]. У периоду од 1999. до 2013. године у Србији је дијагностиковано 9260 оболелих од RCC од којих је 4963 особа преминуло (53,6%). У овом петнаестогодишњем периоду је регистрован константан раст како обољевања, тако и смртности од ове болести (Слика 2). У поређењу са првим петогодишњим периодом (1999-2003), од 2004. до 2008. године је забележен пораст инциденце од RCC за 18%, док је у периоду од 2009. до 2013. године инциденца била већа за 34% (Слика 3а). Уколико се ова три периода упореде у погледу смртности, уочава се да је од 2004. до 2008. године морталитет већи за 10%, а у периоду од 2009. до 2013. године за 22% (Слика 3б) у односу на први петогодишњи период (1999-2003). Ови подаци указују да у Србији, као и у остатку света, постоји неповољан тренд пораста обољевања и смртности од тубуларног карцинома бубрега.



Слика 2. Општи тренд обољевања и смртности од тубуларног карцинома бубрега у Србији у периоду од 1999. до 2013. године.

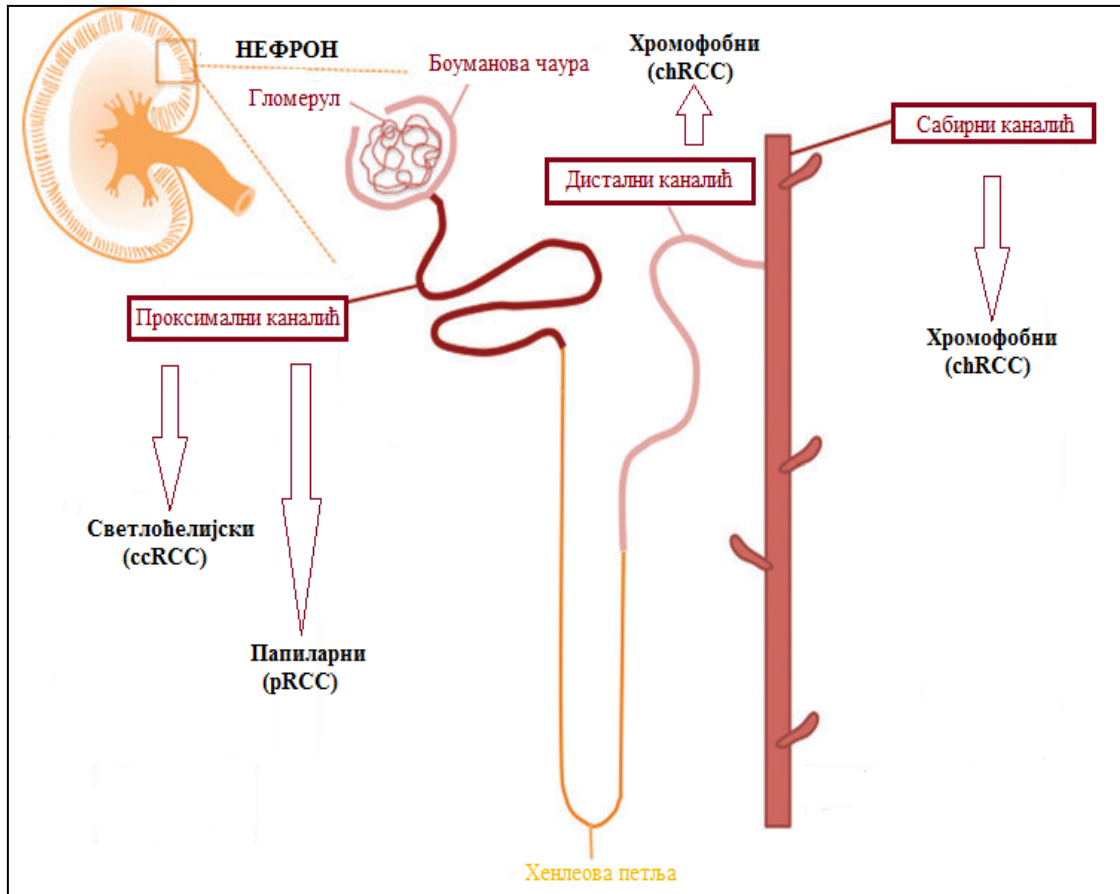


Слика 3. Петогодишње обољевање и смртност од тубуларног карцинома бубрега у Србији од 1999-2013. године. а) просечан број оболелих; б) просечан број умрлих.

1.1.1.3 Класификација и основне хистопатолошке одлике тубуларног карцинома бубрега

Тубуларни карцином бубрега представља групу хистолошки и генетички различитих канцера који су класификовани у неколико подтипова. У основи ове класификације су хистопатолошке одлике, етиологија и генетичке промене. Три најчешћа подтипа ове болести су светлоћелијски, папиларни и хромофобни RCC (Слика 4).

Светлоћелијски подтип (енг. *clear cell renal cell carcinoma, ccRCC*) је најчешћи облик ове болести дијагностификован код 70% пацијената. Настаје од измењених епителијалних ћелија проксималних тубула. Одликују га добра прокрвљеност туморског ткива и ћелије са бистром цитоплазмом која је резултат акумулације гликогена и липида [32]. Два пута је учесталији код мушкараца него код жена и у 96% случајева се ради о спорадичним туморима [6]. Метастазе, најчешће у плућима, су одлика ccRCC. Међутим, није реткост да се метастазе јаве на неубичајеним местима за RCC попут панкреаса или коже [7].



Слика 4. Шематски приказ грађе нефрона. Стрелице означавају анатомске делове нефрона од којих потичу три најчешће подтипа тубуларног карцинома бубрега (RCC). Модификовано из Шанмунгасундарам и Блок (2016) [33].

Најзначајнији хистопатолошки параметри за прогнозу исхода ccRCC су градус и стадијум. Градус је параметар који показује степен диференцираности малигног тумора тј. у којој мери малигне ћелије одступају од здравих од којих потичу. Одређивање градуса је засновано на изгледу и величини једра као и на неправилности и видљивости једарцета у малигним ћелијама. Ово је основа Фурмановог система за одређивање градуса RCC [34] који се највише користи у патологији. Последњих година се сугерише употреба нешто једноставнијег система базираног само на морфологији нуклеолуса [35]. Тумори се градирају од I до IV. Диференцирани тумори су они нижег градуса (I-II), а недиференцирани тумори су агресивнији и имају виши градус (III-IV). Светлоћелијски RCC нижег градуса имају значајно бољи исход у односу на ccRCC вишег градуса. Стадијум тумора је сложен патолошки параметар који укључује информације о величини

тумора, његовој локацији и инвазивности. У клиничкој и научној пракси користи се TNM (енг. *tumor-node-metastasis*) систем одређивања стадијума [36].

Папиларни подтип (енг. *papillary renal cell carcinoma, pRCC*) као и светлоћелијски настаје од епитела проксималних тубула. То су често билатерални тумори које одликује папиларна или тубулопапиларна структура, крварење и некротични делови услед слабе прокрвљености туморског ткива. Учесталији је код мушког пола, а болест се манифестује између 52. и 66. године живота [5]. Други је по учесталости од свих карцинома бубрега и учествује са 10-15% у укупној инциденци. Карактерише га и значајно бољи исход у односу на светлоћелијски [37]. Постоје два јасно дефинисана морфолошка типа pRCC, тип 1 и тип 2. Тип 1 је нижег градуса и одликују га ћелије оскудне светле цитоплазме, распоређене у једном слоју уз базалну мембрану папила. Тип 2 је учесталији и чини га неколико слојева ћелија вишег нуклеусног градуса, волуминозне еозинофилне цитоплазме и псеудостратификованог нуклеуса [38]. У поређењу са типом 1, тип 2 је агресивнији, вишег градуса и степена и има неповољнији исход. Подаци показују да петогодишње преживљавање за тип 1 износи 95%, а за тип 2 66% [39].

Хромофобни подтип (енг. *chromophobe renal cell carcinoma, chRCC*) је трећи по учесталости у општој популацији и настаје у дисталном нефрону од интеркаларних ћелија које граде завршни део дисталних тубула и кортикалне сабирне каналиће. Присутан је код 5% оболелих и манифестује се најчешће у шестој деценији живота подједнако код оба пола. Одликују га крупне полигоналне ћелије, прозирне цитоплазме са јасно истакнутим мембранама. Крвни судови су задебљалих зидова и ексцентрично хијалинизирани [5]. Ово је хетерогена група која укључује класичан, еозинофилни и сакроматоидни фенотип. Саркоматоидни фенотип се одликује агресивним растом и развојем метастаза [5]. Хромофобни RCC су углавном солитарни тумори нижег степена и градуса ограничени на бубрег. У 10% случајева тумор се шири изван бубрежне капсуле, а у свега 4% случајева захвата реналне вене [40]. Забележни су ретки случајеви метастаза на јетри, плућима и панкреасу [5]. Готово 90% пацијената преживи пет година након операције што је значајно боље у поређењу са ccRCC [37, 41]. Хромофобни RCC може бити спорадичан или повезан са наследним BHD (енг. *Birt-Hogg-Dube*) синдромом. Промене на *BHD* гену (17p11.2), који кодира протеин

фоликулин, стварају предиспозицију за настанак ове болести. Овај синдром се одликује развојем кожних бенигнух тумора, али се код значајног броја оболелих јављају и реналне неоплазије. Најчешће је у питању хибридни тумор који поседује зоне хромофобног морфотипа и зоне са онкоцитомом. У 35% случајева развија се само chRCC [42].

Поред три најчешћа подтипа, у RCC спада још читав низ хистолошки дефинисаних ентитета [36] који заједно чине мање од 5% дијагностикованих случајева.

1.1.1.4 Молекулска основа тубуларног карцинома бубрега

Тубуларни карцином бубрега показује велику хетерогеност на цитолошком и хистолошком нивоу. Ова особина је још израженија на генетичком и молекулском нивоу па није једноставно утврдити општи образац молекулских промена који је заједнички за све или за већину RCC. Треба истаћи да још увек недостаје поуздан узрочни агенс RCC, али постојећи докази указују на хромозомске аномалије које доприносе његовом развоју [43]. Већ је било речи о променама на *VHL* гену које су одлика наследних облика ccRCC. Међутим, инактивација овог гена услед мутација, губитка хетерозиготности или епигенетских модификација је присутна код готово 90% спорадичних ccRCC. Због своје заступљености у великом броју случајева ccRCC, промене на *VHL* се сматрају иницијалним догађајем у процесу настанка ових тумора [44]. Резултат инактивације *VHL* је повећана експресија HIF (енг. *hypoxia-inducible factor*) протеина у туморима што резултира промоцијом ангиогенезе, чиме се решава проблем снабдевања кисеоником и хранљивим материјама. Ово је од посебног значаја за брзорастуће туморске ћелије које се непрестано деле. Занимљиво је да након успостављања крвотка и стабилног снабдевања кисеоником не долази до промене у експресији HIF протеина већ је туморско ткиво у стању тзв. псеудохипоксије [45]. Путем конститутивне експресије HIF-1 α и HIF-2 α регулисани су фактори раста, глукозни транспортери и онкогени што доприноси расту и преживљавању малигнух ћелија. HIF сигнализација се одвија преко mTOR (енг. *mammalian target of rapamycin*) пута што је искоришћено у развоју

терапеутика попут еверолимуса и темзеролимуса који инхибирају овај молекулски комплекс [46]. Мутације и епигенетске промене *VHL* гена су најзаступљенија одлика ccRCC и нису карактеристичне за остала два подтипа. Промене на *PBRM1* гену су регистроване у 41% случајева ccRCC [47]. *PBRM1* има улогу инхибитора ћелијске пролиферације па су мутације на овом гену у вези са узнатредовалим облицима болести и лошом прогнозом [48]. Поред *VHL*, идентификоване су промене на другим тумор супресор генима попут *TP53*, *RB*, *PTEN*, али су оне присутне код значајно мањег броја ccRCC [6].

Можда се хетерогеност тубуларног карцинома бубрега највише истиче у случају pRCC. Бројне студије су показале да у основи два хистолошка типа pRCC леже генетичке промене специфичне за сваки од њих. Најучесталије промене код pRCC (тип 1) су оне на *MET* гену (80% свих pRCC) [49] који кодира HGF (енг. *hepatocyte growth factor*) тирозин киназни рецептор. Оне укључују активирајуће мутације као и дупликације на седмом хромозому где се овај ген налази [50]. Резултат ових промена је активација сигналног пута који доприноси расту тумора и ангиогенези. За тип 2 pRCC су карактеристичне мутације на хроматин-модификујућим генима (*PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*) као и повећана експресија Nrf2-ARE сигналног пута [51].

Хромофобни подтип RCC одликују хромозомске аберације, најчешће монозомије, које захватају хромозоме 1, 2, 6, 10, 13, 17 и 21 [42]. Соматске мутације су знатно ређе у поређењу са претходна два подтипа RCC. У 30% случајева, chRCC је праћен мутацијама на *TP53* тумор супресор гену у егзонима 5, 7 и 8 [52].

Поред промена на бројним генима, заједничко за већину RCC су метаболичке промене које се огледају у фаворизовању гликолизе у односу на оксидативну фосфорилацију (Варбургов ефекат) у циљу добијања АТФ-а. Малигне ћелије бубрега су зависне од глукозе због чега је у овим ћелијама детектована повећана експресија глукозног транспортера GLUT1 [53]. Метаболичко репрограмирање код ccRCC и pRCC је дириговано повећаном експресијом HIF- α које има за циљ редуковање потреба за кисеоником путем повећања гликолитичког флуksа и редуkcије оксидативне фосфорилације [54]. Повећана експресија HIF- α код ccRCC је омогућена стишавањем *VHL* гена док је

код pRCC последица накупљања фумарата и сукцината [46]. Нагомилавање фумарата и сукцината код pRCC је резултат скраћивања Кребсовог циклуса услед мутација на *FH* и *SDH* генима [55]. Нарушавање циклуса лимунске киселине је пристуно и код ccRCC и настаје као последица инхибиције пируват дехидрогеназе [54] чиме се нарушава пут оксидативне декарбоксилације пирувата и смањује расположивост ацетил-S-CoA. Абнормалне митохондрије су одлика chRCC што указује на њихову нарушену функционалност [56]. Све наведено представља само кратак преглед метаболичких промена које се дешавају у малигним ћелијама бубрега, али је довољно да се разуме зашто се RCC у савременој науци све више посматра као метаболичка болест.

1.2 ОКСИДАТИВНИ СТРЕС

За адекватно функционисање живих система услов је одржавање динамичке равнотеже метаболичких процеса што се у физиологији назива хомеостаза. Са аспекта редокс биологије то подразумева одржавање редукованог миљеа унутар ћелије који је заснован на балансу између прооксиданата и антиоксиданата. Нарушавање овог баланса у корист прооксиданата је основна дефиниција оксидативног стреса [57]. Свеприсутност кисеоника у живим системима има за последицу стварање реактивних кисеоникових врста (енг. *reactive oxygen species, ROS*) које представљају главне прооксиданте и узрочнике оксидативног стреса. ROS су молекули који у својој структури садрже кисеоник и одликују се већом реактивношћу него кисеоник у основном стању.

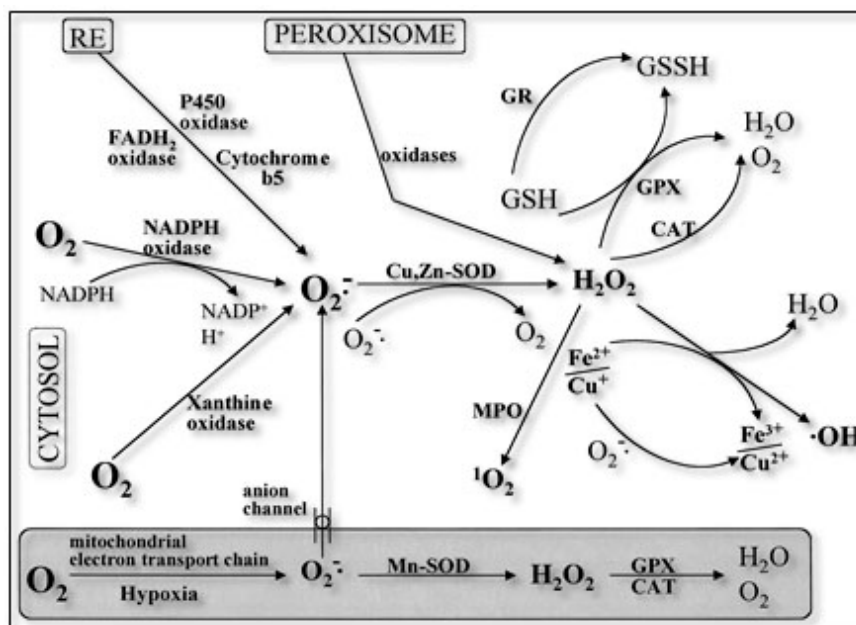
Са увећањем знања из области редокс биологије дошло је до прецизнијег дефинисања појма „оксидативни стрес“ и његове класификације засноване на скали интензитета оксидативног оптерећења [58]. Тако се данас под оксидативним стресом подразумева „дисбаланс између оксиданата и антиоксиданата у корист оксиданата који води нарушавању редокс контроле и сигнализације и/или оштећења молекула“ [59]. Такође, схватање улоге ROS-а у физиологији ћелије се променило па је данас познато да они имају физиолошку улогу у ћелијској сигнализацији, апоптози, аутофагији и др. ROS чине слободни радикали попут супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$), хидроксил радикала (OH^{\bullet}),

пероксил радикала (ROO•) и алкоксил радикала (RO•), али и нерадикалски молекули међу којима водоник пероксид (H₂O₂) има најзначајнију улогу у ћелијској сигнализацији [60]. Заједничко за све ROS је њихова реактивност и способност да реагују са макромолекулима попут нуклеинских киселина, протеина и липида што може узроковати иреверзибилне штетне промене у структури и функцији ћелија. За обављање физиолошких улога довољне су мале или умерене количине ROS. Њихово присуство у високим концентрацијама указује на промене у функционисању ћелија и може бити основа за настанак различитих патолошких стања [61]. Интеракција ROS са молекулима у ћелији може узроковати ланчану реакцију која води формирању нових (секундарних) радикала па на тај начин иницијална реакција прераста у читаву каскаду која има за последицу нарушавање структуре и функције макромолекула. Један од примера је липидна пероксидација (LPO) чији производи малондиалдеhid (MDA) и 4-хидрокси-2-ноненал (HNE) представљају релевантне маркере оштећења липида услед оксидативног стреса [62].

1.3 АНТИОКСИДАТИВНИ СИСТЕМ

Укључивање кисеоника у метаболичке процесе је допринело развоју вишећелијских организама. Ово је последица повећане ефикасности у производњи енергије у виду молекула АТФ за чак 15 пута [60]. Ова промена не би представљала еволутивну предност да аеробни организми нису развили ефикасан антиоксидативни систем (AOS) чија је улога одржавање концентрације ROS-а у физиолошким границама. AOS чине антиоксидативни ензими (AOE) и неензимски молекули способни да непосредно интерагују са ROS (Слика 5). Најзначајнији чиниоци одбране од штетног деловања слободних радикала и других реактивних молекула јесу AOE. У ову групу спадају супероксид дисмутазе, каталаза и глутатион пероксидазе [60]. Ови ензими својом каталитичком активношћу непосредно уклањају потенцијално штетне молекулске врсте попут O₂^{•-} и H₂O₂. Антиоксидативној одбрани на посредан начин доприносе глутатион редукатаза и глутатион трансферазе [63]. Поред ензима, постоји значајан број неензимских молекула који показују антиоксидативну активност. То

су глутатион, α -кето киселине, мелатонин, билирубин, мокраћна киселина и др. [64] Део антиоксиданата као што су аскорбинска киселина и токоферол се уносе храном. Овде је побројан значајнији део молекула који доприносе одржавању редокс равнотеже у ћелији и њихов број указује на значај контроле концентрације ROS у живим системима. Треба истаћи да само допремање кисеоника до ћелија представља извесну антиоксидативну заштиту. Наиме, кисеоник се код кичмењака и неких бескичмењака допрема путем крви везан за молекуле хемоглобина [65] и на тај начин је омогућена контрола његове дистрибуција до сваке ћелије.



Слика 5. Основни механизми антиоксидативне одбране у ћелији. Преузето из Meints *et al.* (1999) [61].

1.3.1 Супероксид дисмутаза

Супероксид дисмутаза (SOD) су фамилија металоензима који су присутни код еукариота и прокариота. Еукариоти имају три типа SOD и то су: бакар-цинк супероксид дисмутаза (CuZnSOD), манган супероксид дисмутаза (MnSOD) и екстрацелуларна супероксид дисмутаза (EC-SOD), која је по структури CuZnSOD [66]. Заједничко за све SOD је присуство метала у активном центру. Независно од

типа метала који се налази у активном месту, каталитичка функција ових ензима се одвија путем реакције дисмутације у којој се један исти молекул и оксидује и редукује. У случају SOD реакција дисмутације укључује два молекула $O_2^{\bullet-}$ од којих се један редукује до H_2O_2 , а други оксидује до O_2 . Биолошки смисао ове реакције је превођење реактивног $O_2^{\bullet-}$ у стабилније и мање реактивне молекулске облике. Још једна одлика ове ензимске фамилије је специфична локација сваког од три типа SOD. На овај начин је обезбеђена потпуна заштита ћелијских структура од штетног деловања $O_2^{\bullet-}$. Са аспекта хумане физиологије ово је посебно важно ако се има у виду да су SOD једини ензими у организму који уклањају $O_2^{\bullet-}$.

CuZnSOD (SOD1) је цитосолни ензим [67], отпоран на загревање, дејство протеиназа и денатурацију различитим реагенсима. У анималним ћелијама, осим у цитосолу, CuZnSOD је присутан и у нуклеусу. У лизозомима хепатоцита пацова је забележена највећа концентрација CuZnSOD, док је у Голџи комплексу и ендоплазматичном ретикулуму детектована немерљива количина овог ензима [68]. Идентична форма оној у цитосолу је присутна и у интермембранском простору митохондрија [69]. Хумана CuZnSOD је хомодимер и свака субјединица садржи 153 аминокиселине [70] као и метале Cu(II) и Zn(II). Каталитичка функција ензима је везана за Cu(II) због чега га није могуће заменити неким другим прелазним металом. Улога Zn(II) је структурна [66] и он не учествује у дисмутацији $O_2^{\bullet-}$. Ген за хуману CuZnSOD (*SOD1*) се налази на 21. хромозому и његова експресија може бити модификована под утицајем механичких, биолошких и хемијских фактора као што су зрачење, тешки метали, озон, водоник пероксид и др. [71]. На промотору *SOD1* се налазе везујућа места за више транскрипционих фактора (Sp1, AP1, AP2, NF-κB) [71] чија је активност у вези са оксидативном стресом. Активност CuZnSOD није регулисана само експресијом *SOD1* већ зависи и од адекватног допремања јона бакра, што је регулисано од стране CCS (енг. *copper chaperone for superoxide dismutase*). Ово представља главни посттранслациони механизам регулације активности CuZnSOD. „Knock-out“ мишеви за шапероне бакра (*CCS^{-/-}*) имају смањену активност CuZnSOD у мозгу, јетри и бубрезима у односу на *WT*, али непромењен ниво SOD1 протеина [72].

Смањена активост CuZnSOD је повезана са малигним и неуродегенеративним болестима и доприноси скраћењу животног века [73]. Амиотрофична латерална склероза (ALS) је неуродегенеративна болест која се сматра патологијом узрокованом дисфункцијом CuZnSOD [74]. Наиме, код оболелих од ALS су регистроване мутације на *SOD1* гену што резултира нарушеном функционалношћу услед погрешног увијања протеина и формирања агрегата са важним ћелијским протеинима као што су митохондријални електрон транспортери [75]. Наравно, не може се искључити утицај оксидативног оштећења услед смањене ензимске активности.

MnSOD (SOD2) је веома заступљена у живом свету. Поседују је бактерије, квасци, биљке и животиње. У животињским ћелијама, укључујући и хумане, MnSOD је лоцирана у митохондријама са изузетком плаве крабе (*Callinectes sapidus*) код које се овај ензим налази и у цитосолу [76]. У погледу структуре MnSOD, постоје извесне разлике између виших и нижих организама. Код виших организама овај ензим има четири субјединице са Mn(III) у активном центру док је код већина бактерија присутан у форми димера [60]. У хуманим ћелијама MnSOD је хомотетрамер молекулске масе 96 kD. Постоји значајан ниво хомологије у примарној структури између MnSOD у хуманој јетри и оне у *Escherichia coli* (40,9%) и *Saccharomyces cerevisiae* (43,3%) [77]. Ови подаци, као и доминантно присуство MnSOD у митохондријама, иду у прилог ендосимбиотској теорији настанка митохондрија [78, 79].

Због митохондријалне дистрибуције, разумљиво је да је највећа активност хумане MnSOD измерена у метаболички активним органима као што су јетра (2260 U/g влажне материје) и бубрези (1510 U/g влажне материје) [80]. Експресија *SOD2* гена (6q25.3) је високо регулисана од стране транскрипционих фактора (NFκB, NF1) и цитокина (IL-1, IL-4, TNF-α) који повећавају његову експресију [71]. Метилација специфичних секвенци у зони интрона је главни механизам који умањује *SOD2* експресију у ћелијама канцера [81]. *SOD2* експресија је регулисана и посттранскрипционим модификацијама (нитрозилација и ацетилација) [82]. MnSOD је један од пет АОЕ за које је показано да су неопходни за аеробни живот. Управо из овог разлога је MnSOD интензивно проучавана у вези са различитим хуманим патологијама. Тако је полиморфизам на

кодону 16 који резултира заменом аланина валином у примарној структури MnSOD у вези са повећаним ризиком за настанак карцинома плућа и панкреаса [83, 84]. Основна претпоставка је да оксидативни стрес, настао као последица смањене активности MnSOD, има значајну улогу у канцерогенези што указује на тумор-супресивну улогу овог ензима. Дисфункција MnSOD је, такође, показана код различитих неуродегенеративних болести попут Алцхајмерове и Паркинсонове болести и шлога [85].

EC-SOD (SOD3) је последњи откривени ензим из фамилије SOD. Првобитно је изолован из хуманих плућа и утврђено је да се ради о гликопротеину молекулске тежине 135 kD који је тетрамер [80]. За разлику од претходна два ензима, примарно место деловања EC-SOD је екстрацелуларни матрикс. Хумана EC-SOD је присутна у телесним течностима (плазми, лимфи и синувијалној течности) где је носилац АО одбране [61]. Попут SOD1, EC-SOD у свом активном месту садржи Cu(II) и Zn(II) и на исти начин катализује реакцију дисмутације $O_2^{\bullet -}$. Трансгени мишеви са прекомерном експресијом EC-SOD испољавају повећану осетљивост ЦНС-а на токсично деловање кисеоника, јер је услед смањене концентрације $O_2^{\bullet -}$ онемогућена његова инактивација штетних ефеката азот оксида [86]. Насупрот томе, повећана активност EC-SOD доприноси заштити плућа од радијације [87].

1.3.2 Каталаза

Каталаза (CAT) је ензим од великог значаја за заштиту ћелија од токсичних ефеката H_2O_2 . Иако је настала као резултат еволуције у аеробним условима, CAT имају и неки анаероби попут паразитске бактерије *Bacteroides fragilis*, којој омогућава преживљавање у оксигенисаном ткиву домаћина до успостављања адекватних анаеробних услова [88]. Хумана CAT је тетрамерни протеин молекулске масе 244 kD кога чине четири идентичне субјединице, четири хем групе и четири NADPH молекула [89]. Физиолошка улога CAT је дисмутација два молекула H_2O_2 које преводи у воду и кисеоник. У животињским и биљним ћелијама активност CAT је углавном локализована у пероксизомима [90], док је у еритроцитима присутна у цитосолу. CAT се налази у већини органа, али је јетра место њене највеће концентрације и активности. CAT није присутна у ендотелним

ћелијама и ћелијама глатких мишића крвних судова [91]. То је веома потентан ензим који није могуће заситити супстратом због велике брзине уклањања H_2O_2 [60]. Ген за хуману CAT се налази на хромозому 11 (11p13). Мутације на овом гену могу узроковати појаву акаталасемије (Такахара болест), која настаје услед делеције на егзону 4 [92]. Ову болест карактерише одсуство уочљивих симптома изузев, у неким случајевима, појаве оралних инфекција. Поред тога, мутације на CAT гену су се показале значајним у патологији дијабетеса типа 2 [92]. Повећана експресија CAT има неуропротективан ефекат [93], позитивно утиче на просторну меморију и учење и смањује симптоме анксиозности [94].

1.3.3 Глутатион пероксидазе

Глутатион пероксидазе (GPx) су ензимска фамилија коју чине молекули способни да катализују редукцију H_2O_2 до воде и редукцију органских пероксида до алкохола уз истовремено оксидовање глутатиона (GSH). GPx фамилију чини осам ензима (GPx 1-8) који се грубо могу поделити у две групе. Прву групу, селен-зависних, GPx (1-4) чине ензими који у свом активном центру поседују селеноцистеин (Se-Cys), док група селен-независних GPx (5-8) у активном центру има само цистеин (Cys). Поред пероксидазне активности, заједничко за GPx је да су специфично дистрибуиране у ћелијама и ткивима и да користе GSH као донор водоникових атома. Se-зависне GPx су: **ћелијска (GPx1, cGPx)**, активна у цитосољу и митохондријама, **гастроинтестинална (GPx2, GI-GPx)**, **плазма (GPx3, pGPx)** и **фосфолипид хидропероксидна (GPx4, PHGPx)**, која се експримира у готово свим сисарским ћелијама [95]. GPx4 се разликује од остале три Se-зависне GPx по способности да, поред H_2O_2 , редукује и органске пероксиде, чак и пероксиде масних киселина и холестерола [96]. GPx4 је мономер за разлику од GPx (1-3) које су хомотетрамери. Мала величина и хидрофобна површина доприноси способности GPx4 да реагује са сложеним мембранским липидима [95]. Код пацова који су храњени храном без селена долази до пада активности свих GPx, али различитом брзином [97]. Ови резултати су указали на то да код Se-зависних GPx постоји хијерахија у погледу снабдевања селеном. Прва у тој хијерархији је GPx2, следе GPx4, GPx3, док је GPx1 последња [98].

Функција Se-зависних GPx је регулисана транскрипцијом одговарајућих гена, али зависи и од расположивости селена и GSH. Основна улога ових ензима је антиоксидативна, али имају и антиинфламаторну, антиапоптоску и пролиферативну функцију [98]. Међутим, ове функције GPx могу имати негативан ефекат код оболелих од малигих болести, јер делују протективно у трансформисаним ћелијама доприносећи канцерогенези [99, 100].

Експресија Se-независних GPx такође је специфична за одређена ткива и ћелијске структуре. GPx5 се експримира у пасеменику (лат. *epididymis*), [98], GPx6 у олфакторном епителу, док су GPx7 и GPx8 пероксидазе ендоплазматичног ретикулума [101]. Основна одлика ових ензима је значајано мања пероксидазна активност у поређењу са Se-зависним GPx. GPx5 има улогу у фертилитету код јединки мушког пола [102]. Новија истраживања указују да GPx7 има улогу сензора за оксидативни стрес и ERS (енг. *endoplasmic reticulum stress*), док GPx8 редукује протеине ендоплазматичног ретикулума и на тај начин спречава „цурење“ H₂O₂ [103]. Улога GPx6, која је у хуманим ћелијама селенопротеин, је и даље непозната.

1.3.4 Глутатион редуктаза

У процесу редукције H₂O₂ коју катализују GPx, GSH се оксидује до глутатион дисулфида (GSSG). За његово враћање у редуковани облик задужен је ензим глутатион редуктаза (GR). Овај ензим је, уз ензиме синтезе GSH, кључан за одржавање оптималне концентрације овог трипептида како у цитосолу, тако и у ћелијским органелама [104]. Активност GR је најинтензивнија тамо где се стварају ROS. Стога је овај ензим најзаступљенији у цитосолу, митохондријама и једру [104]. GR је димер који у свакој субјединици садржи молекулу FAD и користи NADPH као дозор електрона [105]. Главни извор NADPH је пут пентозофосфата на чији интензитет утиче активности GR [90]. У процесу редукције GSSG мења се однос NADPH/NADP⁺ у корист оксидоване форме што има за последицу повећану активност ензима пентозофосфатног пута, као што је G6PDH (глукозо-6-фосфат дехидрогеназа). С тога ћелије дефицитарне у G6PDH убрзано старе, што је узроковано оксидативним стресом [106]. Иако не показује

АО активност, GR је веома значајна за одржавање редокс статуса ћелија, јер омогућава рециклирање GSH и тако га чини расположивим за АО ензиме и непосредну реакцију са ROS.

1.3.5 Глутатион трансферазе

Глутатион трансферазе (GST) су ензимска суперфамилија коју чине три протеинске фамилије специфично дистрибуиране у ћелији. Прву фамилију, цитосолних GST, чини седам ензимских класа (алфа-А, ми-М, пи-Р, омега-О, зета-Z, сигма-S и тета-T) [107]. Друге две су митохондријалне GST означене као К (капа) и микрозомалне (MGST). Примарна улога ових ензима је детоксикација различитих једињења егзогеног (канцерогени, пестициди, лекови и др.) и ендогеног (продукти LPO) порекла [64] који се једним именом означавају као ксенобиотици. GST су део фазе II метаболизма ксенобиотика и катализују реакцију коњугације ксенобиотика са GSH [108]. Због своје улоге у елиминацији штетних материја из организма, јетра је нарочито богата овим ензимима. Појачана активност GST јетре услед прекомерне количине ксенобиотика води трошењу GSH што објашњава везу између интоксикације организма и оксидативног стреса [109]. GST доприносе АО заштити јер имају пероксидазну активност, али делују искључиво на органске пероксиде. На овај начин GST могу допринети спречавању липидне пероксидације [110]. Поред тога антиоксидативна активност GST је усмерена на ендогено продуковане ROS [111]. Веза између активности GST и малигних болести је предмет интензивних истраживања. GST, поред способности да елиминишу канцерогене, својом актиношћу могу да трансформишу одређена једињења која примарно немају канцерогено својство у форму која изазива промене на ДНК [112]. Прекомерна експресија GST се доводи у везу са резистенцијом тумора на хемиотерапију [113].

1.3.6 Глутатион

Глутатион (GSH) је трипептид (L- γ -глутамил-L-цистеинил-глицин) који се синтетише у цитосолу, где је место његове највеће концентрације (1-11 mM)

[114]. Сва сисарска ткива имају GSH, али је његова највећа концентрација у јетри из које се значајан део произведеног GSH транспортује у плазму и жуч [115]. Између 10-20% GSH се налази у митохондријама у које улази из цитосола активним транспортом на унутрашњој мембрани [60]. Опадање нивоа GSH у митохондријама резултира оксидативним стресом и апоптозом. Озбиљан пад у концентрацији GSH може да доведе до митохондријалне дисфункције и превођења апоптозе у некрозу [115]. Глутатион у ћелијама може бити присутан у редукованом и дисулфидном (GSSG) облику, што је једна од оксидованих форми GSH. GSH представља најзначајнији и назаступљенији неензимски антиоксидант чија АО активност произилази из његове способности да директно реагује са ROS и улоге кофактора у реакцијама АОЕ, на првом месту GPx. Реакције са ROS су споре, али могуће *in vivo* услед mM концентрације GSH у цитосолу која се одржава *de novo* синтезом, али и рециклирањем путем редукције GSSG од стране GR. Високој концентрацији GSH у цитосолу доприноси и одсуство ензима који га катаболише. Наиме, разградњу GSH катализује ензим γ -глутамил транспептидаза (γ -GGT) који се налази на плазма мембрани, али му је активни центар усмерен у међућелијски простор [60]. Треба истаћи да GSH може имати и прооксидативно дејство посебно када му концентрација превазиђе физиолошки ниво [64] јер у реакцијама са реактивним врстама може настати $O_2^{\cdot-}$. Његов кључни допринос АО заштити је путем учешћа у реакцијама које катализују GPx где има улогу донора електрона. Поред улоге у АО заштити, GSH доприноси детоксикацији, јер може спонтано коњуговати са ксенобиотицима који су електрофили или у реакцијама катализованим од стране GST [116].

Због својих бројних улога у метаболизму, варирање концентрације GSH је регистровано код различитих болести. Пад концентрације GSH може бити последица оксидативног стреса, али и смањене активносоти ензима за његову биосинтезу што се доводи у везу са шизофренијом, астмом и кардиоваскуларним болестима [115]. Неопластичне промене ткива су често праћене порастом концентрације GSH који се сматра једним од узрока отпорности тумора на лекове [117]. Ова сазнања су покренула истраживања у правцу развоја терапеутика који ће умањити цитопротективну улогу GSH у малигним ћелијама [118].

1.4 KEAP1/NRF2 СИСТЕМ

Keap1/Nrf2 систем се сматра најзначајнијим молекулским механизмом одбране организма од утицаја средине. Чине га два протеинска молекула који су изоловани и идентификовани деведесетих година прошлог века [119-121]. Nrf2 (енг. *NF-E2 related factor 2*) је транскрипциони фактор молекулске масе 66 kD који је део CNC (енг. *cap "n" collar*) протеинске фамилије регулатроних молекула. Примарну структуру хуманог Nrf2 чини 605 аминокиселина организованих у седам високо конзервативних Neh (енг. *Nrf2-ECH homology*) домена [122]. У базалним условима Nrf2 се синтетише у цитосолу, али је његова концентрација мала због релативно брзе протеолитичке разградње (полуживот <20 минута) [123]. Разградња Nrf2 је под контролом његовог инхибитора Keap1 (енг. *Kelch-like ECH-associated protein1*) који је цитосолни протеин и налази се углавном у перинуклеарној цитоплазми где је везан за актинске филаменте [124]. Специфична локација Keap1 и способност да задржи Nrf2 у цитосолу чини Keap1 својеврсном „молекулском браном“. Keap1 је богат тиол групама и састоји се од пет функционалних домена NTR (енг. *N-terminal domain*), ВТВ (енг. *broad complex/tramtrack/bric-a-brac*), IVR (енг. *intervening region*), DGR (енг. *double glycine-repeat*) и CTR (енг. *C-terminal domain*) [123]. У нормалним условима, два молекула Keap1 формирају хомодимер и преко својих DGR домена везују један молекул Nrf2 интеракцијом са DLG и ETG мотивима на Neh2 домену транскрипционог фактора. Истовремено, Keap1 хомодимер је везан за филаменте актина и на тај начин физички спречава траслокацију Nrf2 у једру. Keap1 преко ВТВ домена интерагује са Cul3/Rbx1 (енг. *cullin3/ring box protein1*) и формира Е3 лигазни комплекс у коме долази до убиквитинизације Nrf2 који се на тај начин означава и касније деградује од стране 26S протеазома [125].

Улога Keap1/Nrf2 система је посебно значајна у условима оксидативног и електрофилног стреса који могу бити изазвани ендогеним и егзогеним чиниоцима. Променом редокс статуса долази до модификација специфичних цистеинских остатака на Keap1 што има за последицу структурне промене у Е3 лигазном комплексу, ослобађање Nrf2, његову акумулацију у цитосолу и траслокацију у једру [123]. У нуклеусу, Nrf2 хетеродимеризује са sMAF (енг. *small musculo-aponeurotic fibrosarcoma*) протеинима и везује се за ARE (енг. *antioxidant response*

element) секвенцу циљаних гена и покреће њихову координисану експресију. Nrf2 преко ARE активира чак 1055 гена одговорних за ћелијску пролиферацију, АО заштиту, детоксикацију, сигнализацију, имуни одговор, ћелијски циклус и преживљавање [126]. У стресним условима Keap1 има улогу сензора док је Nrf2 ефектор који између осталих активира транскрипцију гена за ензиме фазе II детоксикације (GST) и ензиме АО одговора као што су Prx (пероксиредоксини) и HO (хем-оксигеназе) [127]. Основна улога Keap1/Nrf2 система је протективна што је показано на мишевима (*Nrf2*^{-/-}) код којих су регистрована већа оштећења на унутрашњим органима (бубрези, јетра, плућа) изазавана хемијским агенсима, као и повећана склоност ка настанку малигних болести и болести повезаних са оксидативним стресом [128].

Активност Keap1/Nrf2 система у малигним болестима представља актуелну истраживачку област због двоструке улоге коју овај молекулски пут има у процесу канцерогенезе. Повећана активност Nrf2 може да спречи настанак малигних промена посебно у раној фази канцерогенезе и на тај начин делује тумор-супресивно. Тако је показано да је повећан ризик од настанка карцинома плућа повезан са смањеном експресијом *NRF2* гена, посебно код пушача [129]. Међутим, код многих солидних тумора мутације на *NRF2* и *KEAP1* узрокују повећану активност Nrf2, што води напредовању тумора услед раста канцерских ћелија и повећане резистенције на хемиотерапију [130].

2. ЦИЉЕВИ

Иако обољевање од RCC чини свега 2% укупног морбидитета од малигнух болести, општи тренд је такав да се у будућности очекује константан пораст броја оболелих од ове болести. Третман узнатредовалих и метастатских облика RCC поред имунотерапије укључује и циљану терапију која је усмерена на спречавање ангиогенезе, ћелијског раста и пролиферације. Међутим, код локалних тумора хируршка интервенција у виду радикалне или парцијалне нефректомије често представља први и најефикаснији избор лечења. Имајући у виду да се у земљама у развоју, укључујући Србију, очекује значајан пораст обољевања од RCC, због чега ће се и број хируршких интервенција сразмерно повећавати, постоји јасна потреба за одређивањем и дефинисањем поузданих предикционих параметара на основу којих се може предвидети исход пацијената након нефректомије.

Бубрези су добро снабдевени кисеоником па су болести ових органа, укључујући и малигне, у блиској вези са оксидативним стресом. Полазећи од значаја оксидативног стреса у процесу канцерогенезе, анализа антиоксидативног статуса малигног ткива бубрега пацијената оболелих од RCC може да допринесе бољем разумевању молекуларних основа ове асимптоматске болести.

На основу свега наведеног дефинисана су три главна циља ове докторске дисертације:

- I Анализа утицаја клиничко-патолошких параметара на преживљавање пацијената оболелих од RCC;
- II Одређивање АО статуса пацијената оболелих од RCC;
- III Испитивање утицаја параметара АО статуса на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.

Како би били испуњени главни циљеви ове студије, одређени су следећи непосредни циљеви који укључују:

1. Ретроспективно прикупљање клиничко-патолошких података пацијената оболелих од RCC на основу којих ће се утврдити:

- корелација између хистолошког подтипа тумора и следећих параметара: пол и старост пацијената, величина тумора, нуклеарни градус, стадијум тумора;
 - да ли и на који начин клиничко-патолошки параметри утичу на укупно преживљавање пацијената;
 - да ли клиничко-патолошки параметри носе повећан ризик за неповољан исход (смрт) код пацијената са RCC;
 - предикциони потенцијал клиничко-патолошких параметара.
2. Одређивање следећих параметара оксидативног стреса и АО одбране у оболелом и здравом (контролоном) ткиву бубрега пацијената са RCC:
- прооксидативно-антиоксидативни баланс (PAB);
 - концентрација GSH;
 - концентрација MDA као параметра липидне пероксидације;
 - релативан ниво информационе РНК (енг. *messenger RNA*, *mRNA*) и протеина као и активност антиоксидативних ензима (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx, GR и GST);
 - ниво mRNA и протеина Nrf2 и његовог инхибитора Keap1.
3. Утврђивање да ли активност ензима АО одбране као и концентрација GSH и MDA утиче на укупно преживљавање пацијената са RCC и да ли неки од ових молекулских параметара има предикциони потенцијал.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 ОПШТЕ НАПОМЕНЕ

Ова студија је настала као резултат сарадње између Лабораторије за молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке „Винча“, Клинике за урологију Клиничког центра Србије и Института за патологију Медицинског факултета Универзитета у Београду. За потребе студије су ретроспективно прикупљени подаци о пацијентима, као и здраво и туморско ткиво бубрега, што је одобрено од стране Етичке комисије Медицинског факултета Универзитета у Београду одлуком од 18. марта 2011. године (број одлуке 29/III-14). Сви пацијенти од којих је узорковано ткиво су дали информисани пристанак.

3.2 ИНФОРМАЦИЈЕ О ПАЦИЈЕНТИМА

У студији преживљавања су коришћени ретроспективно прикупљени клиничко-патолошки подаци о 185 пацијената којима је у периоду од 2009. до 2013. године дијагностикован РСС. Пацијенти су хируршки третирани (парцијална или радикална нефректомија) на Клиници за урологију Клиничког центра Србије, а хистопатолошка анализа ткива бубрега је урађена од стране дежурног патолога Института за патологију Медицинског факултета, Универзитета у Београду. Хистолошки подтип и стадијум тумора је одређен у складу са WHO-IARC класификацијом тумора уринарног система из 2004. године [5], а градус тумора према Фурмановом систему [34].

Клиничко-патолошки подаци су укључивали: старост и пол пацијената као и величину, градус, стадијум и хистолошки подтип тумора. Подаци о преживљавању пацијената су добијени личним контактом са пацијентима током редовних прегледа или телефонским путем и прикупљани су на Клиници за урологију Клиничког центра Србије. Током студије није било могуће ретроспективно прикупити податке о смртном исходу пацијената насталом услед

RCC (енг. *disease-specific deaths*). Стога је догађај од интереса (енг. *endpoint event*) био смртни исход без обзира на узрок па је праћено укупно преживљавање пацијената (енг. *overall survival, OS*). Преживљавање пацијената у месецима је праћено у периоду од 5 година, односно, од дана операција до краја студије или до наступања смртог исхода. Пацијенти су праћени најмање 10 месеци, а неки до краја студије (60 месеци). Пацијенти који су изгубљени из евиденције током студије и они који су били живи на крају студије су цензурисани.

3.3 УЗИМАЊЕ УЗОРАКА ТКИВА БУБРЕГА

За део студије који је укључивао молекуларну анализу параметара антиоксидативне заштите као и њихов утицај на преживљавање није било могуће прикупити узорке здравог и туморског ткива свих 185 пацијената из следећих разлога: недовољно туморског ткива, недовољно здравог (контролног) ткива, пацијент није дао пристанак да ткиво узето за хистопатолошку анализу буде укључено у ову студију. Прикупљено је ткиво 95 пацијената оболелих од RCC који су хируршки третирани, углавном радикалном нефректомијом. Након уобичајене процедуре која укључује одстрањивање органа и хистопатолошки преглед од стране дежурног патолога (одређивање подтипа RCC, градуса и стадијума тумора), део туморског и здравог ткива бубрега је узоркован за потребе ове студије у чуван на -70°C до преузимања.

3.4 АНАЛИЗА УЗОРАКА

У Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију Института за нуклеарне науке „Винча“ је урађена припрема и анализа узорака према одговарајућим протоколима. Анализа узорака је укључивала одређивање нивоа PAB, концентрације GSH и MDA и активности следећих АО ензима: CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx, GR, GST. Такође, урађена је анализа експресије АО ензима и транскрипционог фактора Nrf2 и његовог инхибитора Keap1. Ово је укључивало одређивање релативног нивоа mRNA и протеина за CuZnSOD, MnSOD, CAT,

GPx, GR, GST, Nrf2 и Keap1 у здравом и туморском ткиву пацијената оболелих од RCC.

3.4.1 Припрема узорака здравог и туморског ткива бубрега

За потребе мерења ензимске активности и прооксидативно-антиоксидативног баланса (PAB) ткиво је, најпре, испирано сланим раствором (PBS) pH 7,4 ради уклањања крви након чега му је измерена маса. Узорци су хомогенизовани на леду у хладном фосфатном пуферу (0,05 M KH_2PO_4 , 0,0001 M EDTA, pH 7,4) употребом електричног хомогенизера ИКА® T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA Werke GmbH & Co.KG, Немачка). Однос масе ткива (g) и запремине пуфера (ml) је био 1:8 и хомогенизација је рађена на 25000 rpm, 15 секунди у 4 циклуса. Хомогенати су остављени преко ноћи на $-70\text{ }^\circ\text{C}$ ради додатног пуцања и таложења ћелијских мембрана. Сутрадан су отопљени хомогенати вортексовани 1 минут и центрифугирани 15 минута, на $10000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ (Eppendorf centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Немачка). Горњи слој је сакупљен и чуван на $-70\text{ }^\circ\text{C}$ до употребе. За потребе мерења концентрације GSH и укупног MDA узорци су припремани према протоколу произвођача комерцијалних китова.

Активност АО ензима је изражена у јединцама или милијединцама по милиграму протеина (U/mg или mU/mg).

3.4.1.1 Мерење концентрације укупних протеина

Концентрација протеина је измерена помоћу комерцијалног есеја Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, САД). Метода се заснива на комбинацији биуретске реакције и колориметријске детекције купро јона (Cu^{+1}) уз употребу реагенса који садржи бихинонску киселину (енг. *bicinchoninic acid*, BCA). Купри јон (Cu^{+2}) је редукован од стране протеина у узорку до Cu^{+1} у алкалном медијуму (биуретска реакција). Хелацијом два молекула BCA са једним Cu^{+1} настаје љубичасто обојени продукт који снажно апсорбује на 562 nm. За мерење концентрације протеина у здравом и туморском ткиву бубрега коришћен је протокол за мерење у киветама. Реагенси А и Б су

помешани у односу 50:1 како би се добио радни реагенс. У даљем поступку 100 μl узорка или стандарда (албумин) познате концентрације је помешано са 2 ml радног реагенса и инкубирано 30 минута на 37 °C. Након тога је на спектрофотометру (UV Line 9400, SI Analytics GmbH, Mainz, Немачка) измерена апсорбанца (562 nm) која је директно пропорционална концентрацији протеина. На основу апсорбанци стандарда познате концентрације формирана је стандардна крива помоћу које је израчуната концентрација протеина у узорцима. Концентрација протеина у узорцима је изражена као број милиграма протеина по милилитру узорка (mg/ml).

3.4.2 Мерење прооксидативно-анитоксидативног баланса

Одређивање нивоа PAB је урађено према методи *Аламдари и сар. (2007)* [132]. Овом методом се мери концентрација H_2O_2 у антиоксидативном окружењу. Хромоген (енг. 3,3',5,5'- *tetramethylbenzidine*, TMB) у реакционој смеши реагује и са антиоксидансом (мокраћна киселина) и са оксидансом (H_2O_2). TMB се редукује током реакције са мокраћном киселином у безбојно једињење, док катализована реакција са H_2O_2 даје плаво обојен производ који је последица оксидације TMB реагенса. Количина H_2O_2 се одређује спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на 620 или 570 nm. Поступак је детаљније описан у раду *Сахбари и сар. (2015)* [133]. PAB вредности су изражене у арбитрарним јединицама (НК) које представљају проценат H_2O_2 у стандардном раствору помножен са 6.

3.4.3 Мерење концентрације редукованог глутатиона

Концентрација укупног GSH је одређена помоћу есеја BIOXYTECH® GSH-420™ Assay (OXIS International, Inc., САД). Процедура је базирана на колориметријској реакцији у три корака. Оксидовани глутатион у узорку је најпре редукован помоћу редукујућег агенса, TCEP (енг. *Tris(2-carboxyethyl phosphine)*). У наредном кораку је додат хромоген (4-хлоро-1-метил-7-трифлуорометилкинолин метил сулфат) који реагује са тиолима у узорку и образује тиоетре. Трећи корак

подразумева додавање NaOH чиме се подиже рН вредност реакције изнад 13. То води настанку хромофорних тиона као резултат β -елиминације специфичне за GSH-тиоетре. Апсорбанца је мерена спектрофотометријски на 420 nm и директно је пропорционална концентрацији GSH која је изражена у наномолима по милиграму протеина (nmol/mg).

3.4.4 Мерење концентрације укупног малондиалдехида

Укупан MDA је измерен помоћу есеја BIOXYTECH® MDA-586™ Assay (OXIS International, Inc., САД). Протокол се заснива на хидролизи узорка у присуству бутилованог хидрокситолуена (енг. *butylated hydroxytoluene, BHT*) у киселој средини (рН 1-2) на 60°C, 80 минута. Након хидролизе, слободни MDA реагује са хромогеним реагенсом (енг. *N-methyl-2-phenylindole, NMPI*) 60 минута на 45 °C. Као резултат реакције настаје карбоцијанин боја која се детектује спектрофотометријски на 586 nm. Концентрација укупног MDA је израчуната на основу стандардне криве и изражена у наномолима по милиграму протеина (nmol/mg).

3.4.5 Мерење активности антиоксидативних ензима

3.4.5.1 Мерење активности супероксид дисмутаза

За мерење активности SOD је коришћен комерцијални есеј Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Company, САД). Метода је заснована на реакцији између $O_2^{\cdot-}$ (настаје активношћу ензима ксантин оксидазе) и тетразолијумове соли која резултира настанком формазан жуте боје. SOD инхибира ову реакцију дисмутацијом $O_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 . Интензитет формазан боје је мерен спектрофотометријски на 450 nm уз помоћ читача микроплоча (Wallac1420 Victor2, PerkinElmer Inc., САД) и обрнуто је пропорционалан активности SOD. Једна јединица активности SOD је дефинисана као количина ензима неопходна да изврши 50% дисмутације супероксид анјон радикала. Есеј омогућава мерење

активности CuZnSOD и MnSOD. У узорцима је најпре измерена укупна активност SOD, а затим је додат раствор калијум цијанида (8 mM KCN) којим је инхибирана активност CuZnSOD и измерена активност MnSOD. Активност CuZnSOD је добијена као разлика укупне активности SOD и активности MnSOD.

3.4.5.2 Мерење активности каталазе

Активност CAT је измерена према протоколу *Бојтлера и сар. (1984)* [131]. Метода је заснована на способности CAT да разгради водоник пероксид до воде и кисеоника у реакционој смеши. Реакциону смешу чине 50 μ l пуфера (1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0), 900 μ l супстрата (10 mM раствор H₂O₂) и 30 μ l дестиловане воде. Раствор H₂O₂ се припрема разблаживањем 30% H₂O₂, а његова тачна концентрација се одређује помоћу екстинкционог коефицијента који на 230 nm износи 0,071 mM⁻¹cm⁻¹. У зависности од броја узорка, припремљена је потребна количине реакционе смеше и остављена у воденом купатилу на 37 °C 10-15 минута. У кварцну кивету од 1 ml је додато 980 μ l реакционе смеше и 20 μ l узорка. Водоник пероксид апсорбује на 230 nm па је његова разградња праћена спектрофотометријски променом апсорбанце на сваких 30 секунди током 3 минута. Опсег средње вредности промене апсорбанце ΔA_{230} износи од 0,30-0,60. Једна јединица активности CAT је дефинисана као количина ензима која разгради 1 μ mol H₂O₂ у минути на температури од 37 °C и pH 8.

3.4.5.3 Мерење активности глутатион пероксидазе

Ензимска активност GPx је одређена помоћу есеја BIOXYTECH® GPx-340™ Assay (OXIS International, Inc., САД). Ово је индиректан начин мерења активности GPx. Процедура се заснива на редуковању органског пероксида (терц-бутил хидропероксид) до алкохола и воде. Као производ настаје GSSG који одмах бива редукован од стране GR до GSH уз оксидацију NADPH до NADP⁺. Реакција је праћена опадањем апсорбанце на 340 nm. Промена апсорбанце је измерена спектрофотометријски и директно је пропорционална активности GPx у узорку. Екстинкциони коефицијент за NADPH на 340 nm је 0,00622 μ M⁻¹cm⁻¹. Једна јединица активности GPx узрокује оксидацију 1 μ mol NADPH у минути на 25 °C.

3.4.5.4 Мерење активности глутатион редуктазе

За потребе мерења активности GR коришћен је есеј BIOXYTECH® GR-340™ Assay (OXIS International, Inc., САД). Метода користи катализовану редукцију GSSG до GSH праћену оксидацијом NADPH у NADP+. Промена оксидационог стања NADPH резултира опадањем апсорбанце на 340 nm током времена. Микромоларни екстинкциони коефицијент за NADPH на 340 nm је 0,00622 $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Једна јединица GR активности је количина ензима која катализује редукцију 1 μmol GSSG по минути на 25 °C.

3.4.5.5 Мерење активности глутатион трансферазе

Мерење активности GST је урађено помоћу есеја Glutathione S-Transferase Assay Kit (Cayman Chemical Company, САД). Метода је заснована на реакцији коњугације између 1-хлоро-2,1-динитробензена (енг. *1-chloro-2,1-dinitrobenzene*, CDNB) и GSH. Реакција је праћена порастом апсорбанце на 340 nm што је детектовано помоћу спектрофотометра (UV Line 9400, SI Analytics GmbH, Немачка). Екстинкциони коефицијент за CDNB на 340 nm износи 0,0096 $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Једна јединица GST катализује коњугацију 1 nmol CDNB са GSH по минути на температури од 25 °C.

3.4.6 Раздвајање протеина електрофорезом и имуноблот анализа

3.4.6.1 Припрема узорака за електрофорезу

Раздвајање протеина је урађено методом електрофорезе на полиакриламидном гелу који садржи 10% натријум додецил сулфата (енг. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Узорци здравог и туморског ткива бубрега, у којима је претходно одређена концентрација протеина, су разблажени фосфатним пуфером (0,05 M KH_2PO_4 , 0,0001 M EDTA, pH 7,4) тако

да је укупна концентрација протеина сведена на 3 $\mu\text{g/ml}$. Након тога, узорци су додатно разблажени SBL-пуфером (енг. *Sample Buffer Laemmli*, 0,5 М Tris-HCl pH 6,8, глицерол, SDS, 0,5% бромфенол плаво, β -меркаптоетанол и H_2O) у односу 1:2 па је укупна концентрација протеина у свим узорцима била 1 $\mu\text{g/ml}$. Протеини су денатурирани кувањем узорака 5 минута на 95 $^\circ\text{C}$ након чега су узорци чувани на -70 $^\circ\text{C}$ до употребе.

3.4.6.2 Електрофореза на полиакриламидном гелу

Гел за електрофорезу су чинили 5%-ни гел за концентровање протеина (0,5 М Tris-HCl pH 6,8, акриламид, бисакриламид, 10% SDS, 10% амонијум персулфат, TEMED, H_2O) и 12%-ни гел за раздвајање протеина (1,5 М Tris-HCl pH 8,8, акриламид, бисакриламид, 10% SDS, 10% амонијум персулфат, TEMED, H_2O). У бунариће на гелу је наносено 20 μl узорка као и протеински стандард познатих молекулских маса (PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, Литванија) на основу кога је извршена локализација циљаних протеина. Такође, у један бунар на сваком гелу је наносен и стандардни узорак који је служио као додатна контрола самог поступка. Електрофореза је рађена у пуферу (0,25 М Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS) на собној температури и напону од 100 V у трајању од 120 минута (Mini-PROTEAN[®] 3 Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., САД).

3.4.6.3 Трансфер протеина са гела на нитроцелулозну мембрану

После завршене електрофорезе, гел је одвојен од стаклене плоче и остављен у трансфер пуферу (25 mM Tris, 192 mM глицин, 20% метанол и H_2O) у трајању од 10 минута. У исти пуфер су потопљени филтер папири (Blot Absorbent Filter Paper, Bio-Rad Laboratories Inc., САД) и нитроцелулозна мембрана (Nitrocellulose Membrane 0,2 μm , Bio-Rad Laboratories Inc., САД). Од поменутих компоненти формиран је „сендвич“ за трансфер према следећем распореду: филтер папир, гел, мембрана, филтер папир који је затим окренут за 180 $^\circ$ и постављен на уређај за полусуви трансфер (Trans-Blot Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., САД). На овај начин гел са протеинима је био ближи катоди, а мембрана је

била ближа аноди чиме је омогућено да се негативно наелектрисани протеини крећу у правцу позитивно наелектрисане аноде и вежу за нитроцелулозну мембрану. Трансфер је урађен при следећим параметрима: напон 10 V, струја од 0,32 A у трајању од 22 минута.

3.4.6.4 Имуноблот (Western blot) анализа

Мембрана је, након трансфера, испирана у TBST-у сланом раствору (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05% Tween 20, H₂O) и инкубирана 90 минута у раствору за блокирање кога чини 1%-ни BSA (енг. *bovine serum albumin*) у TBST-у. После блокирања, мембрана је испирана у TBST-у 3 пута по 10 минута, а затим остављена у раствору примарног антитела (**Табела 1**) у TBST-у на 4 °C током ноћи. Сутрадан је мембрана испирана TBST пуфером, а након тога инкубирана 120 минута у одговарајућем секундарном антителу коњугованом са пероксидазом рена (енг. *horseradish peroxidase, HRP*) (*mouse anti-rabbit IgG-HRP*, sc-2357, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Хајделберг Немачка, разблажење 1:5000; *sheep anti-mouse IgG-HRP*, Amersham ECLTM Western Blotting Analysis System, разблажење 1:5000). Надаље је мембрана још једном испирана (3 пута по 10 минута), а затим изложена раствору за детекцију хемилуминесценције. Овај раствор чине раствор А: 100 μ l луминола (250 mM) у диметил сулфоксиду (енг. *dimethyl sulfoxide, DMSO*), 44 μ l 90 mM *p*-кумаричне киселине у DMSO, 1 ml Tris-HCl pH 8,5 и 8856 μ l H₂O; раствор Б: 25 μ l 30% H₂O₂, 1 ml Tris-HCl pH 8,5 и 8975 μ l H₂O. Раствори А и Б су помешани у једнаким запреминама и добијеном смешом је преливена мембрана и инкубирана 2 минута у мрачној соби. Након тога, мембрана је пребачена на картонски носач који је затим постављен између две провидне фолије како се мембрана не би осушила. Преко фолије је стављен рентгенски филм (Primax Berlin GmbH, Немачка) и све је заједно затворено у касету за експозицију (Hypercassette, Amersham, Велика Британија). Експозиција филма је трајала 5 минута након чега је развијен помоћу развијача разблаженог 8 пута (Eukobrom Paper Developer, Tetenal, Немачка) и фиксира разблаженог 5 пута у дестилованој води (Superfix Plus, Tetenal, Немачка). Филм је, након сушења, скениран, а квантитативна вредност интензитета трака је одређена уз помоћ

софтвера „ImageJ” (National Institute of Health, САД). Добијене вредности интензитета трака циљаних протеина су нормализоване у односу на вредности интензитета трака за β -актин.

Табела 1. Примарна антитела коришћена за детекцију протеина имуноблот анализом. (#) антитело за β -актин је представљало контролу уједначености количине узорака који су наношени на полиакриламидни гел (енг. *loading control*).

Антитело	Домаћин	Разблажење	Идентификациони број	Произвођач
SOD1	зец	1:1200	ab-16831	Abcam, САД
SOD2	миш	1:2000	ab-16956	Abcam, САД
CAT	зец	1:600	ab-52477	Abcam, САД
GPx	зец	1:5000	ab-108427	Abcam, САД
GR	зец	1:1200	ab-16801	Abcam, САД
GSTA1	зец	1:3000	PA5-29811	ThermoFisher Scientific, САД
Keap1	миш	1:500	sc-365626	Santa Cruz, САД
Nrf2	миш	1:500	sc-365949	Santa Cruz, САД
# β -актин	миш	1:500	sc-47778	Santa Cruz, САД

3.4.7 Анализа експресије гена

3.4.7.1 Изолација РНК

Поступак изолације РНК се одвијао у три корака: хомогенизација, екстракција и изолација. Здраво и туморско ткиво бубрега је хомогенизовано у тризолу (TRI Reagent[®] Solution Ambion, САД) у односу масе и запремине 1:10, коришћењем хомогенизера IKA[®] T10 basic ULTRA-TURRAX[®] (IKA Werke GmbH & Co.KG, Немачка). Минимална маса ткива је била 70 mg. Хомогенату је након кратког стајања на собној температури (5 минута) додат хлороформ (-20 °C) ради екстракције (однос запремине хлороформа и тризола је био 1:5). Узорци су, затим, центрифугирани 15 минута на 12000×g и 4 °C. (Eppendorf centrifuge 5417R,

Erpendorf-Netheler-Hinz GmbH, Немачка) ради фазног раздвајања. Горња, водена, фаза у којој се налазила РНК је пребачена у посебне тубице. Изолација је подразумевала додавање изопропанола (-20 °C) воденој фази (однос запремина изопропанола и тризола је био 1:2) након чега је уследила инкубација 10 минута на собној температури и центрифугирање од 15 минута на 12000×g и 4 °C. Центрифугирањем је изолована РНК оборена на дно тубице. Исталожена РНК је ресуспендована у 1 ml 75% етанола (-20 °C) и након кратког мешања центрифугирана 5 минута на 12000×g и 4 °C. Исти поступак је поновљен уз коришћење 1 ml 95% етанола (-20 °C) и центрифугирање од 15 минута на 12000×g и 4 °C. Након одливања етанола талог је сушен 5 минута на собној температури, а затим растворен у води третираној диетилпиروкарбонатом (DEPC-H₂O).

Укупна концентрација изоловане РНК је одређена спектрофотометријски мерењем апсорбанце узорка на 260 nm (Nano Drop 1000, Thermo Fisher Scientific, САД).

3.4.7.2 Синтеза комплементарне ДНК

Синтеза комплементарне ДНК (cDNA) је урађена поступком реверзне транскрипције ланчане реакције полимеразе (енг. *reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR*) уз употребу комерцијалног кита (High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems, САД). У сваки бунар на микроплочи (MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, САД) је пипетирано 20 μl узорка (који садржи 2 μg РНК) и 20 μl реагенса (2 x RT master mix). Реверзна транскрипција је урађена према програму приказаном у **Табели 2.** на PCR апарату (Erpendorf Mastercycler ergradient S, Erpendorf, Немачка). Комплементарна ДНК је након синтезе чувана на -20 °C до употребе.

Табела 2. Програм реверзне транскрипције (RT-PCR) према протоколу прописаном од стране произвођача есеја (High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems, САД).

	Корак 1	Корак 2	Корак 3	Корак 4
Температура [°C]	25	37	85	4
Време [минути]	10	120	5	-

3.4.7.3 Квантификација експресије гена у реалном времену (RTq-PCR)

Квантитативна анализа експресије гена је урађена методом RTq-PCR (енг. *real-time polymerase chain reaction*). У поступку су коришћени комерцијални реагенси (TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, САД), и одговарајући есеји (ThermoFisher Scientific, САД; Табела 3) који садрже прајмере специфичне за анализиране гене и олигонуклеотидну пробу која на 5' и 3' крају носи флуоресцентне боје (репортер и акцептор флуоресценције).

У бунариће на микроплочи (MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, САД) је додато 12 μl смеше (10 μl мастер микс, 1 μl есеја за циљани ген, 1 μl DEPC- H_2O) и 8 μl узорка који је садржао 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ cDNA. Анализа генске експресије у трипликату је урађена на PCR апарату (Real Time PCR System 7500, Applied Biosystems, САД) према програму препорученом од стране произвођача мастер микса (Табела 4).

Табела 3. Комерцијални есеји коришћени за анализу експресије гена. (#) вр-базни парови (енг. *base pairs*); (##) PPIA референтни ген на основу кога су израчунате релативне вредности експресије анализираних гена.

Анализирани гени	Идентификациони број	Флуоресцентне боје на 5' и 3' крају пробе	Дужина ампликона (вр)#
<i>SOD1</i>	Hs00533490_m1	FAM-MGB	60
<i>SOD2</i>	Hs00167309_m1	FAM-MGB	67
<i>CAT</i>	Hs00156308_m1	FAM-MGB	68
<i>GPX1</i>	Hs00829989_gH	FAM-MGB	76
<i>GR</i>	Hs00167317_m1	FAM-MGB	63
<i>GSTA1</i>	Hs00275575_m1	FAM-MGB	69
<i>NRF2</i>	Hs00975961_g1	FAM-MGB	74
<i>KEAP1</i>	Hs00202227_m1	FAM-MGB	121
<i>PPIA##</i>	Hs04194521_s1	FAM-MGB	97
<i>TBP</i>	Hs00427620_m1	FAM-MGB	91

Табела 4. Програм RTq-PCR реакције према протоколу произвођача мастер микса (TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, САД).

	PCR (40 циклуса)			
	инкубација	активација ДНК полимеразе	денатурација	елонгација
Температура [$^{\circ}\text{C}$]	50	95	95	60
Време [s]	120	600	15	60

На основу литературе, гени за пептидилпролилну изомеразу А (енг. *peptidylprolyl isomerase A, PPIA*) и ТАТА везујући протеин (енг. *TATA box binding protein, TBP*) су идентификовани као потенцијали референтни гени (енг. *housekeeping genes*) за анализу генске експресије у узорцима карцинома бубрега [134-137]. Валидацијом на пробним узорцима нормалног и туморског ткива бубрега *PPIA* је показао стабилну експресију па је одабран као референтни ген који је истовремено амплификован са циљаним генима.

Релативне вредности експресије гена за АО ензиме, *NRF2* и *KEAP1* у туморском ткиву бубрега су изражене у односу на контролно (здро) ткиво уз претходну нормализацију на вредности експресије референтног гена (*PPIA*). Квантификација је урађена методом по Ливаку ($2^{-\Delta\Delta CT}$) [138].

3.5 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка анализа података је урађена помоћу софтвера SPSS 23.0 за Windows (SPSS Inc., САД) и GraphPad Prism 5.0 (САД). У студији преживљавања су за поређење квалитативних и квантитативних варијабли коришћени χ^2 -тест и тест анализе варијансе (ANOVA). Стопа преживљавања је израчуната помоћу Каплан-Мајер (енг. *Kaplan-Meier*) методе, а групе које су укључивале клиничко-патолошке и АО параметре су поређене употребом Log-Rank теста. За анализу независних фактора петогодишњег преживљавања коришћен је Коксов униваријантни и мултиваријантни регресиони модел пропорционалних ризика (енг. *Cox proportional hazards model*). Резултати добијени анализом молекулских параметара су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка. За њихову анализу су коришћени t-тест, Мен-Витни (енг. *Mann-Whitney*) и Вилкоксон (енг. *Wilcoxon*) тест. За све коришћене тестове је прихваћена статистичка значајност на нивоу од 5% ($p < 0,05$).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 СТУДИЈА ПРЕЖИВЉАВАЊА

4.1.1 Клиничко-патолошке одлике пацијената

Анализирану кохорту је чинило 185 пацијената оболелих од RCC и њихова дистрибуција према клиничко-патолошким одликама је приказана у **Табели 5**.

Просечна старост пацијената у време дијагнозе је била 61 година. Најстарији пацијент је имао 85 година, док је најмлађи имао 32 године. Највећи број испитаника (66,5%) је био старосне доби између 51-70 година. Однос полова је био у корист мушкараца који су чинили већину од 57,8%, док је жена било 42,2%. Величина тумора је била у распону од 0,2-22,2 cm, са просеком од 6 cm. Испитивани случајеви су на основу величине тумора сврстани у четири групе: тумори величине до 4 cm, тумори величине од 4,1-7 cm, тумори величине од 7,1-10 cm и тумори преко 10 cm. Код већине пацијената (67,6%) тумори су били величине до 7 cm.

На основу градуса, испитаници су сврстани у четири групе. Највећи број случајева су чинили тумори II (55,7%) и III градуса (30,8%), док су I и IV градус били заступљени у мање од 10% случајева.

Већина дијагностикованих тумора је била првог и трећег стадијума (42,2% и 38,4%), док су други и четврти стадијум дијагностиковани у 13%, односно у 6,5% испитиваних случајева.

Према хистолошком подтипу пацијенти су дистрибуирани на следећи начин: 73% је имало светлоћелијски подтип (ccRCC), папиларни (pRCC) је имало 19,5%, а хромофобни (chRCC) свега 7,6% пацијената.

Табела 5. Клиничко-патолошке одлике пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега који су чинили анализирану кохорту (n=185).

Одлике	n (%)
Старост (године)	
≤50	31 (16,8)
51-60	42 (22,7)
61-70	81 (43,8)
>70	31 (16,8)
Пол	
Мушки	107 (57,8)
Женски	78 (42,2)
Величина тумора (cm)	
≤4	44 (23,8)
4,1-7	81 (43,8)
7,1-10	34 (18,4)
>10	26 (14,1)
Градус тумора	
I	16 (8,7)
II	103 (55,7)
III	57 (30,8)
IV	9 (4,8)
Стадијум тумора	
1	78 (42,2)
2	24 (13)
3	71 (38,4)
4	12 (6,5)
Хистолошки подтип	
Светлоћелијски	135 (73)
Папиларни	36 (19,5)
Хромофобни	14 (7,6)

4.1.2 Клиничко-патолошке одлике пацијената стратификоване према хистолошком подтипу тумора

У Табели 6. је приказан однос између клиничко-патолошких одлика пацијената и хистолошког подтипа RCC. Сто тридесет и пет пацијената је имало ccRCC, 36 pRCC (4 пацијента тип 1, 32 пацијента тип 2), а њих 14 је имало chRCC.

У просеку су пацијенти са chRCC били незнатно старији (65,7 година) од пацијената са ccRCC (61 година) и pRCC (59,4 година).

Статистички значајна веза је утврђена између хистолошког подтипа и пола ($p=0,0009$, χ^2 -тест). Већи број мушкараца је нађен у групи пацијената са ccRCC (58,5%) и pRCC (72,2%), док је већа учесталост жена забележена међу оболелима од chRCC (85,7%).

Није утврђена статистички значајна веза између величине тумора и хистолошког подтипа ($p=0,123$, χ^2 -тест). Међутим, када се тумори на основу своје величине сврстају у две категорије (тумори величине до 7 cm и тумори већи од 7 cm), тада веза између величине и хистолошког подтипа постаје статистички значајна ($p=0,0429$, $\chi^2=6,30$).

Такође, статистички значајним се показао и градус тумора у односу на хистолошки подтип ($p=0,0018$, χ^2 -тест). Тумори ниског градуса (I-II) су доминантно заступљени код ccRCC (70,4%) и chRCC (71,4%), док је код pRCC већина тумора (61,1%) била високог градуса (III-IV). Стадијум тумора се није показао статистички значајним у односу на хистолошки подтип ($p=0,5799$, χ^2 -тест).

Табела 6. Однос између клиничко-патолошких карактеристика и хистолошког подтипа тумора код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. Поређење учесталости клиничко-патолошких одлика између хистолошких подтипова је урађено χ^2 -тестом и (#) тестом једнофакторске анализе варијансе (енг. *one way ANOVA*). Символ (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

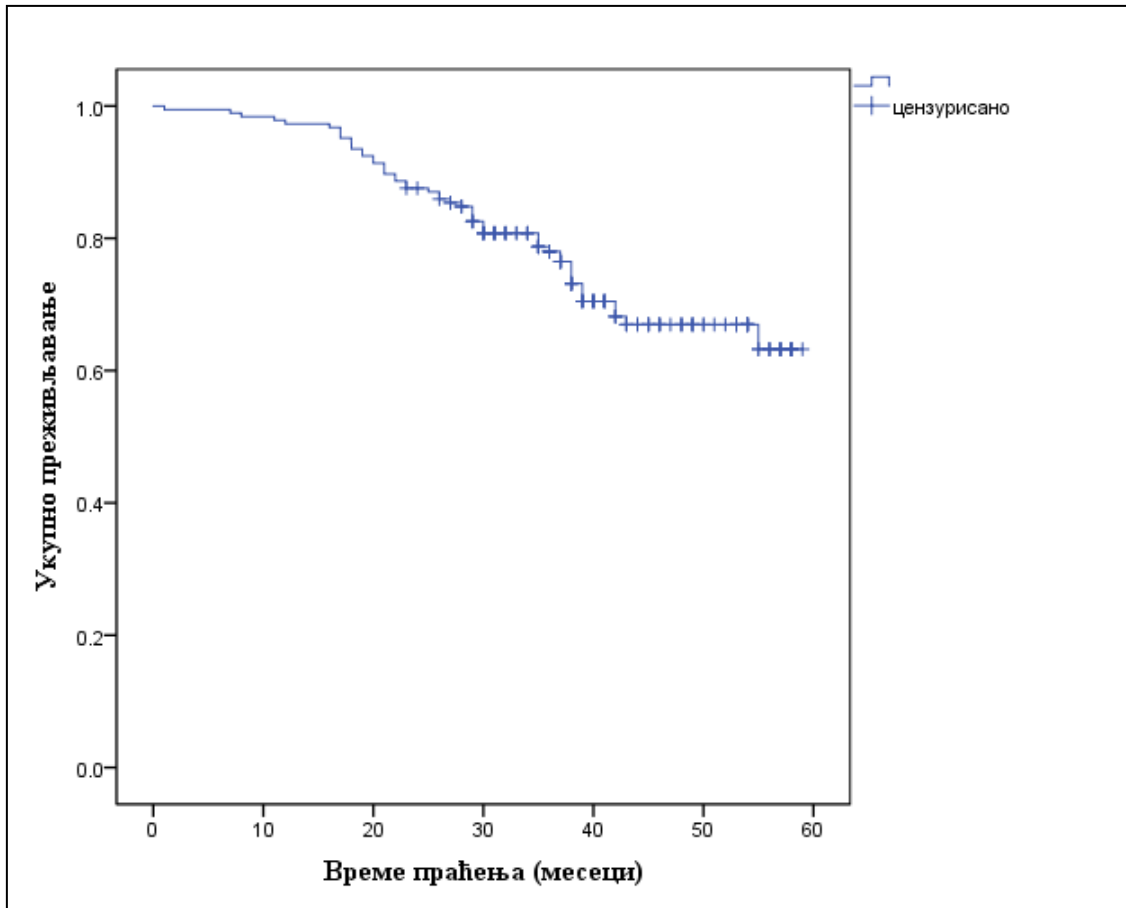
Одлике	Светлоћелијски n (%)	Папиларни n (%)	Хромофобни n (%)	p	χ^2
Пацијенти	135 (73,0)	36 (19,5)	14 (7,6)		
Старост (год.)					
Просек (SD)	61 (9,9)	59,4 (11,9)	65,7 (5,3)	0,144 [#]	
Пол				0,0009*	13,97
Мушки	79 (58,5)	26 (72,2)	2 (14,3)		
Женски	56 (41,5)	10 (27,8)	12 (85,7)		
Величина тумора (cm)				0,123	10,11
≤ 4	32 (23,7)	10 (27,8)	2 (14,3)		
4,1-7	65 (48,1)	8 (22,2)	8 (57,1)		
7,1-10	22 (16,3)	10 (27,8)	2 (14,3)		
> 10	16 (11,9)	8 (22,2)	2 (14,3)		
Градус тумора				0,0018*	12,61
Ниски (I-II)	95 (70,4)	14 (38,9)	10 (71,4)		
Високи (III-IV)	40 (29,6)	22 (61,1)	4 (28,6)		
Стадијум тумора				0,5799	4,72
1	56 (41,5)	16 (44,4)	6 (42,9)		
2	18 (13,3)	4 (11,1)	2 (14,3)		
3	51 (37,8)	16 (44,4)	4 (28,6)		
4	10 (7,4)	0 (0,0)	2 (14,3)		

4.1.3 Укупно преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега

Студија преживљавања је подразумевала праћење животног статуса пацијената у периоду од 60 месеци. Резултати студије су приказани у **Табели 7**. После 12 месеци, 97,3% пацијената је било живо, после 36 месеци 78%, а након 60 месеци у животу је било 63,2% пацијената (**Слика 6**). Просечно преживљавање у анализираној кохорти је износило 48,72 месеца уз стандардну грешку од 1,22 и интервалом поверења од 46,34-51,11 месеци.

Табела 7. Укупно преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на клиничко-патолошке одлике. Преживљавање пацијената (%) је одређено Каплан-Мајер методом, а групе клиничко-патолошких параметара су поређене Log-Rank тестом (χ^2). Симбол (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

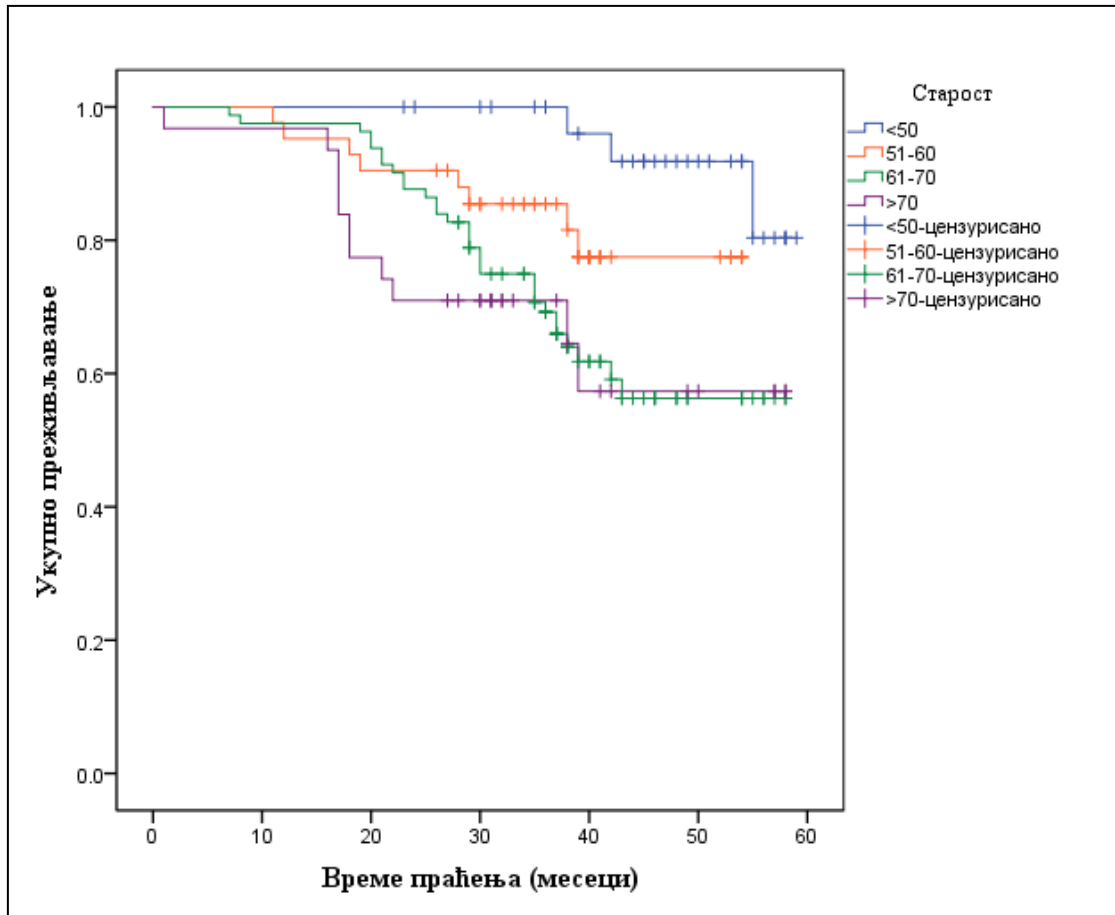
Укупно	Преживљавање (%)					p	
	Месеци	12	24	36	48		60
Укупно		97,3	87,6	78	67	63,2	
Старост (године)							
≤50		100	100	100	91,8	80,3	$\chi^2=12,455$ $p=0,006^*$
51-60		95,2	90,5	85,4	77,5	77,5	
61-70		97,5	87,7	69,2	56,3	56,3	
>70		96,8	71	71	57,3	57,3	
Пол							
Мушки		97,2	91,6	81,5	67,3	67,3	$\chi^2=0,855$ $p=0,355$
Женски		97,4	82,1	73,2	66,8	59,4	
Величина тумора (cm)							
≤4		97,7	95,5	85,4	82	82	$\chi^2=26,425$ $p<0,001^*$
4,1-7		98,8	91,4	86,9	79,9	69,9	
7,1-10		100	76,5	64,2	56,6	56,6	
>10		84,6	76,9	57,7	22,6	22,6	
Градус							
Ниски (I-II)		98,3	93,3	85,6	76,4	70	$\chi^2=13,249$ $p<0,001^*$
Високи (III-IV)		95,5	77,3	64,6	51	51	
Стадијум							
1		100	97,4	84,7	90,4	79,1	$\chi^2=43,235$ $p<0,001^*$
2		100	100	95	80,9	80,9	
3		95,8	78,9	61	42,4	42,4	
4		83,3	50	41,7	33,3	33,3	
Хистолошки подтип							
Светлоћелијски		96,3	88,9	78,1	71,8	66,3	$\chi^2=2,088$ $p=0,352$
Папиларни		100	83,3	77,8	53,5	53,5	
Хромофобни		100	85,7	76,2	76,2	76,2	



Слика 6. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената у анализираној кохорти коју је чинило 185 испитаника оболелих од тубуларног карцинома бубрега.

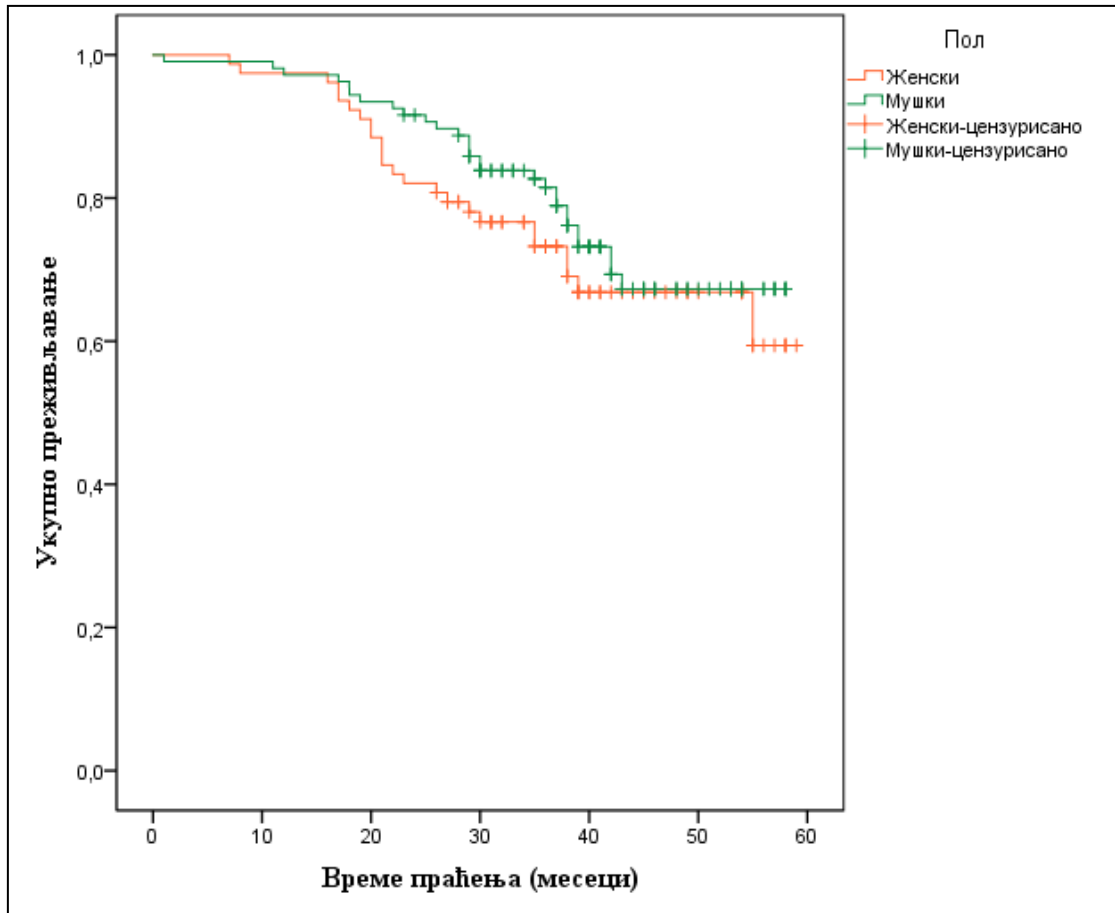
4.1.4 Утицај клиничко-патолошких одлика на укупно преживљавања пацијената

Ова студија је показала да старост значајно утиче ($\chi^2=12,455$, $p=0,006$, Log-Rank тест) на преживљавање пацијената са RCC (Слика 7). На крају петогодишњег периода, међу пацијентима млађим од 50 година преживљавање је износило 80,3%. Пацијенти старости од 51-60 година су имали укупно преживљавање од 95,2% након 12 месеци, 85,4% након 36 месеци и 77,5% након 60 месеци. У истом периоду, у групи пацијената старости од 61-70 преживљавање је износило 97,5%, 69,2% и 56,3% , а код старијих од 70 година 96,8%, 71% и 57,3% (Табела 7).



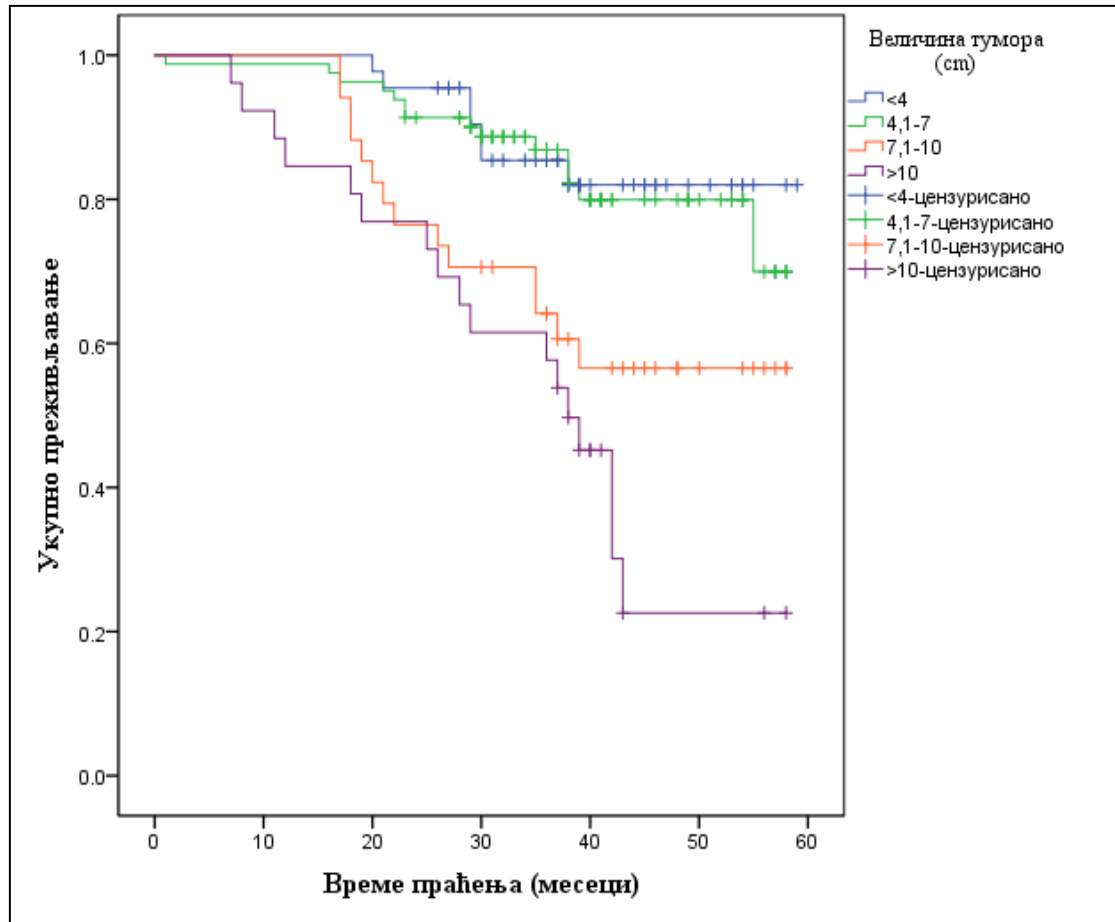
Слика 7. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на старост.

У анализираној кохорти, након 60 месеци, преживљавање је било нешто дуже код мушкараца (67,3%) у односу на жене (59,4%) али без статистичке значајности ($\chi^2=0,855$, $p=0,355$, Log-Rank тест) (Табела 7, Слика 8).



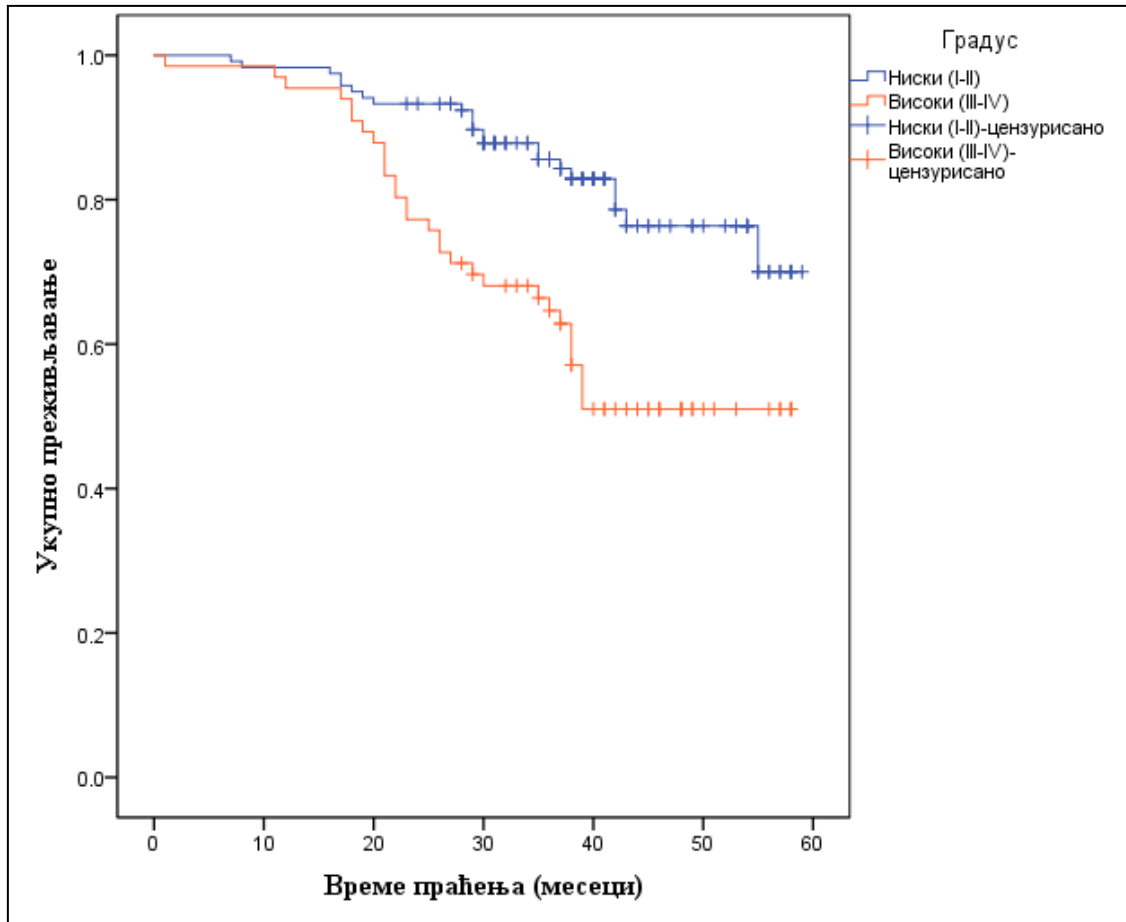
Слика 8. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на пол.

Резултати ове студије су показали да величина тумора значајно утиче ($\chi^2=26,425$, $p<0,001$, Log-Rank тест) на исход болести. Укупно преживљавање је веће код пацијената код којих је величина тумора била мања од 7 cm (Табела 7). Након 60 месеци, преживљавање у групи испитаника са тумором величине ≤ 4 cm је износило 82%, а код пацијената са тумором величине од 4,1-7 cm 69,6%. Преживљавање у групи пацијената са тумором величине од 7,1-10 cm и преко 10 cm је износило 56,6%, односно 22,6% (Слика 9).



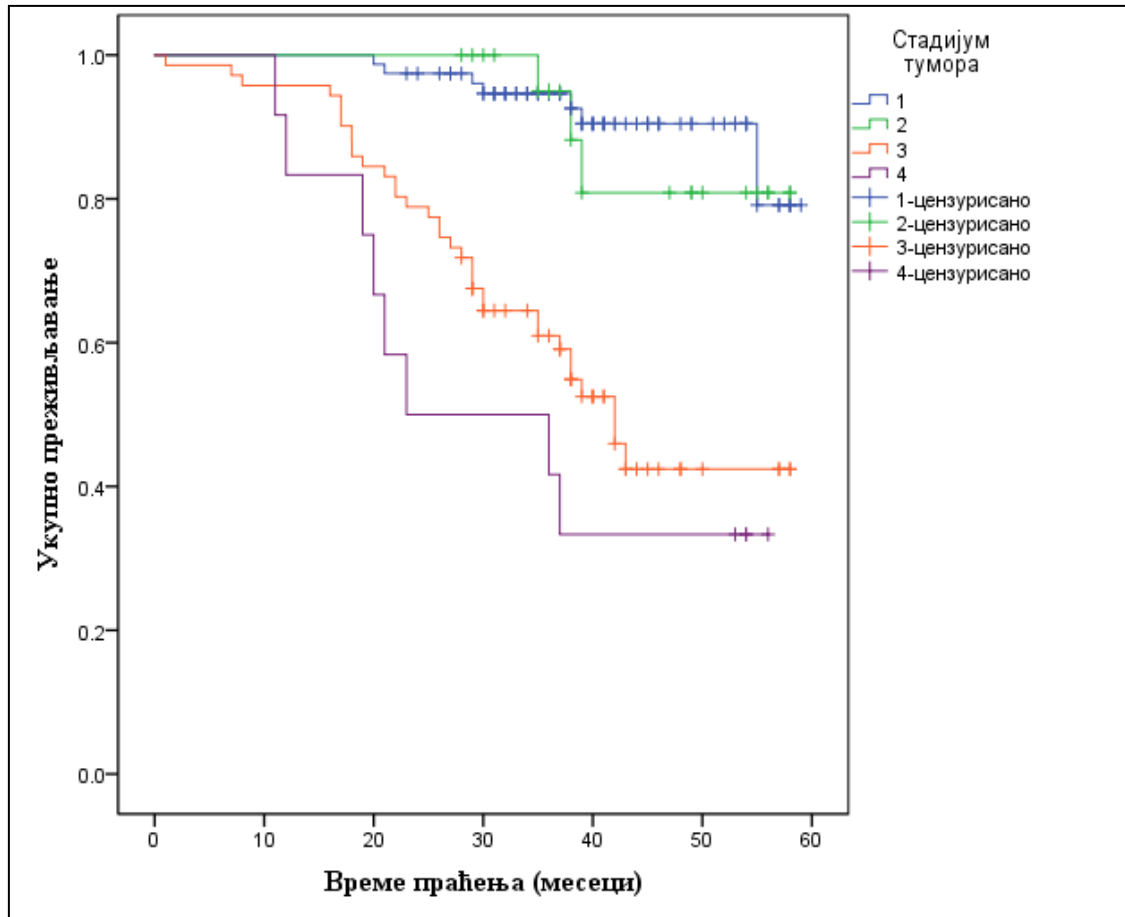
Слика 9. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на величину тумора.

Пацијенти са тумором ниског градуса су имали значајно дуже укупно преживљавање ($\chi^2=13,249$, $p<0,001$, Log-Rank тест) у поређењу са онима код којих је дијагностикован тумор високог градуса (Слика 10). Тако је у периоду након 12, 36 и 60 месеци у групи испитаника са тумором ниског градуса преживљавање износило 98,3%, 85,6% и 70%, а у групи испитаника са тумором високог градуса 95,5%, 64,6% и 51% (Табела 7).



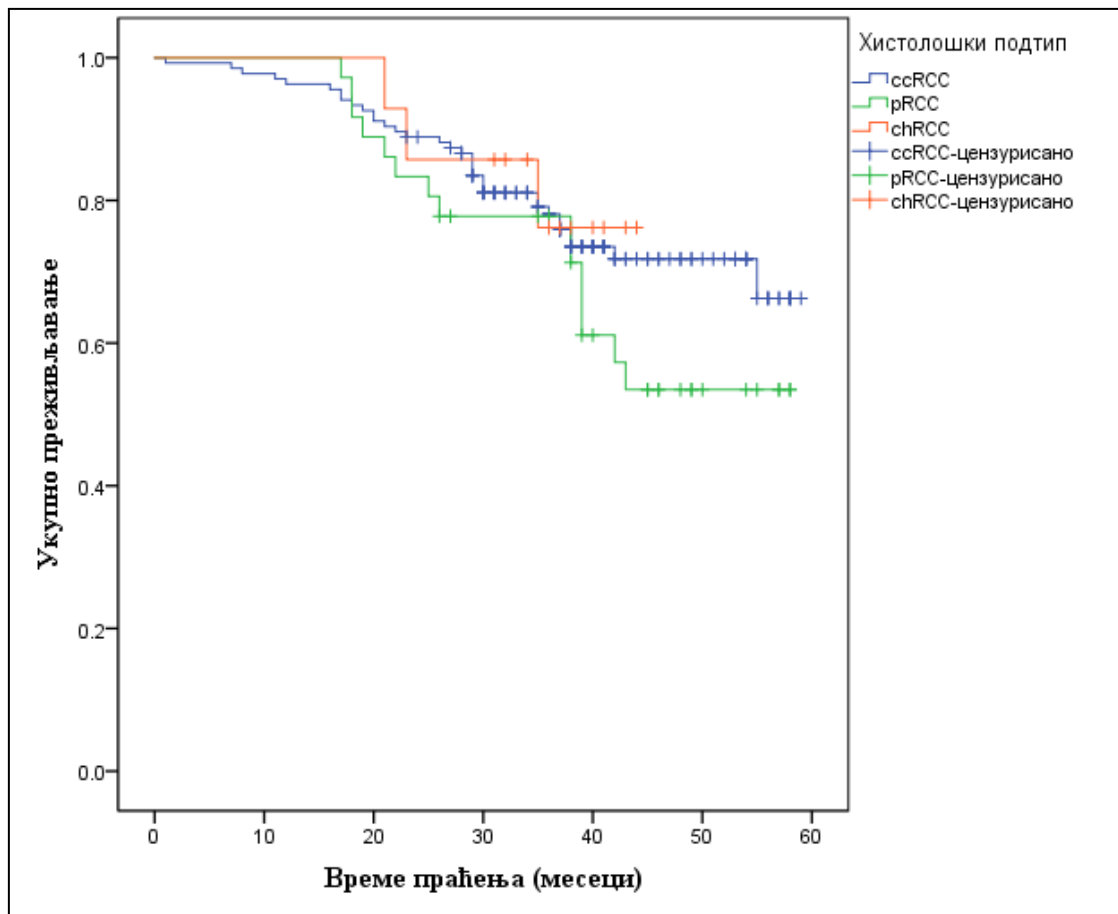
Слика 10. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на градус тумора. Градуси тумора су подељени у две групе: Ниски (тумори I и II градуса) и Високи (тумори III и IV градуса).

Стадијум тумора се, такође, показао као значајан клиничко-патолошки фактор ($\chi^2=43,235$, $p<0,001$, Log-Rank тест) који утиче на укупно преживљавање пацијената са RCC (Табела 7). Након 60 месеци, код пацијената са тумором првог и другог стадијума укупно преживљавање је износило 79,1% и 80,9%, док је код испитаника са тумором трећег и четвог стадијума износило 42,4%, односно 33,3% (Слика 11).



Слика 11. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на стадијум тумора.

Није утврђена статистички значајна разлика ($\chi^2=2,088$, $p=0,352$, Log-Rank тест) у укупном преживљавању између пацијената са различитим хистолошким подтипом RCC (Табела 7). Пацијенти са pRCC су имали најнижу стопу преживљавања (53,5%) док су пацијенти са chRCC имали највишу (76,2%) (Слика 12). У групи пацијената са ccRCC након 12, 36 и 60 месеци укупно преживљавање је износило 96,3%, 78,1% и 66,3% (Табела 7).



Слика 12. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на хистолошки подтип тумора. Анализиране групе су чинили пацијенти са следећим хистолошким подтипovima: светлоћелијски (ccRCC), папиларни (pRCC) и хромофобни (chRCC).

4.1.5 Предикициони потенцијал клиничко-патолошких одлика

У Табели 8. су приказани резултати униваријантне регресионе анализе која је спроведена у циљу утврђивања фактора који би могли бити предиктори преживљавања пацијената. Од свих клиничко-патолошких параметера, као независни предиктори су се издвојили старост ($p=0,016$), величина тумора ($p<0,001$), градус ($p=0,001$) и стадијум ($p<0,001$) тумора.

Табела 8. Униваријантна регресиона анализа утицаја клиничко-патолошких одлика на преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. HR-однос шанси (енг. *hazard ratio*); CI-интервал поверења (енг. *confidence interval*). Символ (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

Варијабла	HR	95% CI	p
Старост (године)			0,016*
≤50	1,0	-	
51-60	2,7	0,7-10,3	0,142
61-70	5,2	1,6-17,3	0,006*
>70	6,0	1,7-21,5	0,006*
Пол			
Мушки	1,0	-	
Женски	1,3	0,7-2,2	0,353
Величина тумора (cm)			<0,001*
≤4	1,0	-	
4,1-7	1,2	0,5-2,9	0,750
7,1-10	2,8	1,2-7,1	0,024*
>10	5,0	2,1-12,1	<0,001*
Градус			
Ниски (I-II)	1,0	-	
Високи (III-IV)	2,6	1,5-4,6	0,001*
Стадијум			<0,001*
1	1,0	-	
2	1,3	0,3-5,1	0,682
3	6,9	3,1-15,6	<0,001*
4	10,7	3,9-29,6	<0,001*
Хистолошки подтип			0,362
Светлоћелијски	1,0	-	
Папиларни	1,5	0,8-2,8	0,170
Хромофобни	0,9	0,3-2,9	0,861

Након униваријантне је урађена и мултиваријантна регресиона анализа, али само са клиничко-патолошким одликама које су се показале статистички значајним у униваријантној анализи (Табела 9). Мултиваријантна анализа је показала да су високи градуси ($p=0,014$) и високи стадијуми ($p < 0,001$) тумора статистички значајно повезани са преживљавањем пацијената са RCC.

Табела 9. Мултиваријантна регресиона анализа утицаја клиничко-патолошких одлика на преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. HR-однос шанси (енг. *hazard ratio*); CI-интервал поверења (енг. *confidence interval*). Символ (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

Варијабла	HR	95% CI	p
Градус			
Ниски (I-II)	1,0	-	
Високи (III-IV)	2,1	1,2-3,7	0,014*
Стадијум			<0,001*
1	1,0	-	
2	1,3	0,3-5,7	0,727
3	6,1	2,1-17,6	0,001*
4	12,2	3,5-41,8	<0,001*

4.2 АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС МАЛИГНО ТРАНСФОРМИСАНОГ ТКИВА БУБРЕГА

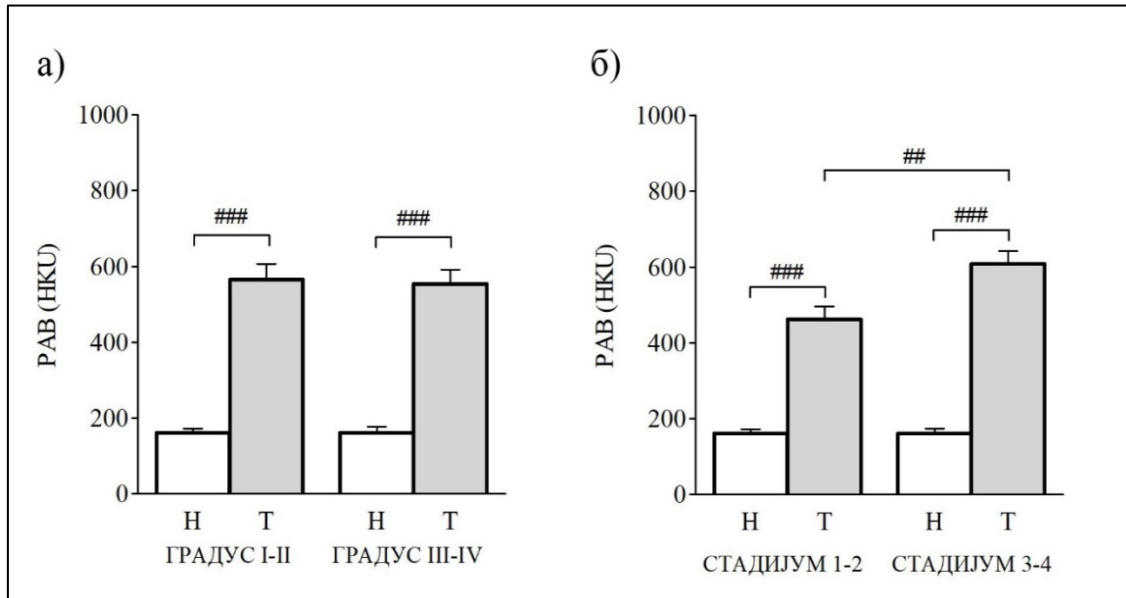
У другом делу студије је анализиран АО статус у малигном ткиву бубрега пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. Будући да је у првом делу ове докторске дисертације показано да градус и стадијум тумора имају предикциони значај за пацијенте оболеле од RCC, истовремено је анализирана веза између ова два клиничко-патолошка параметра и АО статуса.

4.2.1 Прооксидативно-антиоксидативни баланс у ткиву бубрега у односу на градус и стадијум тумора

Утврђено је да су PAB вредности значајно више у туморском у односу на здраво ткиво. Овај тренд је присутан, како у туморима нижих ($p < 0,001$, t-тест), тако и туморима виших градуса ($p < 0,001$, t-тест) (Слика 13а). Међутим, није било разлике између RCC нижих и виших градуса ($p = 0,857$, t-тест).

Тумори нижих (стадијум 1 и 2) и виших стадијума (стадијум 3 и 4) су имали значајно веће PAB вредности у поређењу са здравим ткивом ($p < 0,001$, t-тест) (Слика 13б). Прогесија тумора ка вишим стадијумима је у вези са

варирањем нивоа PAB. RCC трећег и четвртог стадијума су имали веће PAB вредности у односу оне првог и другог стадијума ($p=0,0049$, t-тест).



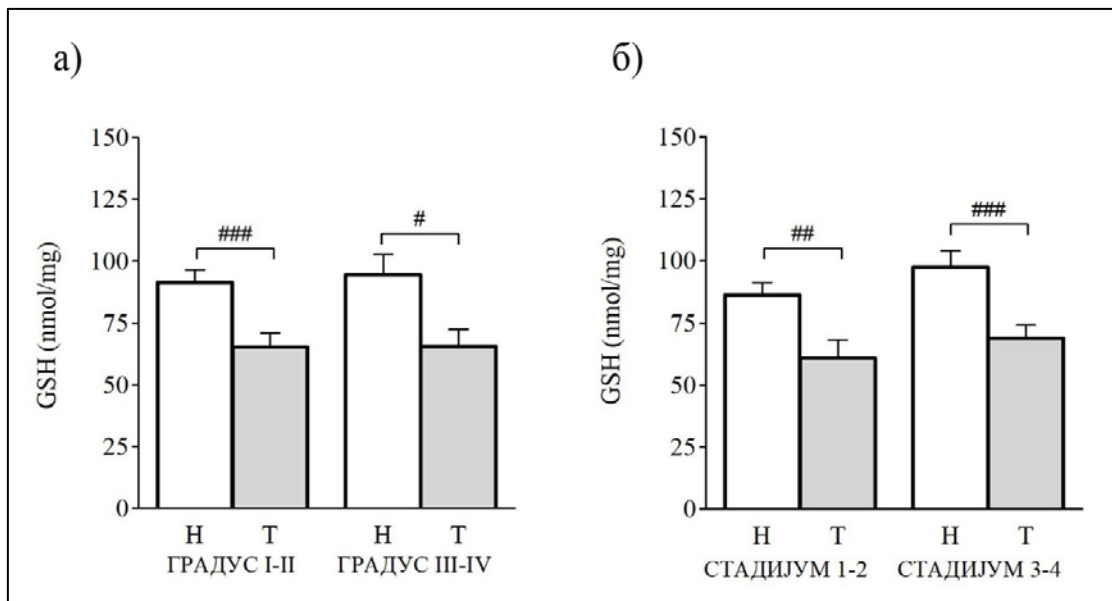
Слика 13. Прооксидативни-антиоксидативни баланс (PAB) у здравом (Н) и туморском (Т) ткиву бубрега пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) PAB вредности у зависности од градуса тумора; б) PAB вредности у зависности од стадијума тумора. Хистограм представља PAB вредности изражене у арбитрарним јединицама (НКУ) приказане као средње вредности \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, t-тест.

4.2.2 Концентрација глутатиона у ткиву бубрега у односу на градус и стадијум тумора

Измерена концентрација GSH је била нижа у туморима у односу на здраво ткиво. Пад од готово 30% је забележен, како у RCC нижих ($p=0,0002$, t-тест), тако и у RCC виших градуса ($p=0,0113$, t-тест) (Слика 14а).

На Слици 14б. се може уочити статистички значајно опадање концентрације GSH у туморима нижих стадијума ($p=0,0041$), као и у туморима виших стадијума ($p=0,0008$, t-тест) у поређењу са здравим ткивом.

Између различитих група градуса и стадијума није било статистички значајне разлике у концентрацији GSH ($p=0,9605$, $p=0,3666$, редом, t-тест).



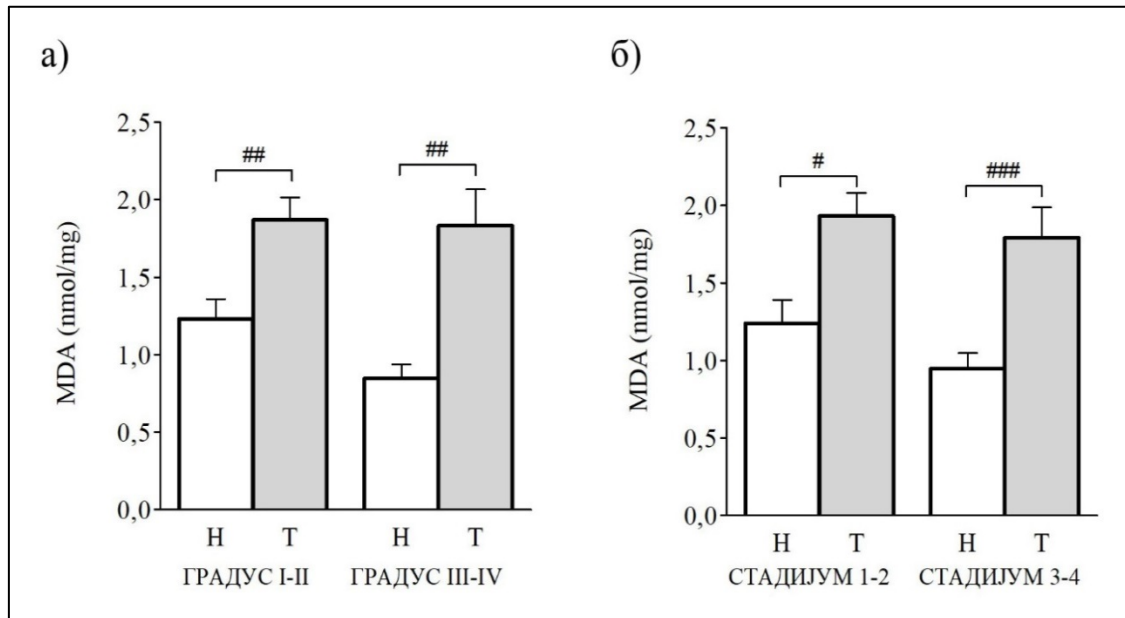
Слика 14. Концентрација глутатиона (GSH) у здравом (Н) и туморском (Т) ткиву бубрега пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) концентрација GSH у зависности од градуса тумора; б) концентрација GSH у зависности од стадијума тумора. Хистограм представља концентрацију GSH изражену у наномолима по милиграму укупних протеина (nmol/mg) приказану као средња вредност \pm стандардна грешка. Симболи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, t-тест.

4.2.3 Концентрација малондиалдехида у ткиву бубрега у односу на градус и стадијум тумора

Резултати ове студије показују да се малигно трансформисано ткиво одликује већом концентрацијом MDA у односу на здраво ткиво бубрега, независно од градуса и стадијума. RCC нижих и виших градуса су имали значајно веће концентрација MDA ($p=0,0046$, $p=0,0015$, редом, t-тест) у поређењу са контролним ткивом, али разлике међу њима није било ($p=0,8868$, t-тест) (Слика 15а). Слично томе, RCC нижих и виших стадијума показују пораст нивоа MDA ($p=0,0117$, $p=0,0007$, редом, t-тест) у поређењу са здравим ткивом, али разлике између две групе тумора није било ($p=0,5905$, t-тест) (Слика 15б).

Иако није нађена статистички значајана разлика између RCC различитих градуса и стадијума ипак се уочава одређен тренд промене концентрације MDA. Наиме, код RCC нижих градуса концентрација MDA је за 52% већа у односу на здраво ткиво, док је код виших градуса већа за 116% (Слика 15а). Такође, код RCC првог и другог стадијума забележено је повећање концентрације MDA од

55%, док је код трећег и четвртог стадијума пораст концентрације MDA износио 89% у поређењу са контролним ткивом (Слика 15б).



Слика 15. Концентрација малондиалдехида (MDA) у здравом (Н) и туморском (Т) ткиву бубрега пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) концентрација MDA у зависности од градуса тумора; б) концентрација MDA у зависности од стадијума тумора. Хистограм представља концентрацију MDA изражену у наномолима по милиграму укупних протеина (nmol/mg) приказану као средња вредност \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, t-тест.

4.2.4 Експресија ензима антиоксидативне заштите у ткиву бубрега у односу на градус тумора

4.2.4.1 Експресија бакар-цинк супероксид дисмутазе у односу на градус тумора

У поређењу са здравим ткивом, RCC показује смањену експресију *SOD1* гена. Анализа t-тестом је показала 2,3 пута мању количину *SOD1* mRNA у туморима нижих ($p < 0,001$), и 2 пута мању у онима виших градуса ($p < 0,001$)

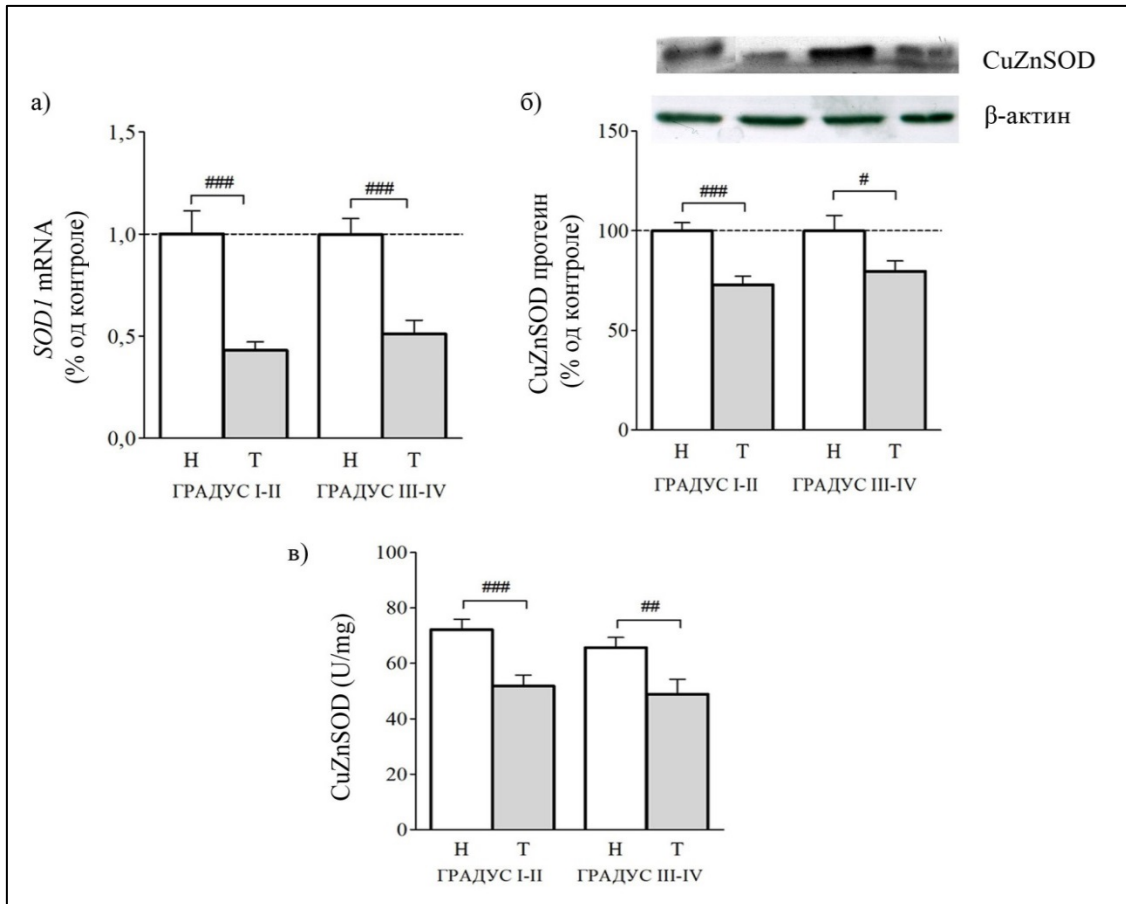
(Слика 16а). Исти тренд промене је уочен на протеинском нивоу како нижих, тако и код виших градуса ($p=0,0003$, $p=0,0189$ редом, t-тест) (Слика 16б).

Обе групе RCC су показале значајно мању активност CuZnSOD у односу на здраве контроле ($p=0,0003$, $p=0,0041$, редом, t-тест) (Слика 16в). Између нижих и виших градуса тумора није забележено значајно варирање експресије *SOD1*, као ни активности CuZnSOD ($p>0,05$).

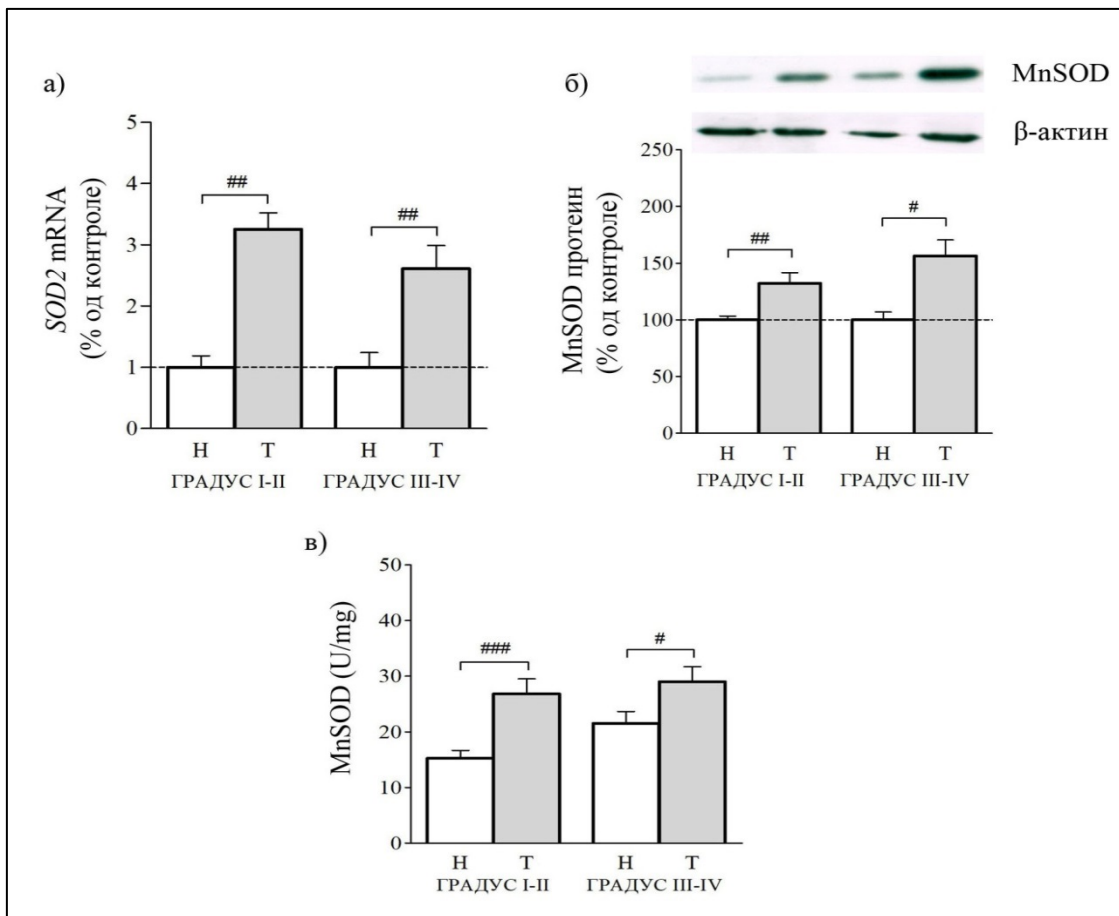
4.2.4.2 Експресија манган супероксид дисмутазе у односу на градус тумора

Анализа Вилкоксон тестом је показала повећану експресију *SOD2* гена у малигном ткиву бубрега. У поређењу са здравим ткивом, ниво *SOD2* mRNA је 3,3 пута већи у RCC нижих градуса ($p=0,0063$), а 2,6 пута већи у RCC виших градуса ($p=0,008$). Није било разлике у количини *SOD2* mRNA између RCC различитих градуса ($p>0,05$, Мен-Витни тест) (Слика 17а).

Ниво MnSOD протеина је већи у обе групе RCC у односу на здраво ткиво ($p=0,0086$, $p=0,0106$, редом, t-тест) (Слика 17б). У нискоградусним као и у високоградусним RCC је измерена значајно већа MnSOD активност у односу на контролно ткиво ($p=0,0004$, $p=0,0106$, редом, t-тест) (Слика 17в). Ниво MnSOD протеина, као и ензимска активност се нису мењали у зависности од градуса RCC ($p>0,05$).



Слика 16. Функционална експресија бакар-цинк супероксид дисмутазе (CuZnSOD) у здравом ткиву (Н) и туморима различитих градуса (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *SOD1* mRNA; б) релативна количина CuZnSOD протеина са репрезентативним имуноблововима; в) ензимска активност CuZnSOD изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност ± стандардна грешка. Симболи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, t-тест.



Слика 17. Функционална експресија манган супероксид дисмутазе (MnSOD) у здравом ткиву (H) и туморима различитих градуса (T) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина SOD2 mRNA; б) релативна количина MnSOD протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност MnSOD изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест; б) и в) t-тест.

4.2.4.3 Експресија каталазе у односу на градус тумора

У малигном ткиву бубрега је дошло до значајног варирања нивоа CAT mRNA (Слика 18а). У RCC нижих градуса је регистрована 2,2 пута мања количина CAT mRNA ($p = 0,0012$, Вилкоксон тест), док је у RCC виших градуса количина CAT mRNA била 4,3 пута мања у поређењу са контролом ($p = 0,0002$, Вилкоксон тест). Варирање нивоа CAT mRNA је у вези са градусом тумора, па је

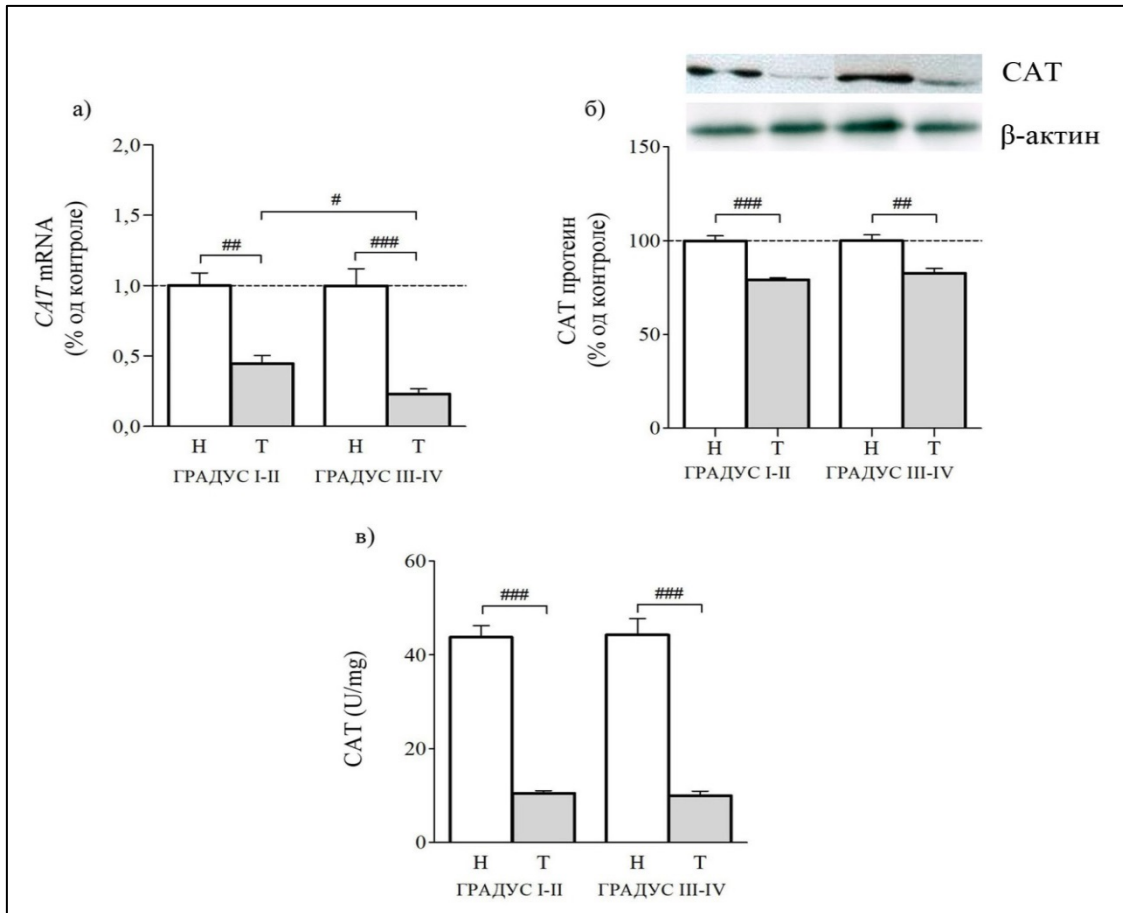
код високоградусних RCC уочен пад од 50% у односу на нискоградусне RCC ($p=0,0226$, Мен-Витни тест).

Малигно трансформисано ткиво се одликује променом нивоа САТ протеина (**Слика 18б**). У RCC нижих и виших градуса је забележена мања количина овог ензима ($p<0,001$, $p=0,0085$, редом, t-тест) у односу на здраво ткиво. Међутим, није било разлике у нивоу протеина између нижих и виших градуса RCC ($p>0,05$). САТ активност (**Слика 18в**) није показала варирање у зависности од градуса тумора ($p>0,05$) па је код нижих и виших градуса уочен пад у поређењу са здравом контролом ($p<0,001$, t-тест).

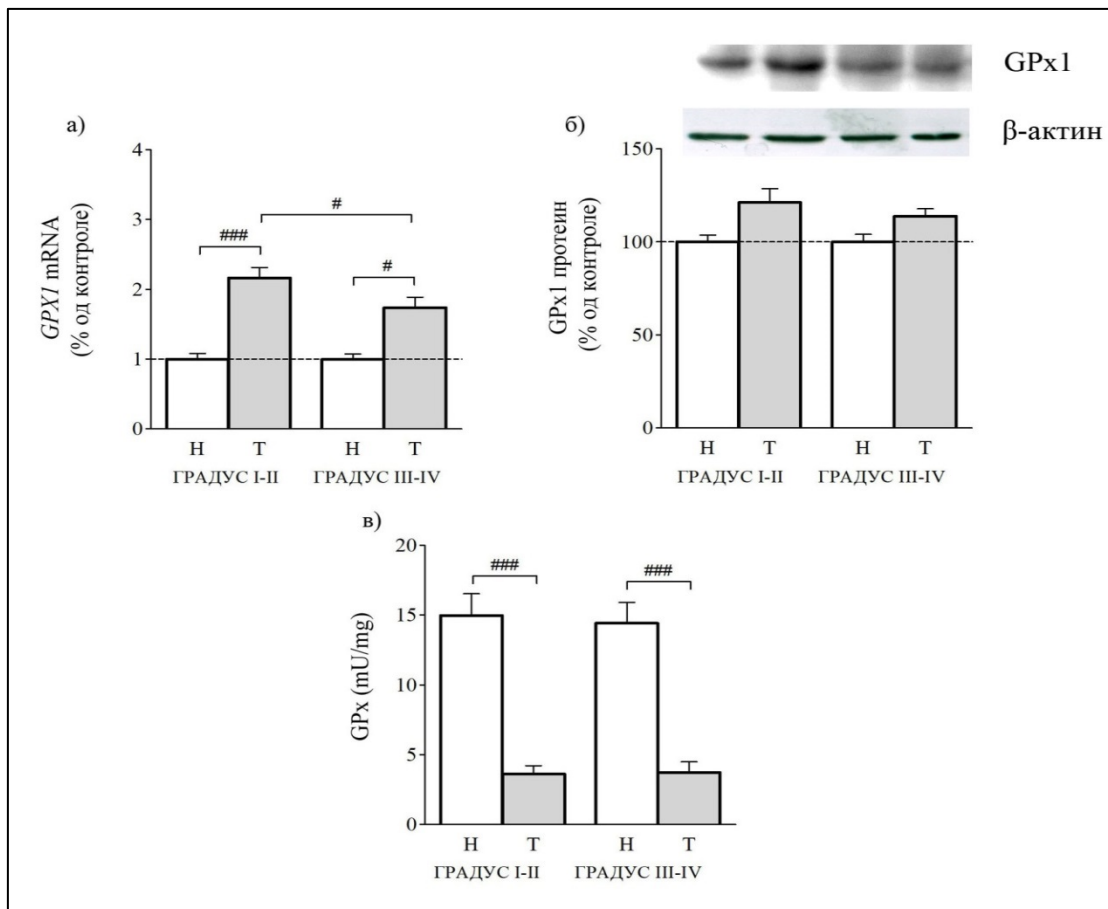
4.2.4.4 Експресија глутатион пероксидазе у односу на градус тумора

Резултати студије показују повећану експресије *GPX1* гена у RCC. RCC нижих градуса су имали 2,2 пута већу количину *GPX1* mRNA ($p=0,0002$, Вилкоксон тест), док је код RCC виших градуса забележено повећање од 1,7 пута ($p=0,0242$, Вилкоксон тест) у односу на здраво ткиво (**Слика 19а**). Анализа Мен-Витни тестом је показала да је прогресија тумора у виши градус у вези са опадањем релативне количине *GPX1* mRNA ($p=0,0289$).

На нивоу транслације није било разлике између малигног ткива и здравих контрола ($p>0,05$, Вилкоксон тест) (**Слика 19б**). У поређењу са здравим ткивом, активост GPx је значајно мања у RCC независно од градуса ($p<0,001$, t-тест) (**Слика 19в**).



Слика 18. Функционална експресија каталазе (CAT) у здравом ткиву (Н) и туморима различитих градуса (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина CAT mRNA; б) релативна количина CAT протеина са репрезентативним имуноблововима; в) ензимска активност CAT изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност ± стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест, Мен-Витни тест; б) и в) t-тест.



Слика 19. Функционална експресија глутатион пероксидазе (GPx) у здравом ткиву (H) и туморима различитих градуса (T) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *GPX1* mRNA; б) релативна количина GPx1 протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност GPx изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест, Мен-Витни тест; в) t-тест.

4.2.4.5 Експресија глутатион редуктазе у односу на градус тумора

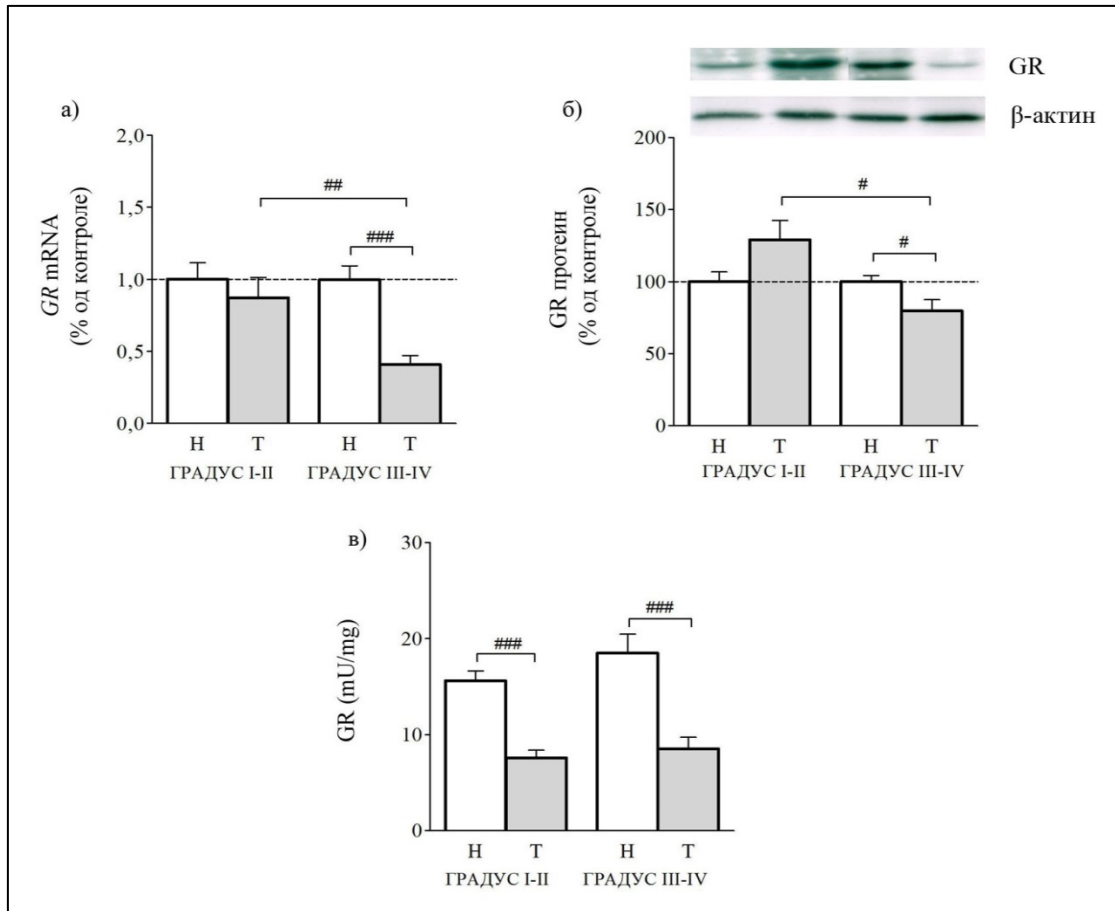
Експресија *GR* гена се значајно мењала у зависности од градуса тумора (Слика 20а и 20б). Тако је у RCC виших градуса измерена 2 пута мања количина *GR* mRNA ($p = 0,0066$, Мен-Витни тест) и за 38% нижи ниво *GR* протеина ($p = 0,0296$, t-тест) у односу на RCC нижих градуса. Поређењем RCC виших градуса са контролним ткивом регистрована је 2,4 пута мања количина *GR* mRNA ($p < 0,001$, Вилкоксон тест) и за 21% нижи ниво *GR* протеина ($p = 0,0444$, t-тест).

Малигно трансформисано ткиво се одликује нижом активношћу GR у поређењу са контролним ткивом, што је забележено код нискоградусних ($p < 0,001$, t-тест), као и високоградусних ($p = 0,0008$, t-тест) RCC (Слика 20в). Није било разлике у GR активности између нижих и виших градуса RCC ($p > 0,05$).

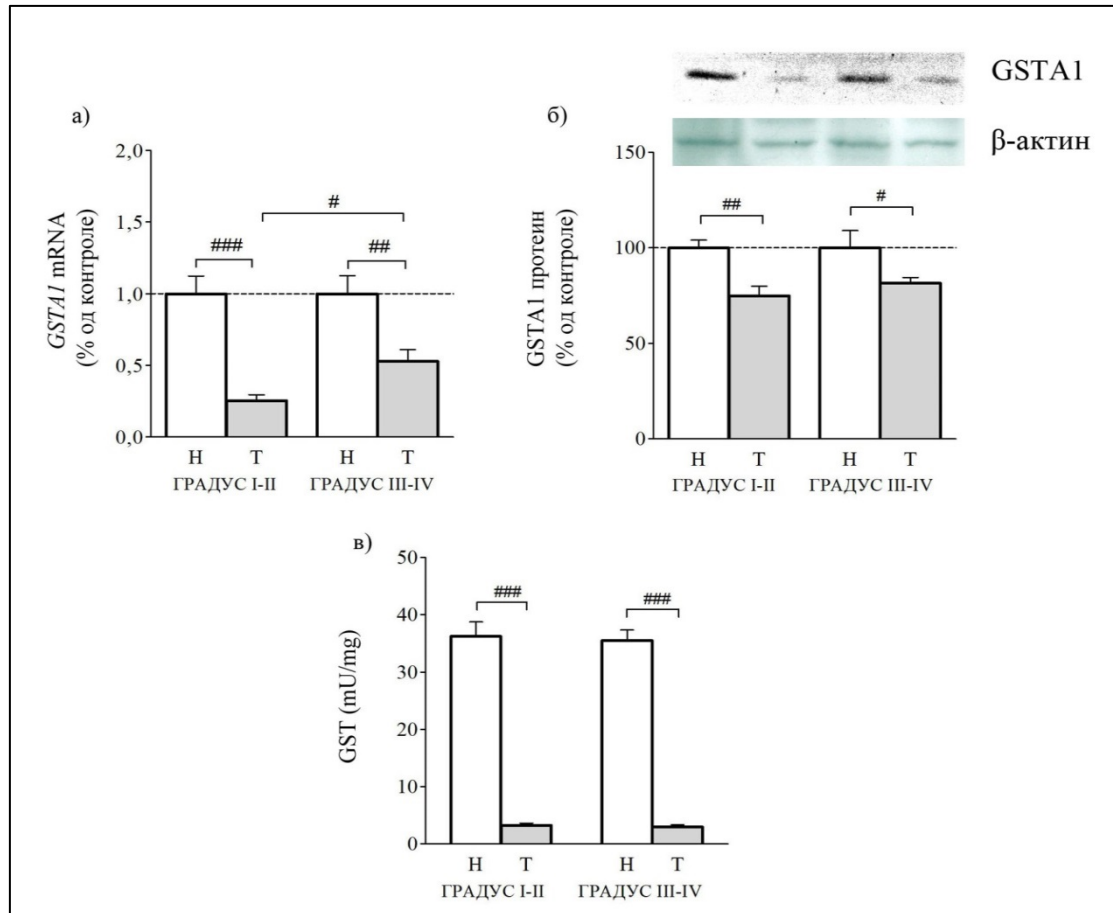
4.2.4.6 Експресија глутатион трансферазе у односу на градус тумора

На Слици 21. се може видети да је промена експресије GST пре свега одлика малигне трансформације ткива, док се градус тумора карактерише променама на нивоу транскрипције *GSTA1*. Наиме, код RCC виших градуса је измерена већа количина *GSTA1* mRNA у поређењу са нискоградусним RCC ($p = 0,0117$, Мен-Витни тест) (Слика 21а). Поред тога, код нискоградусних, као и високоградусних RCC, је забележен пад у количини *GSTA1* mRNA у поређењу са здравим ткивом ($p = 0,0004$, $p = 0,0089$, редом, Вилкоксон тест).

Независно од градуса RCC, у малигно трансформисаном ткиво је забележен пад нивоа GSTA1 протеина у односу на здраво ткиво ($p = 0,0067$, $p = 0,0252$, редом, t-тест) (Слика 21б). GST активност у малигном ткиву је износила свега 9% активности забележене у здравом ткиву ($p < 0,001$, t-тест) (Слика 21в).



Слика 20. Функционална експресија глутатион редуктазе (GR) у здравом ткиву (Н) и туморима различитих градуса (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина GR mRNA; б) релативна количина GR протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност GR изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Симболи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест, Мен-Витни тест; б) и в) t-тест.



Слика 21. Функционална експресија глутатион трансферазе (GST) у здравом ткиву (H) и туморима различитих градуса (T) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *GSTA1* mRNA; б) релативна количина *GSTA1* протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност GST изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест, Мен-Витни тест; б) и в) t-тест.

4.2.5 Експресија ензима антиоксидативне заштите у ткиву бубрега у односу на стадијум тумора

4.2.5.1 Експресија бакар цинк супероксид дисмутазе у односу на стадијум тумора

Анализирани параметри нису показали промене у зависности од стадијума тумора. У малигном ткиву је забележен пад нивоа *SOD1* mRNA како у

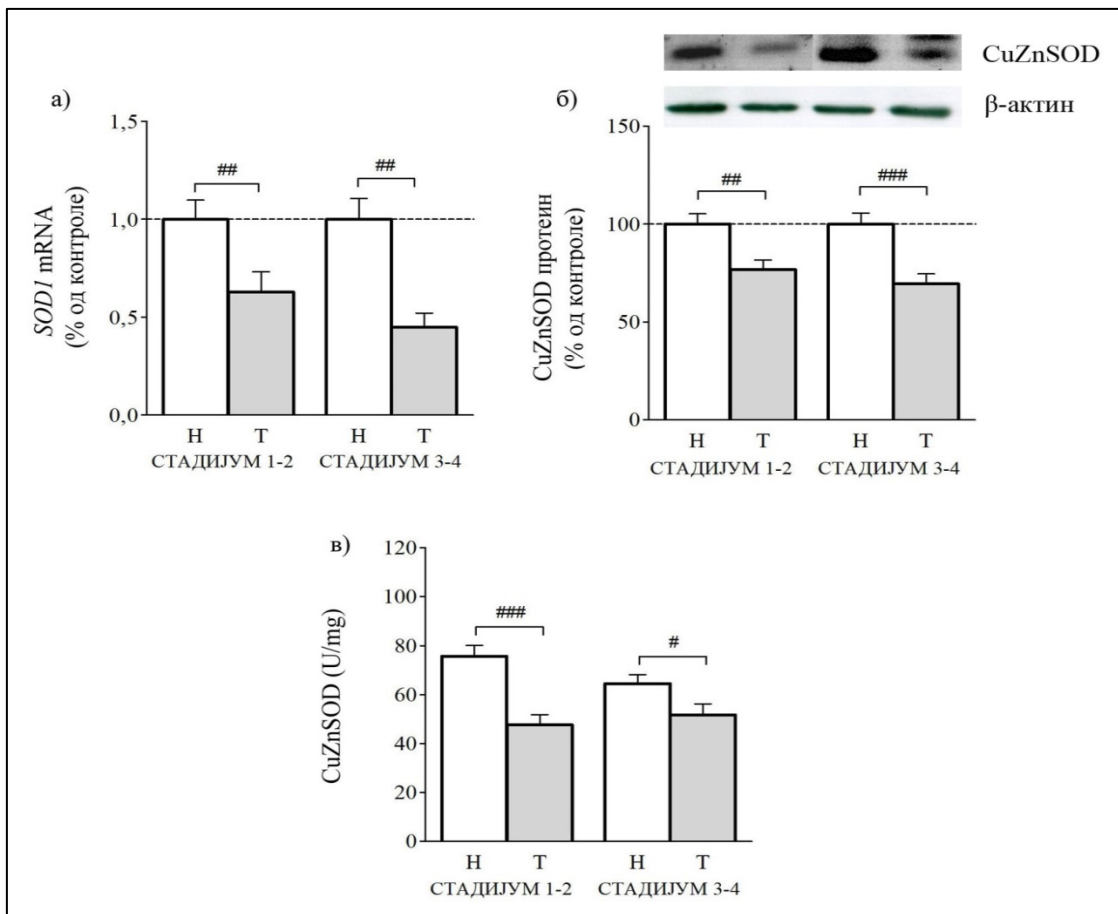
туморима ниских, тако и у онима високих стадијума ($p=0,0034$, $p=0,0052$, редом, t-тест) (Слика 22а).

Сличан тренд је забележен на протеинском нивоу као и на нивоу ензимске активности. Код обе групе RCC је забележен значајан пад у количини протеина ($p=0,0046$, $p=0,00052$, редом, t-тест) (Слика 22б), али и у активности CuZnSOD ($p<0,001$, $p=0,0134$, редом, t-тест) у поређењу са контролним ткивом (Слика 22в).

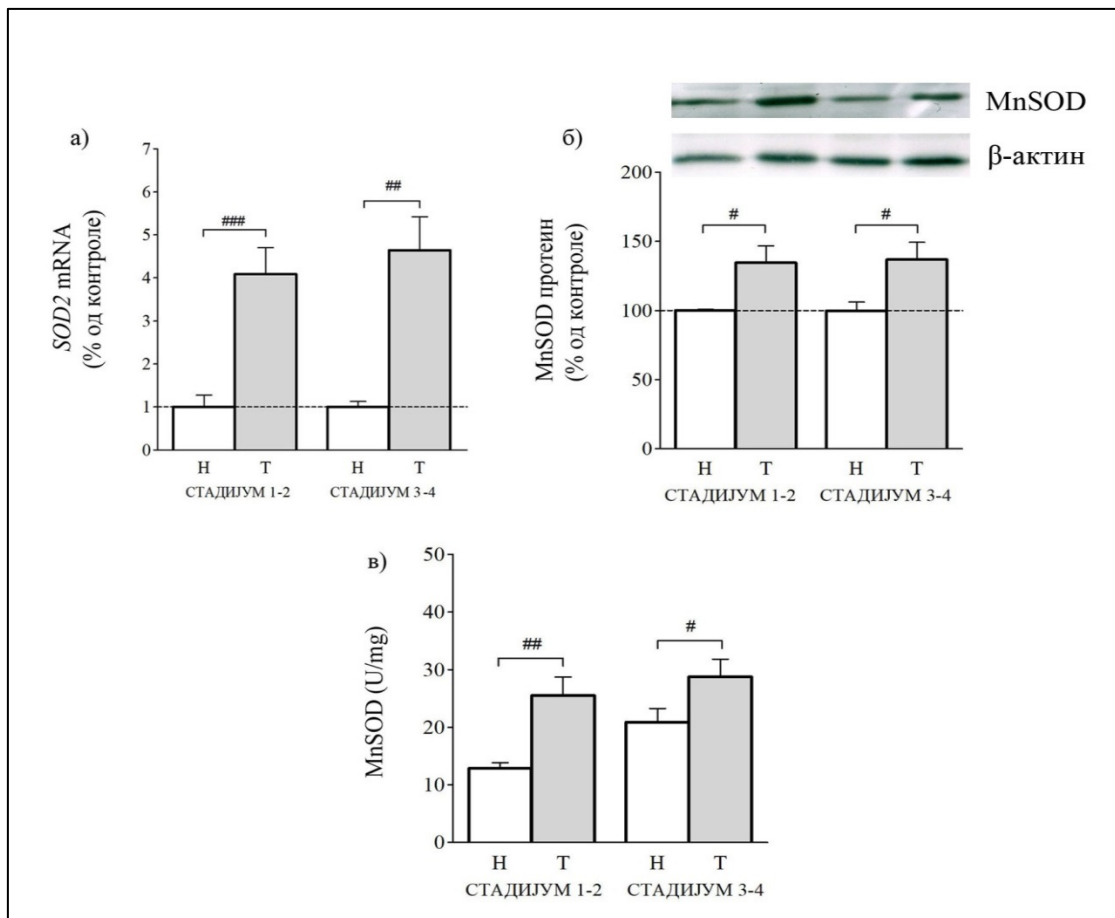
4.2.5.2 Експресија манган супероксид дисмутазе у односу на стадијум тумора

У поређењу са здравим ткивом бубрега RCC нижих и виших стадијума си имали чак 4 пута већу релативну количину *SOD2* mRNA ($p=0,0005$, $p=0,0009$, редом, Вилкоксон тест) (Слика 23а). Између RCC различитих стадијума није било промене у количини *SOD2* mRNA ($p=0,8949$, Мен-Витни тест).

Ниво MnSOD протеина је одговарао тренду промене релативне количине mRNA (Слика 23б). У RCC првог и другог стадијума је забележен пораст нивоа MnSOD протеина од 34% у односу на здраво ткиво ($p=0,0273$, t-тест), док је у RCC трећег и четвртог стадијума тај пораст износио 37% ($p=0,0295$, t-тест). Међу туморима различитих стадијума није било разлике у ($p=0,9057$, t-тест). Активност MnSOD је имала тренд пораста у туморима нижих, као и туморима виших стадијума ($p=0,0031$, $p=0,0165$, редом, t-тест), у односу на здраво ткиво (Слика 23в).



Слика 22. Функционална експресија бакар-цинк супероксид дисмутазе (CuZnSOD) у здравом ткиву (Н) и туморима различитих стадијума (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *SOD1* mRNA; б) релативна количина CuZnSOD протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност CuZnSOD изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност ± стандардна грешка. Симболи показују статистички значајне разлике између поређених група: #-p<0,05; ##-p<0,01; ###-p<0,001, t-тест.



Слика 23. Функционална експресија манган супероксид дисмутазе (MnSOD) у здравом ткиву (Н) и туморима различитих стадијума (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *SOD2* mRNA; б) релативна количина MnSOD протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност MnSOD изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност ± стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест; б) и в) t-тест.

4.2.5.3 Експресија каталазе у односу на стадијум тумора

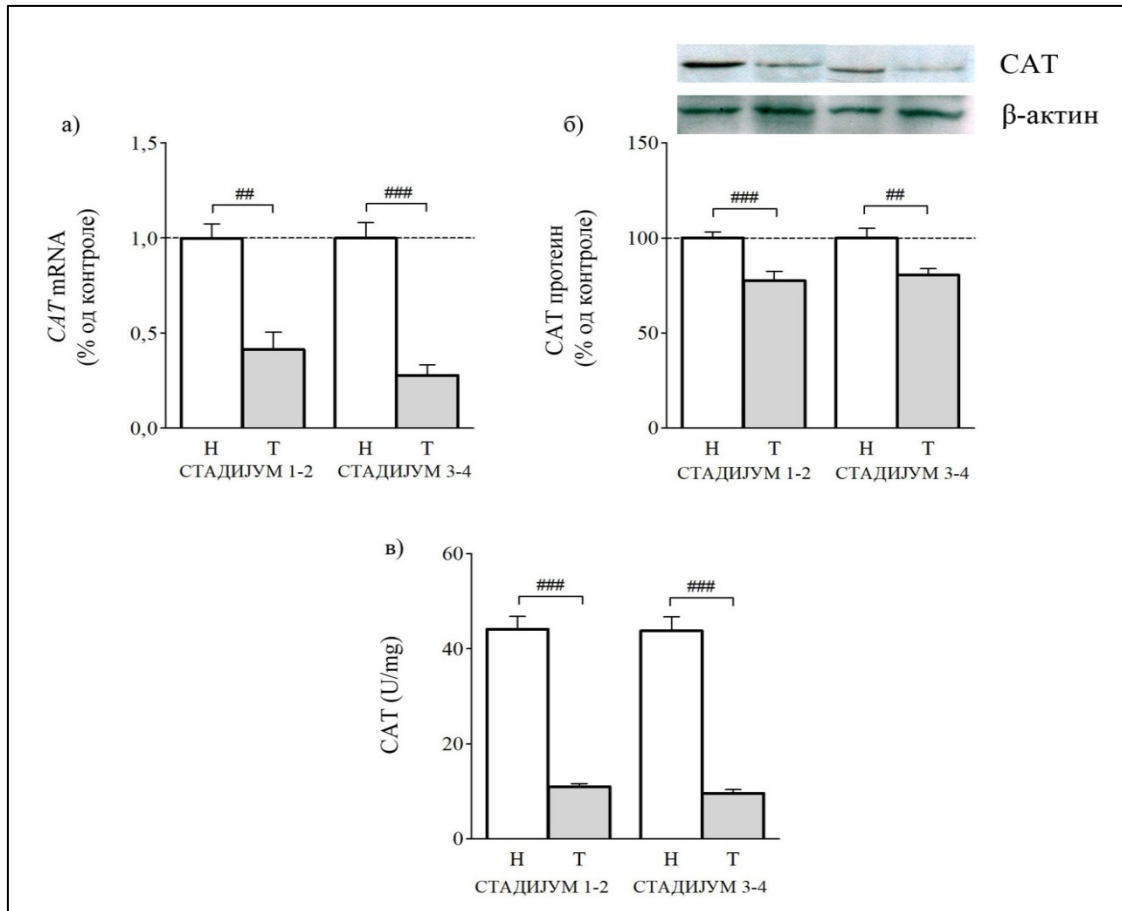
Малигно ткиво бубрега карактеришу значајне промене експресије *CAT* гена и активности *CAT* ензима. У односу на здраво ткиво, нижи стадијуми RCC су имали 2,4 пута мању количину *CAT* mRNA ($p = 0,0015$, Вилкоксон тест), док је у туморима виших стадијума регистрована 3,6 пута мања количина *CAT* mRNA ($p = 0,001$, Вилкоксон тест) (Слика 24а).

Сличан тренд је забележен на протеинском нивоу (**Слика 24б**). Обе групе RCC су имале за око 20% мање САТ протеина у поређењу са контролним ткивом ($p=0,0008$, $p=0,0013$, редом t-тест). Активност ензима је у туморима нижих ($p<0,001$, t-тест) и виших стадијума ($p<0,001$, t-тест) била мања у односу на здраво ткиво (**Слика 24в**). Између различитих стадијума нису забележене значајне промене анализираних параметара.

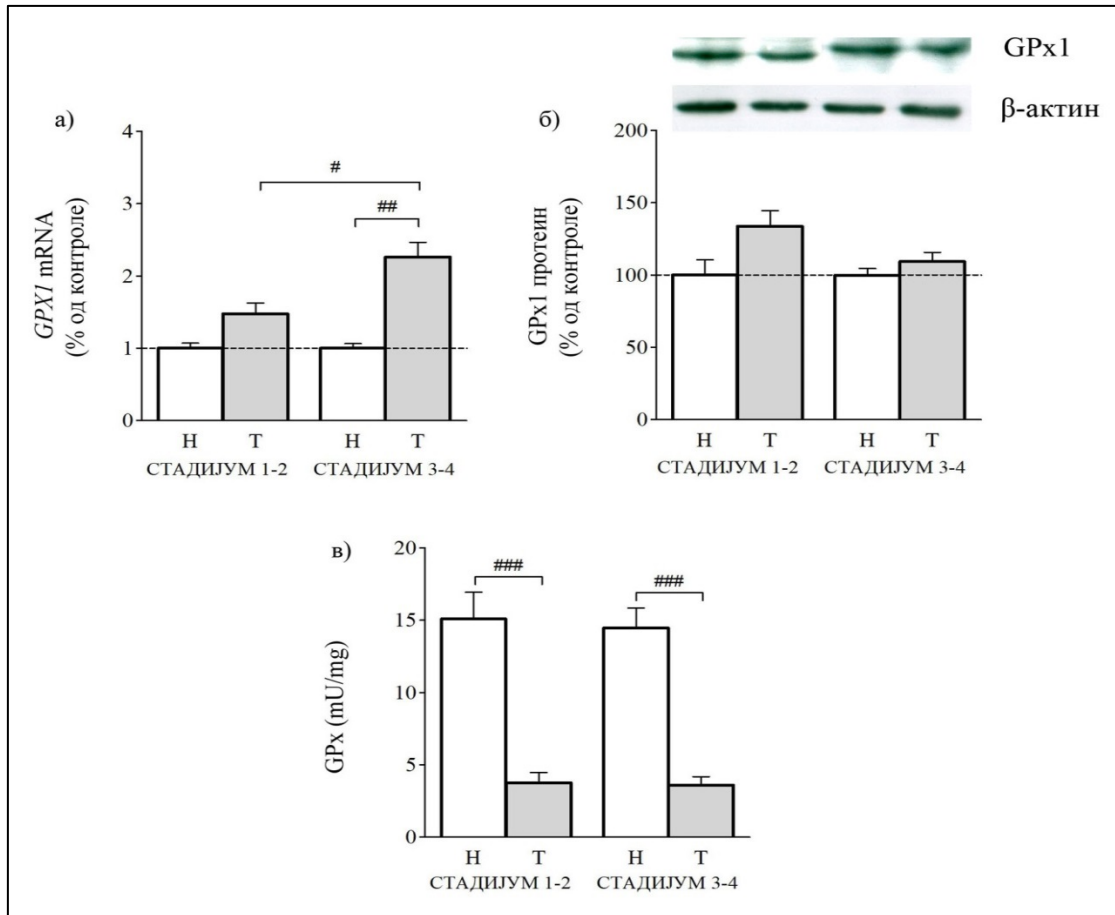
4.2.5.4 Експресија глутатион пероксидазе у односу на стадијум тумора

Значајан пораст нивоа *GPX1* mRNA је забележен само у RCC виших стадијума (**Слика 25а**) у односу на здраво ткиво бубрега ($p=0,0026$, Вилкоксон тест), али и у поређењу са нижим стадијумима ($p=0,0384$, Мен-Витни тест).

Анализа релативне количине GPx протеина није показала статистички значајне промене (**Слика 25б**). За разлику од генске експресије, активност GPx је имала супротан тренд промене па је тако у односу на здраво ткиво уочен значајан пад у туморима нижих ($p<0,001$, t-тест) и туморима виших стадијума ($p<0,001$, t-тест) (**Слика 25в**). Између нижих и виших стадијума није било разлике у погледу активности GPx ($p=0,8074$).



Слика 24. Функционална експресија каталазе (CAT) у здравом ткиву (H) и туморима различитих стадијума (T) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина CAT mRNA; б) релативна количина CAT протеина са репрезентативним имуноблововима; в) ензимска активност CAT изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест; б) и в) t-тест.



Слика 25. Функционална експресија глутатион пероксидазе (GPx) у здравом ткиву (Н) и туморима различитих стадијума (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. **а)** релативна количина *GPX1* mRNA; **б)** релативна количина GPx1 протеина са репрезентативним имуноблотовима; **в)** ензимска активност GPx изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$, Мен-Витни тест; ##- $p < 0,01$, Вилкоксон тест; ###- $p < 0,001$, t-тест.

4.2.5.5 Експресија глутатион редуктазе у односу на стадијум тумора

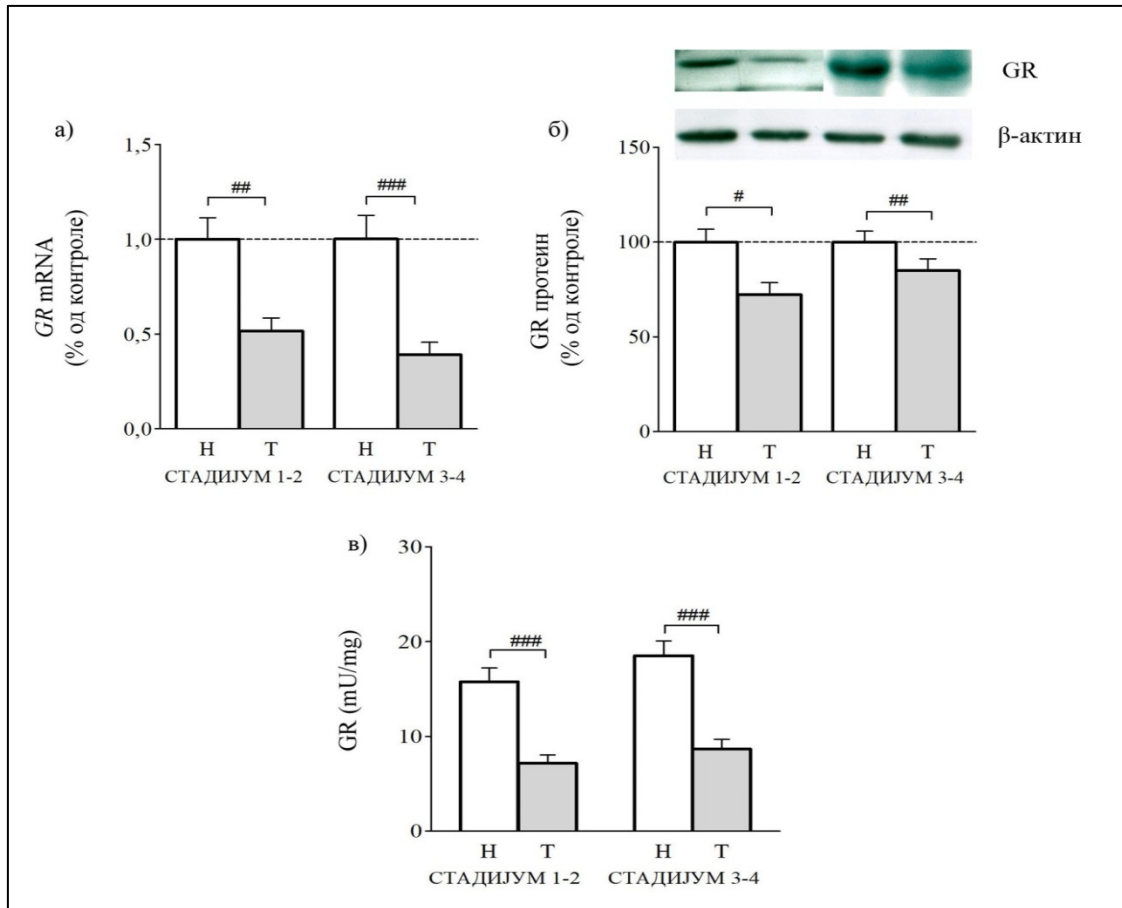
У малигном ткиву бубрега је регистровано значајно варирање функционалне експресије GR-а. Анализиране групе RCC су показале пад у количини *GR* mRNA у односу на здраво ткиво ($p = 0,0051$, $p = 0,0005$, редом, Вилкоксон тест) (Слика 26а).

Независно од стадијума, у RCC је регистрован пад у количини протеина ($p=0,0202$, $p=0,0099$, редом, t-тест) у односу на контролно ткиво (Слика 26б). Активност GR је значајно мања у RCC првог и другог стадијума ($p=0,001$, t-тест), као и у RCC трећег и четвртог стадијума ($p<0,001$, t-тест) у односу на здраво ткиво (Слика 26в).

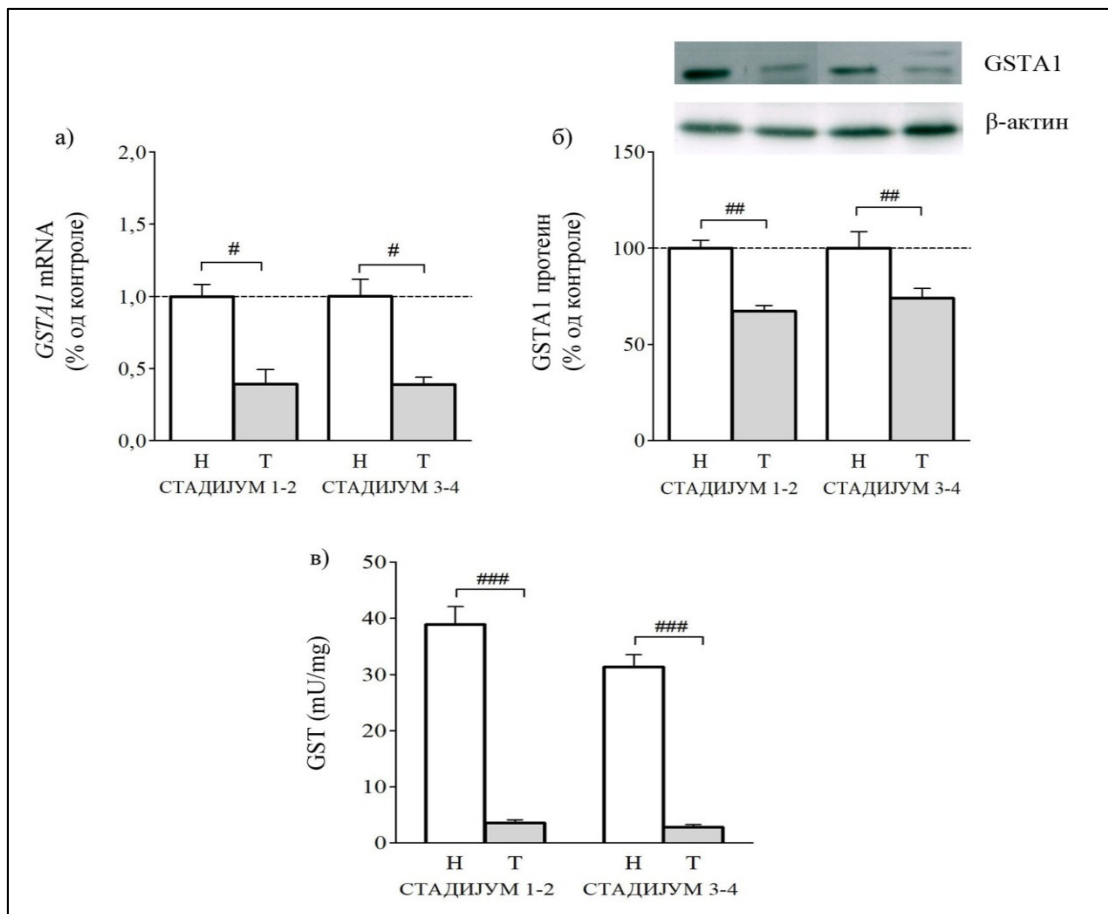
4.2.5.6 Експресија глутатион трансферазе у односу на стадијум тумора

За разлику од градуса, стадијум RCC није у вези са променом експресије GST. Варирање *GSTA1* mRNA је одлика малигног ткива бубрега па је у обе групе RCC измерена 2,5 пута мања количина mRNA ($p=0,0104$, $p=0,0117$, редом, Вилкоксон тест) у односу на контролно ткиво (Слика 27а).

Независно од стадијума, малигно ткиво бубрега је имало нижи ниво *GSTA1* протеина у поређењу са здравом контролом ($p=0,0015$, $p=0,0064$, редом, t-тест) (Слика 27б). У RCC, без обзира на стадијум, GST активност је била на граници детекције ($p<0,001$, t-тест) (Слика 27в).



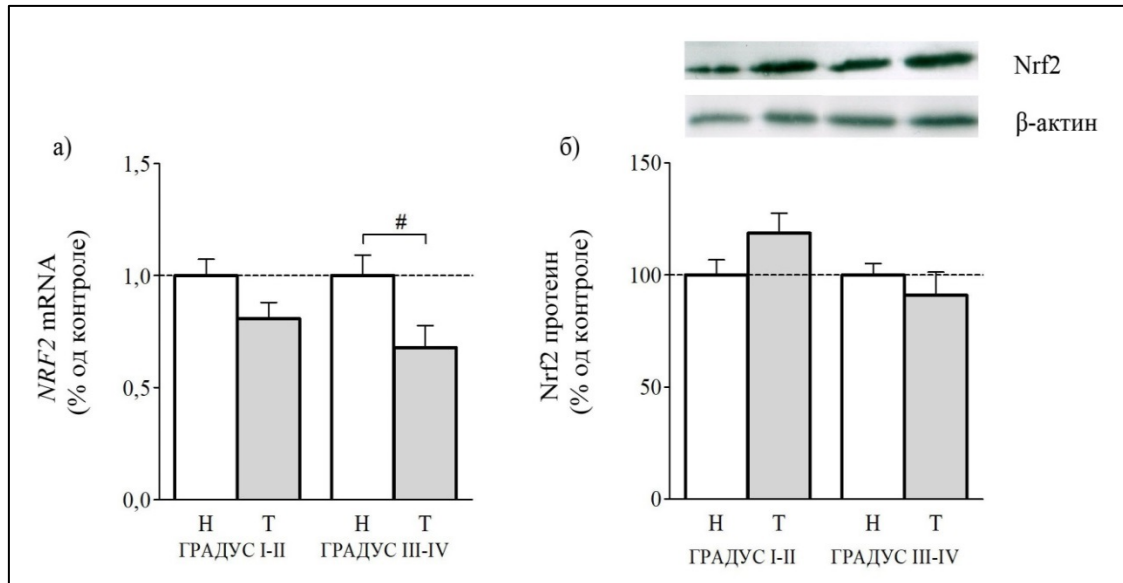
Слика 26. Функционална експресија глутатион редуктазе (GR) у здравом ткиву (H) и туморима различитих стадијума (T) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина GR mRNA; б) релативна количина GR протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност GR изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Симболи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$, а) Вилкоксон тест; б) и в) t-тест.



Слика 27. Функционална експресија глутатион трансферазе (GST) у здравом ткиву (Н) и туморима различитих стадијума (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *GSTA1* mRNA; б) релативна количина *GSTA1* протеина са репрезентативним имуноблотовима; в) ензимска активност GST изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg). Резултати за релативну количину mRNA и протеина су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Символи показују статистички значајне разлике између поређених група: #- $p < 0,05$ Вилкоксон тест; ##- $p < 0,01$; ###- $p < 0,001$ t-тест.

4.2.6 Експресија *Nrf2* у односу на градус тумора

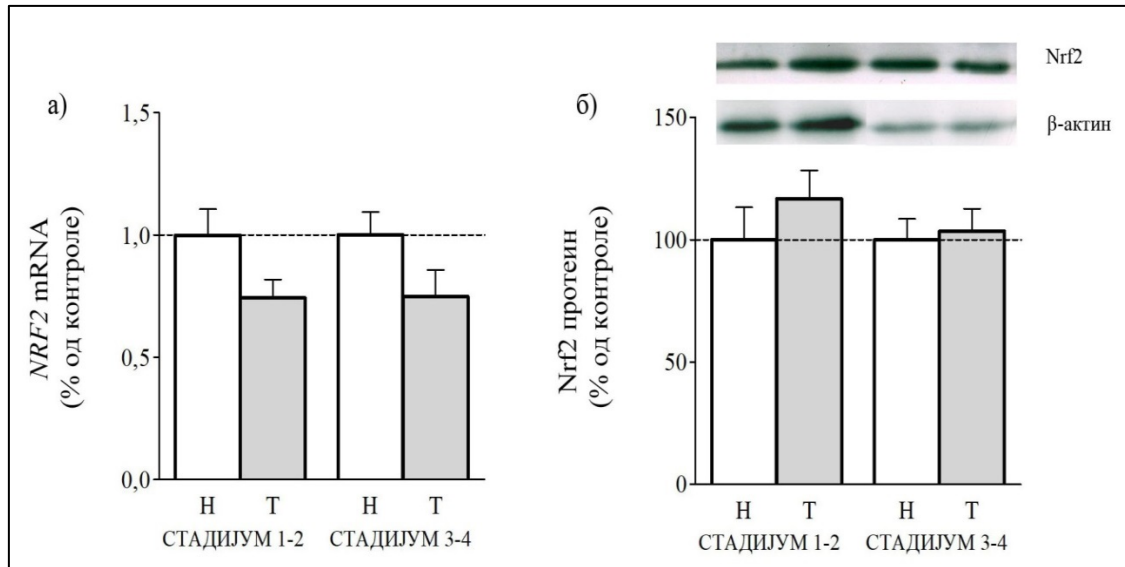
RCC виших градуса су имали 1,5 пута мању количину *NRF2* mRNA у односу на здраво ткиво ($p = 0,0241$, Вилкоксон тест) (Слика 28а). Код нискоградусних RCC није регистрована значајна промена на нивоу *NRF2* mRNA ($p = 0,1502$, Вилкоксон тест). Ниво *Nrf2* протеина је остао непромењен како у нискоградусним, тако и у високоградусним туморима ($p = 0,4077$, $p = 0,6913$, редом, t-тест), у поређењу са здравим ткивом (Слика 28б).



Слика 28. Функционална експресија Nrf2 у здравом ткиву (Н) и туморима различитих градуса (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина NRF2 mRNA; б) релативна количина Nrf2 протеина са репрезентативним имуноблотовима. Резултати су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Символ показује статистички значајну разлику између поређених група: #- $p < 0,05$, Вилкоксон тест.

4.2.7 Експресија Nrf2 у односу на стадијум тумора

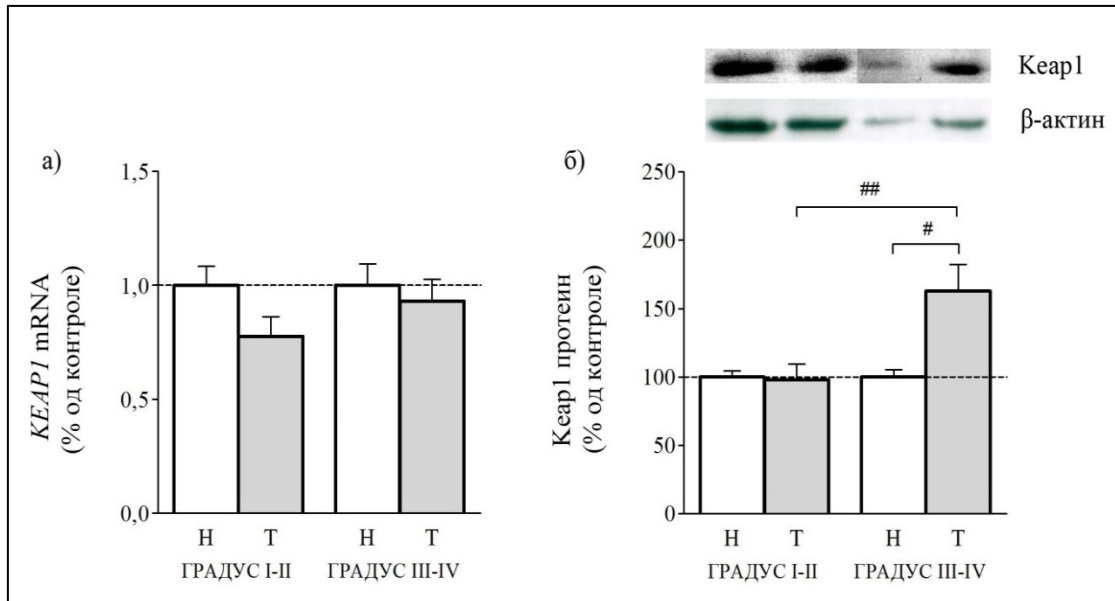
Резултати студије показују да није било промене у експресији *NRF2* гена у односу на стадијум тумора. У малигном ткиву је уочен пад у количини *NRF2* mRNA у поређењу са здравим ткивом, али ова промена није била статистички значајна у вишим стадијумима RCC ($p=0,1243$, t-тест) док је у нижим стадијумима била на граници статистичке значајности ($p=0,0506$, t-тест) (Слика 29а). Ниво Nrf2 протеина је остао непромењен како у нижим, тако и у вишим стадијумима RCC ($p=0,4709$, $p=0,8244$, редом, t-тест) (Слика 29б).



Слика 29. Функционална експресија Nrf2 у здравом ткиву (Н) и туморима различитих стадијума (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина NRF2 mRNA; б) релативна количина Nrf2 протеина са репрезентативним имуноблотовима. Резултати су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка.

4.2.8 Експресија Кеар1 у односу на градус тумора

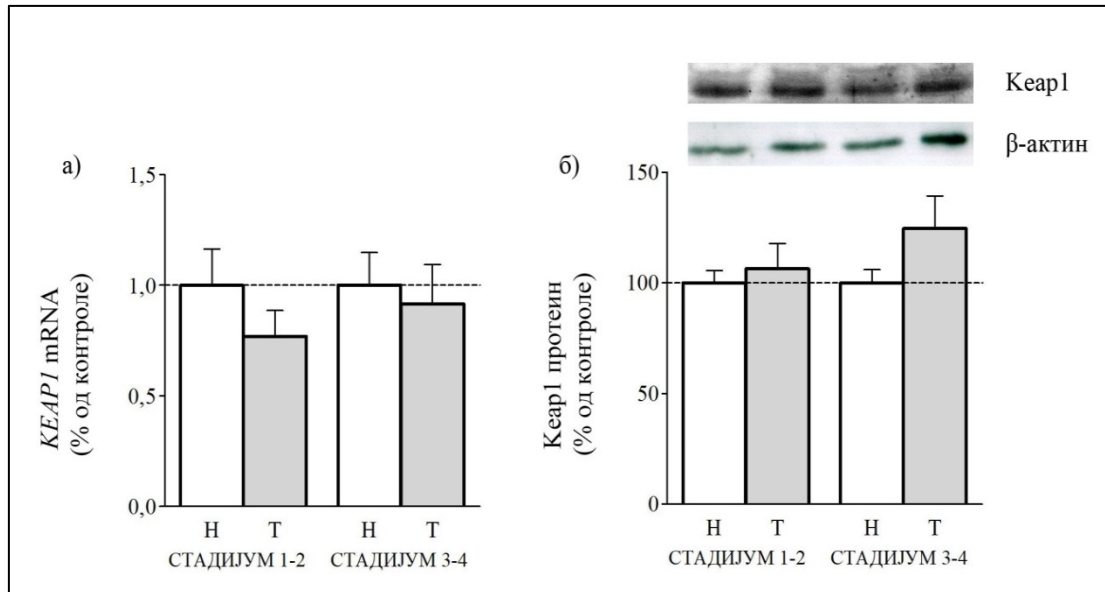
Нискоградусни, као ни високоградусни RCC, нису показали промену у релативној количини KEAP1 mRNA у поређењу са здравим ткивом бубрега ($p=0,0663$, $p=0,7747$, редом, Вилкоксон тест) (Слика 30а). Ниво Кеар1 протеина је остао непромењен у нижим градусима ($p=0,9061$, Вилкоксон тест), док је у вишим уочен пораст од 63% ($p=0,025$, Вилкоксон тест) у односу на контролно ткиво (Слика 30б). Такође, високоградусни RCC су имали значајно виши ниво Кеар1 протеина у односу на нискоградусне RCC ($p=0,0060$, Мен-Витни тест).



Слика 30. Функционална експресија Кеар1 у здравом ткиву (Н) и туморима различитих градуса (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *KEAP1* mRNA; б) релативна количина Кеар1 протеина са репрезентативним имуноблотовима. Резултати су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка. Симболи показују статистички значајну разлику између поређених група: #- $p < 0,05$, Вилкоксон тест; ##- $p < 0,01$, Мен-Витни тест.

4.2.9 Експресија Кеар1 у односу на стадијум тумора

Експресија *KEAP1* гена се није значајно мењала у односу на стадијум тумора. Релативна количина *KEAP1* mRNA је остала непромењена у нижим и вишим стадијумима RCC у поређењу са контролом ($p=0,2394$, $p=0,7168$, редом t-тест) (Слика 31а). Резултати Вилкоксон теста су показали да у обе групе RCC није било значајне промене нивоа Кеар1 протеина ($p=0,3212$, $p=0,2237$, редом) (Слика 31б).



Слика 31. Функционална експресија Keap1 у здравом ткиву (Н) и туморима различитих стадијума (Т) код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега. а) релативна количина *KEAP1* mRNA; **б)** релативна количина Keap1 протеина са репрезентативним имуноблотовима. Резултати су изражени као проценти (%) у односу на здраво (контролно) ткиво које је представљено као вредност 1 или 100%. Подаци на хистограму су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка.

4.3 УТИЦАЈ ПАРАМЕТАРА АНТИОКСИДАТИВНЕ ЗАШТИТЕ И ЛИПИДНЕ ПЕРОКСИДАЦИЈЕ НА УКУПНО ПРЕЖИВЉАВАЉЕ ПАЦИЈЕНАТА

Утицај антиоксидативних параметара и параметра липидне пероксидације на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC је анализиран на кохорти коју је чинило 95 пацијената од којих је узорковано здраво и туморско ткиво бубрега. Измерене вредности ензимске активности и концентрације GSH и MDA су подељене у две групе на основу медијане која је узета као гранична вредност [139]. Вредности испод граничне (\leq медијана) су сматране за ниже, а оне изнад граничне вредности ($>$ медијана) за више.

4.3.1 Опште одлике пацијената од којих је узорковано ткиво

Клиничко-патолошке одлике пацијената су представљене у Табели 10. Већина пацијената је била старости од 61 до 70 година, а полови су били готово подједнако заступљени. Просечна величина тумора је била 7 cm (IQR=5-8.2 cm), а највећи број тумора је био величине до 7 cm (63,1%). Код већине пацијената су дијагностиковани тумори ниског градуса (69,5%) и тумори првог (38,9%) и трећег стадијума (42,1%). Од хистолошких подтипова, најзаступљенији је био светлоћелијски (77,9%).

Табела 10. Клиничко-патолошке одлике пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега од којих је узорковано ткиво (n=95).

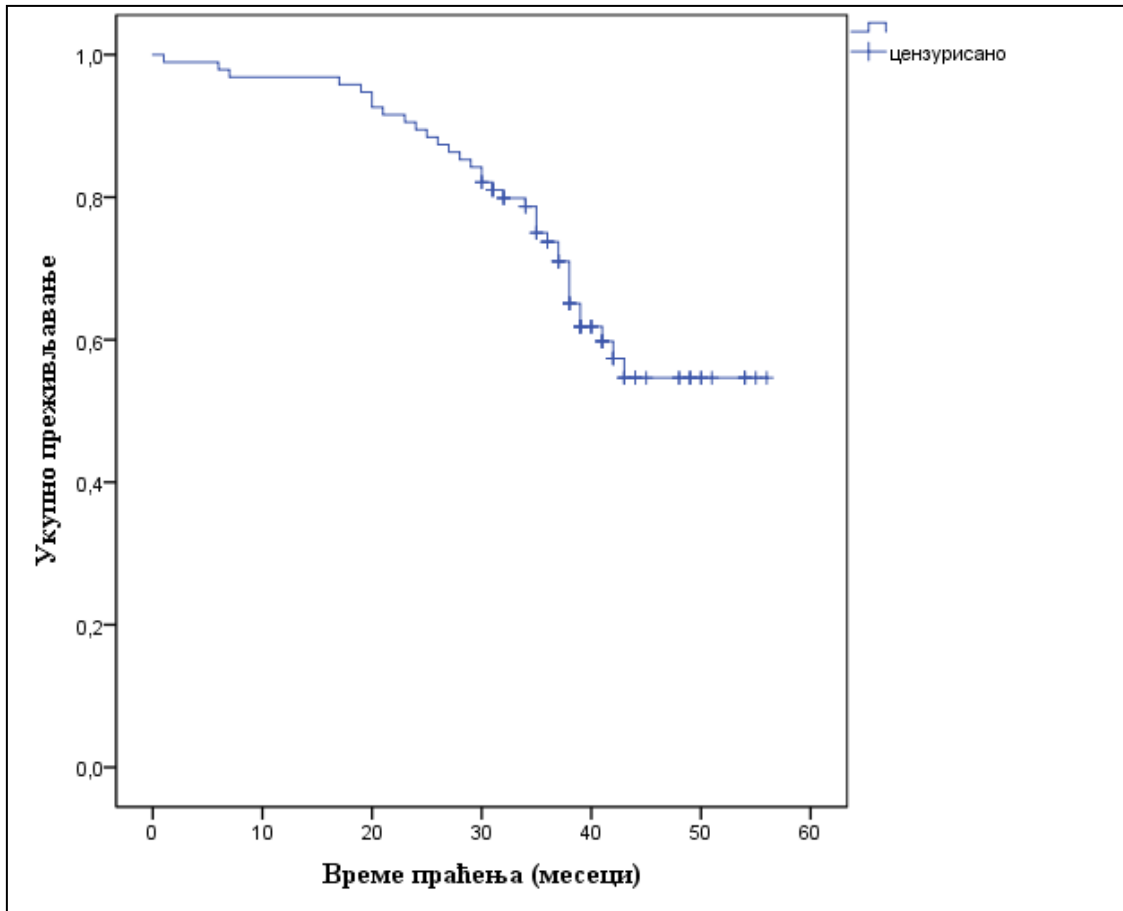
Одлике	n (%)
Старост (године)	
≤50	17 (17,9)
51-60	18 (18,9)
61-70	43 (45,3)
>70	17 (17,9)
Пол	
Мушки	51 (53,7)
Женски	44 (46,3)
Величина тумора (cm)	
≤4	18 (18,9)
4,1-7	42 (44,2)
7,1-10	18 (18,9)
>10	17 (17,9)
Градус	
Ниски (I-II)	66 (69,5)
Високи (III-IV)	29 (30,5)
Стадијум	
1	37 (38,9)
2	14 (14,7)
3	40 (42,1)
4	4 (4,2)
Хистолошки подтип	
Светлоћелијски	74 (77,9)
Папиларни	13 (13,7)
Хромофобни	8 (8,4)

4.3.2 Утицај активности антиоксидативних ензима, концентрације глутатиона и малондиалдехида на укупно преживљавање пацијената

Укупно преживљавање пацијената је износило 96,8%, 73,7% и 54,6% након једне, три и пет година (Табела 11, Слика 32).

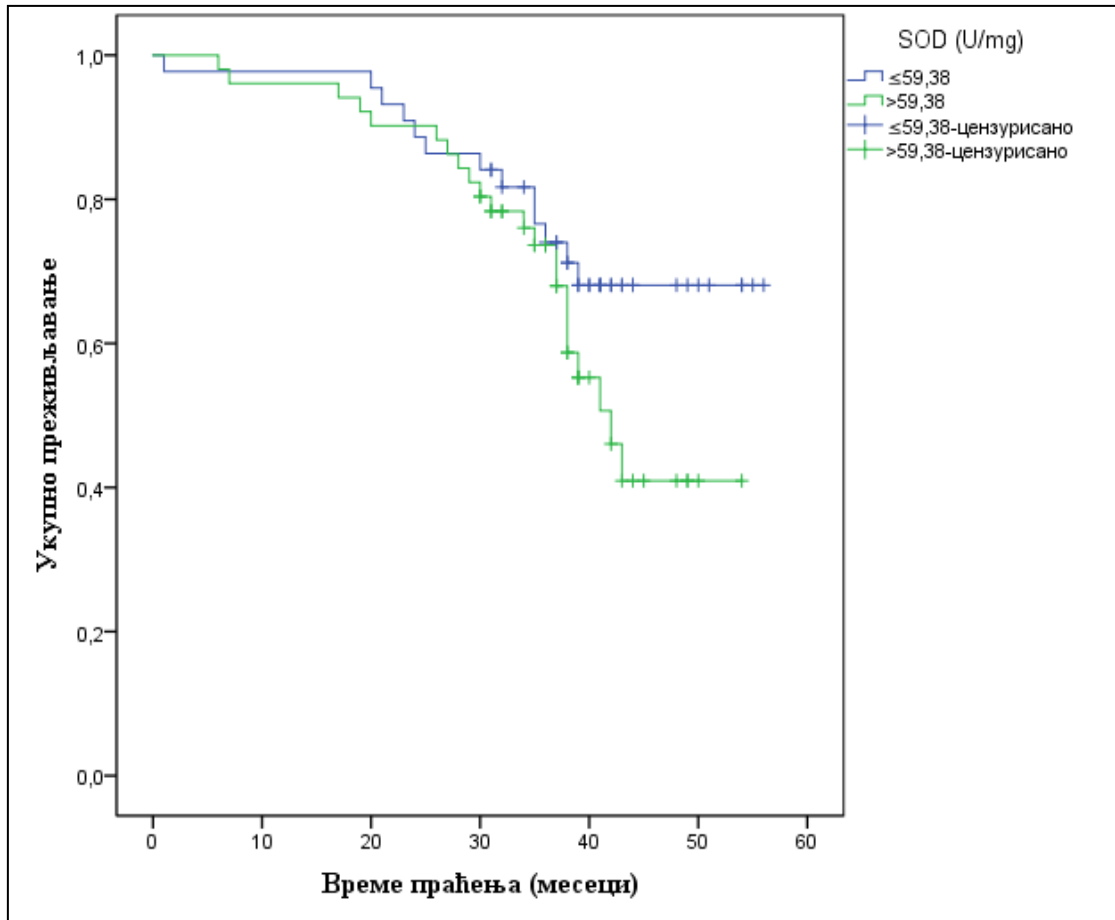
Табела 11. Укупно преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на активност антиоксидативних ензима и концентрацију глутатиона и малондиалдехида. Преживљавање пацијената (%) је одређено Каплан-Мајер методом, а групе анализираних параметара су поређене Log-Rank тестом (χ^2). Статистичка значајност је тестирана на нивоу од 5% ($p < 0,05$).

	Месеци	Преживљавање (%)					p
		12	24	36	48	60	
Укупно		96,8	89,5	73,7	54,6	54,6	
АО параметар							
SOD (U/mg)							
≤59,38		97,7	88,6	74	68,1	68,1	$\chi^2=2,373$
>59,38		96,1	90,2	73,3	40,9	40,9	p=0,123
CAT (U/mg)							
≤10,22		95,6	86,7	64,7	40,4	40,4	$\chi^2=2,418$
>10,22		98	92	81,8	65,6	65,6	p=0,120
GPx (mU/mg)							
≤3,36		97,7	93	78,3	65	65	$\chi^2=3,506$
>3,36		93,5	87	68,6	41	41	p=0,061
GR (mU/mg)							
≤7,53		98	87,8	75,5	70	70	$\chi^2=3,063$
>7,53		95,1	91,3	71,7	29,8	29,8	p=0,080
GST (mU/mg)							
≤3,33		98,1	90,6	78,8	57,3	57,3	$\chi^2=0,907$
>3,33		95,1	87,8	66,7	54,3	54,3	p=0,341
GSH (nmol/mg)							
≤58,26		100	88,6	81,4	64,9	64,9	$\chi^2=3,188$
>58,26		93,3	91,1	65,8	41,8	41,8	p=0,062
MDA (nmol/mg)							
≤2,03		100	95,2	75,4	54,7	54,7	$\chi^2=0,208$
>2,03		93,6	85,1	71,6	52,3	52,3	p=0,648



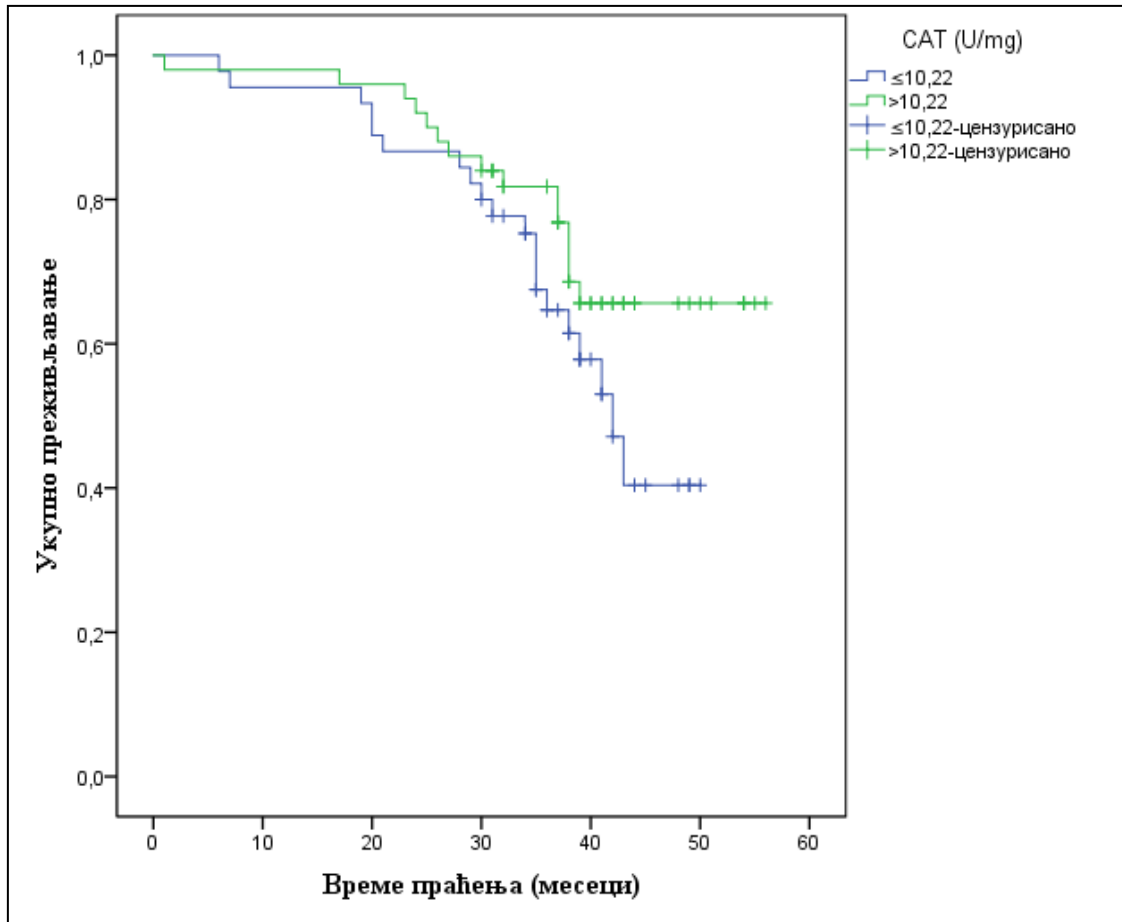
Слика 32. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања у анализираној кохорти коју је чинило 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега од којих је узорковано ткиво.

Активност SOD није значајно ($\chi^2=2,373$, $p=0,123$, Log-Rank тест) утицала на укупно преживљавање пацијената са RCC. Након 60 месеци, укупно преживљавање пацијената са нижом активношћу SOD ($\leq 59,38$ U/mg) је било 68,1%, а код пацијената са повишеном активношћу SOD ($>59,38$ U/mg) 40,9% (Табела 11, Слика 33).



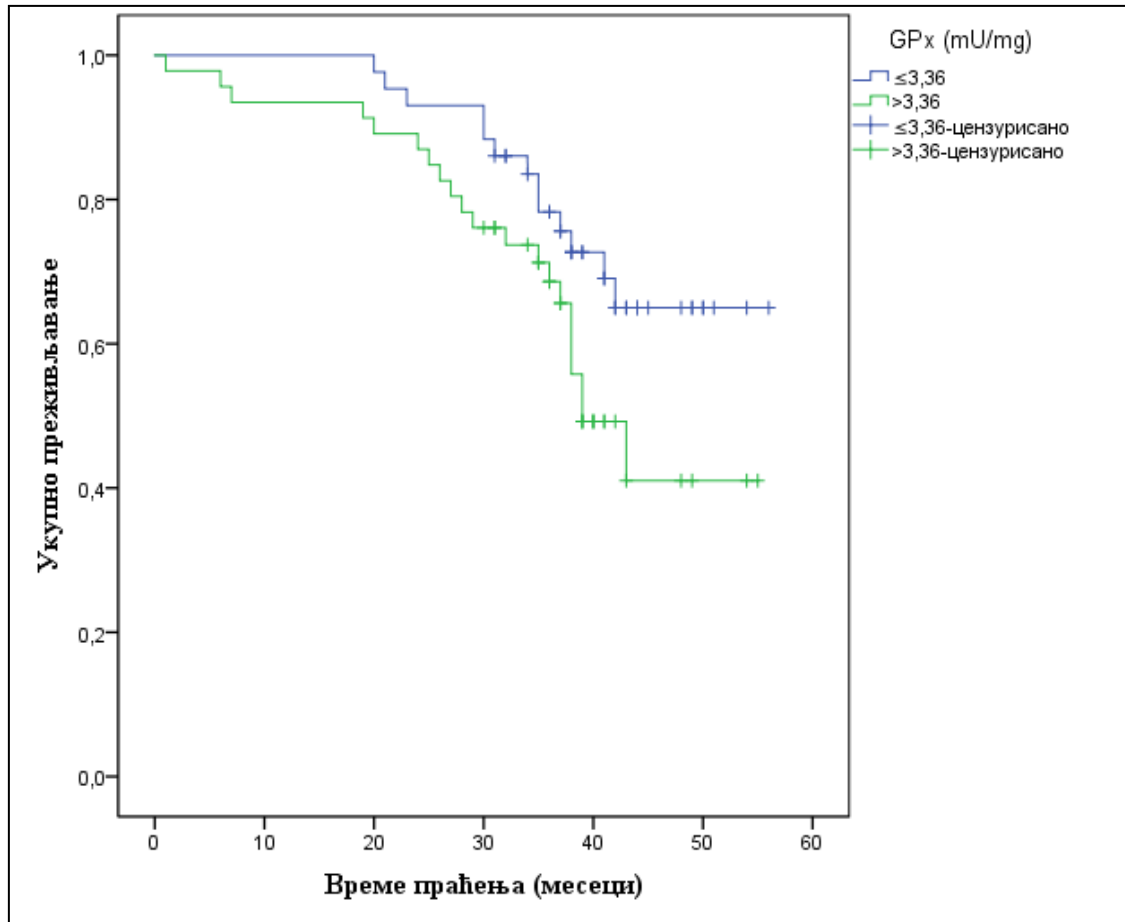
Слика 33. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на укупну активност супероксид дисмутазе (SOD). Активност SOD је изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg), а медијана (59,38) је представљала граничну вредност на основу које су дефинисане анализиране групе.

Веза између САТ активности и укупног преживљавања се није показала статистички значајном ($\chi^2=2,418$, $p=0,120$, Log-Rank тест). Након пет година, стопа преживљавања пацијента код којих је измерена нижа САТ активност ($\leq 10,22$ U/mg) је износила 40,4%, а 65,6% код испитаника са повишеном активношћу САТ ($>10,22$ U/mg) (Табела 11, Слика 34).



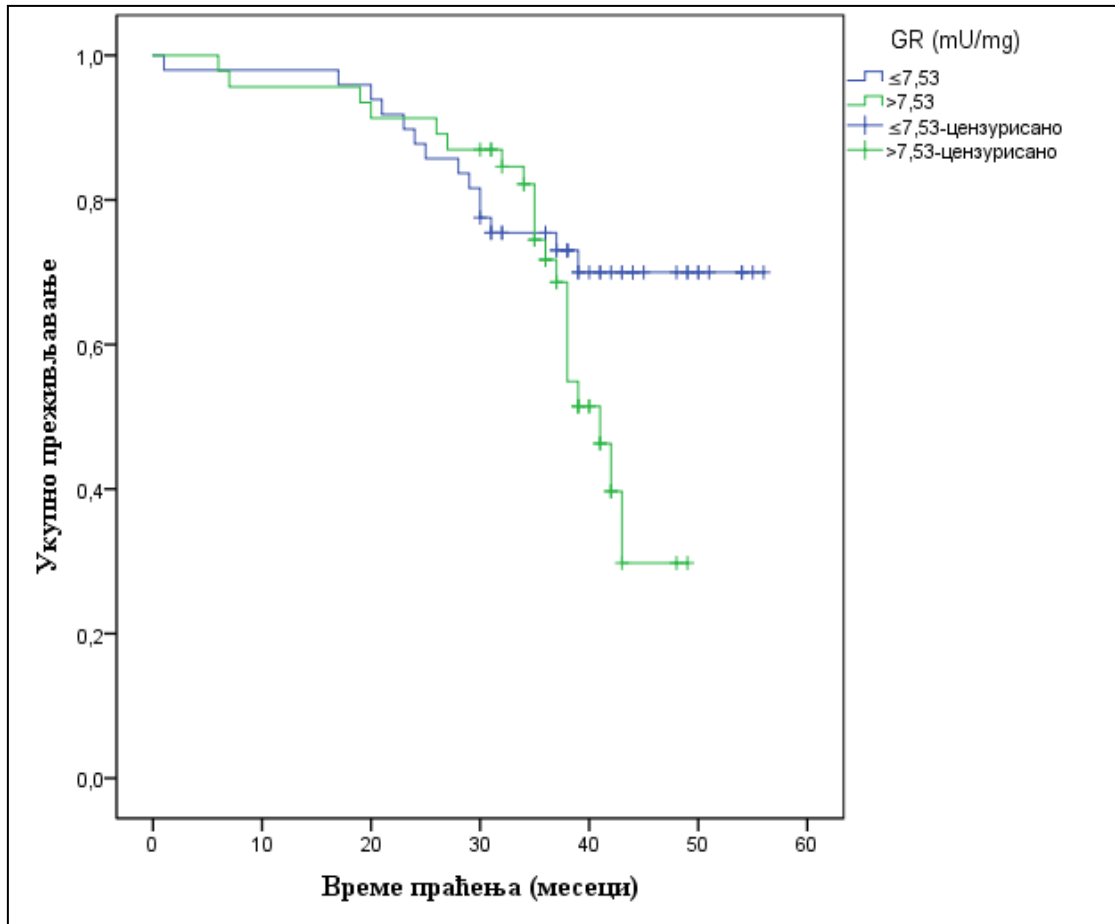
Слика 34. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на активност каталазе (CAT). Активност CAT је изражена у јединицама по милиграму укупних протеина (U/mg), а медијана (10,22) је представљала граничну вредност на основу које су дефинисане анализиране групе.

Утицај активности GPx на преживљавање пацијената је био на граници статистичке значајности ($\chi^2=3,506$, $p=0,061$, Log-Rank тест). Стопа преживљавања пацијената са нижом вредношћу GPx активности ($\leq 3,36$ mU/mg) је износила 97,7%, 78,3% и 65% након 12, 36 и 60 месеци, док је у групи испитаника са вишом GPx активношћу ($> 3,36$ mU/mg) у истим временским интервалима износила 93,5%, 68,6% и 41% (Табела 11, Слика 35).



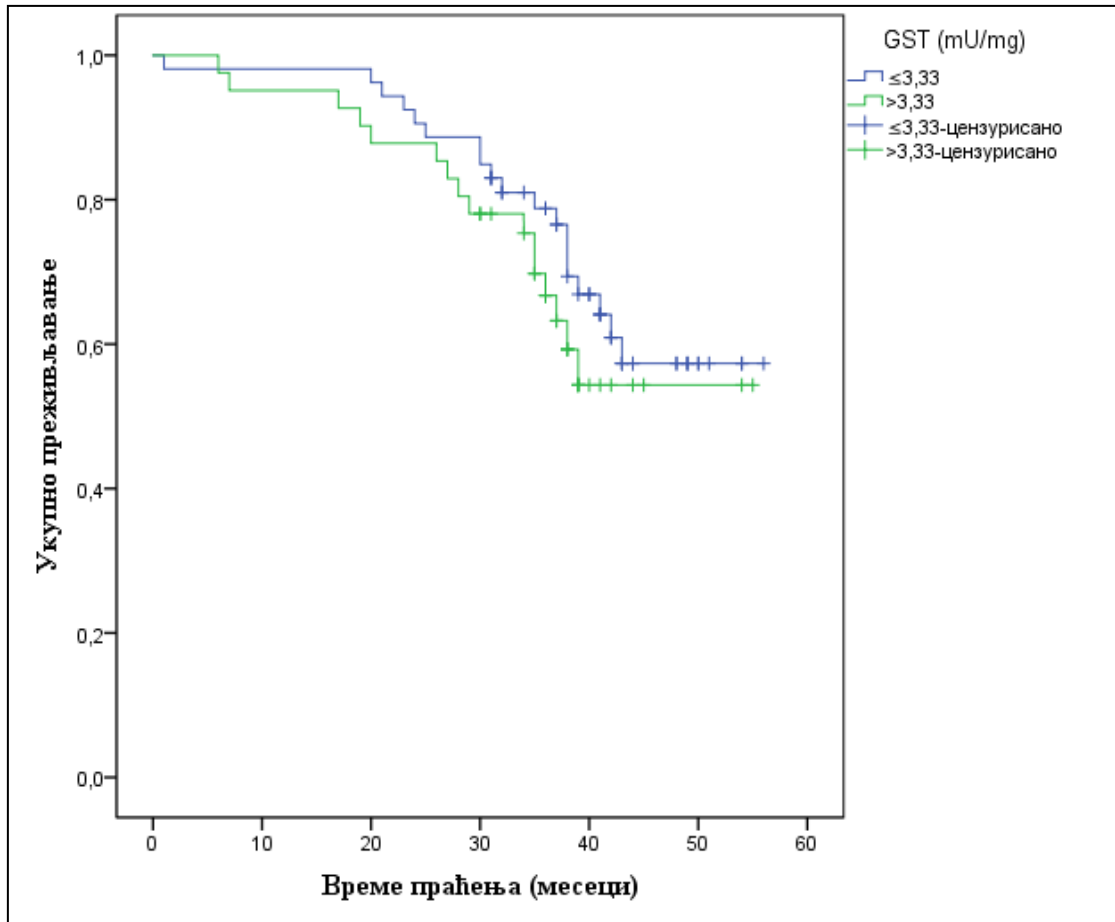
Слика 35. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на активност глутатион пероксидазе (GPx). Активност GPx је изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg), а медијана (3,36) је представљала граничну вредност на основу које су дефинисане анализиране групе.

У групи пацијената са нижом активношћу GR ($\leq 7,53$ U/mg) стопе укупног преживљавања за 12, 36 и 60 месеци су износиле 98%, 75,5% и 70%, а у другој групи ($> 7,53$ U/mg) 95,1%, 71,7% и 29,8% (Табела 11, Слика 36). Уочена разлика у преживљавању између две групе испитаника је била на граници статистичке значајности ($\chi^2=3,063$, $p=0,080$, Log-Rank тест).



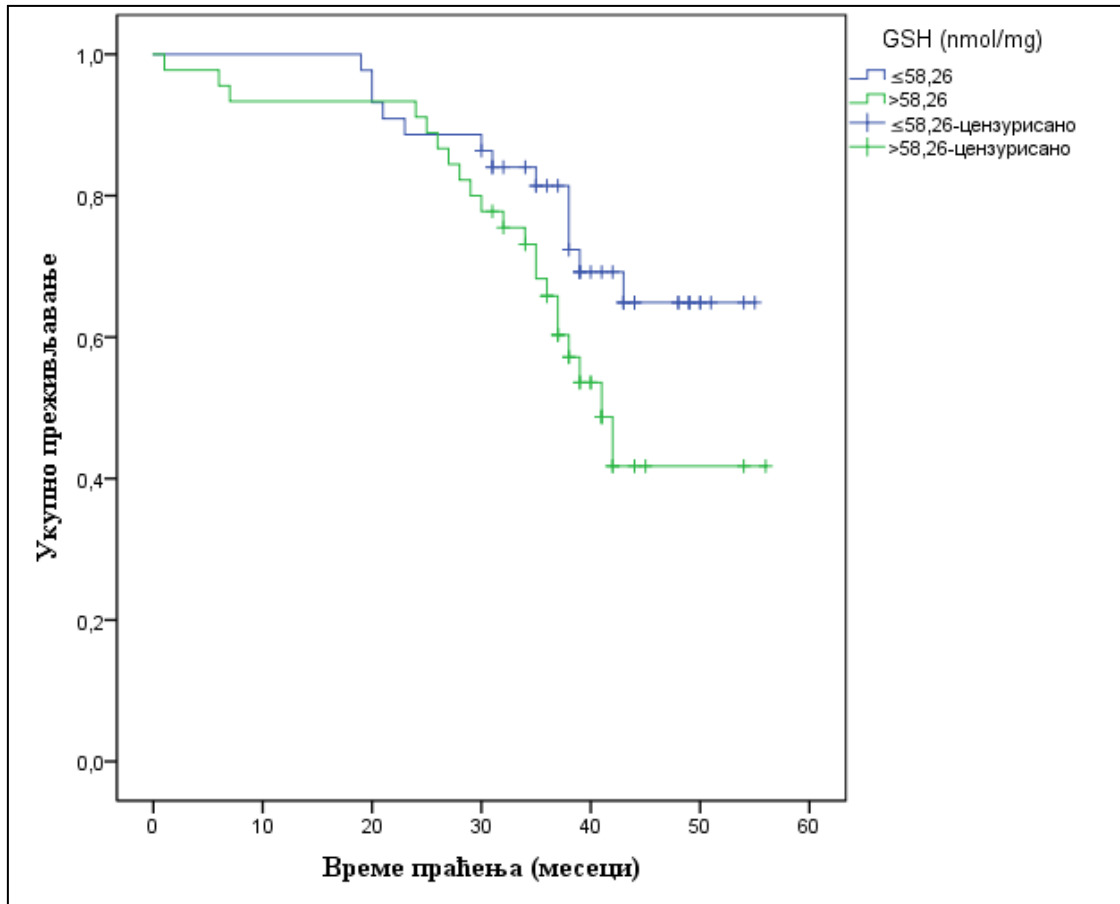
Слика 36. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на активност глутатион редуктазе (GR). Активност GR је изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg), а медијана (7,53) је представљала граничну вредност на основу које су дефинисане анализиране групе.

Активност GST није имала значајан утицај на преживљавање пацијената ($\chi^2=0,907$, $p=0,341$, Log-Rank тест). Пацијенти са нижом ($\leq 3,33$ mU/mg) и вишом ($> 3,33$ mU/mg) активношћу GST су имали готово једнаку стопу преживљавања након 60 месеци (57,3% и 54,3%) (Табела 11, Слика 37).



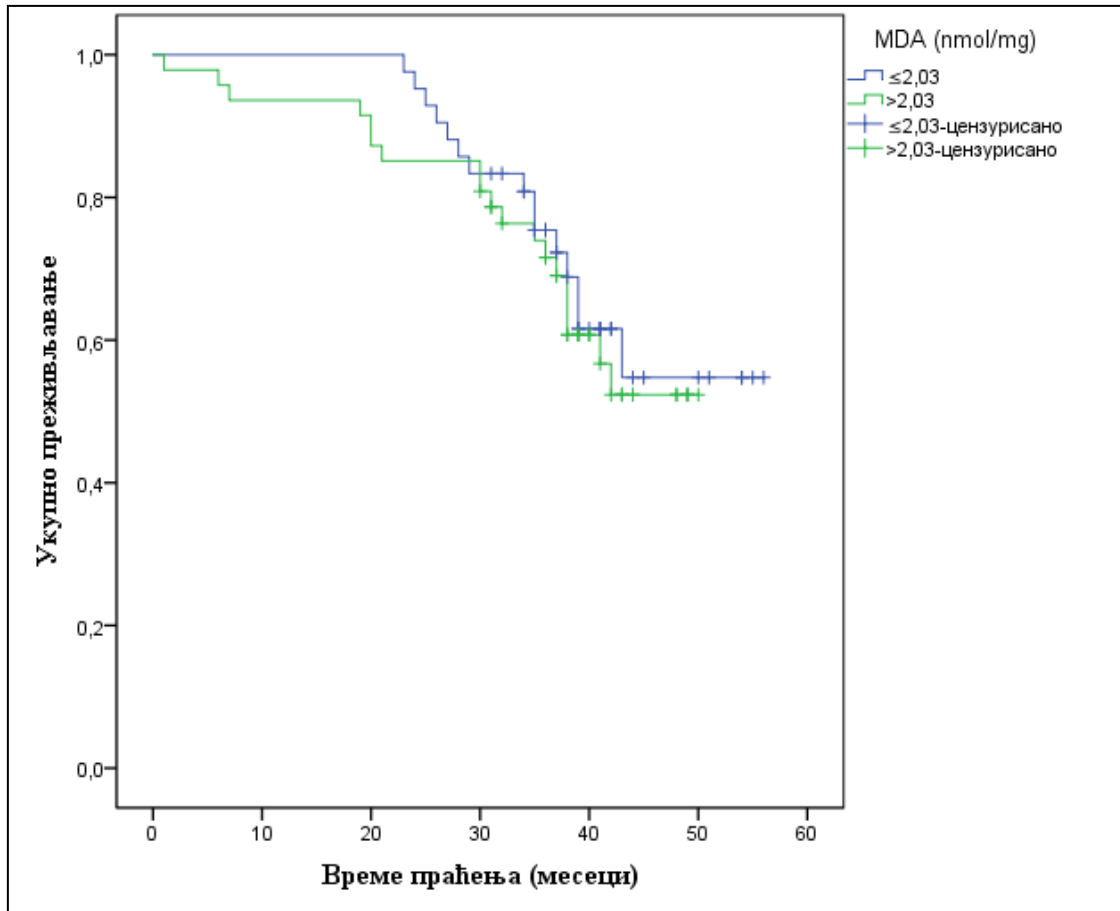
Слика 37. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на активност глутатион трансферазе (GST). Активност GST је изражена у милијединицама по милиграму укупних протеина (mU/mg), а медијана (3,33) је представљала граничну вредност на основу које су дефинисане анализиране групе.

Утицај концентрација GSH на преживљавање пацијената са RCC је био на граници статистичке значајности ($\chi^2=3,188$, $p=0,062$, Log-Rank тест). У групи испитаника са нижом концентрацијом GSH ($\leq 58,26$ nmol/mg) стопе преживљавања након 12, 36 и 60 месеци су биле 100%, 81,4% и 64,9%, док су у групи са вишом концентрацијом GSH ($>58,26$ nmol/mg) износиле 93,3%, 65,8% и 41,8% (Табела 11, Слика 38).



Слика 38. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на концентрацију глутатиона (GSH). Концентрација GSH је изражена у наномолима по милиграму укупних протеина (nmol/mg), а медијана (58,26) је представљала граничну вредност на основу које су дефинисане анализиране групе.

Анализом утицаја концентрације MDA на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC није уочена статистички значајна разлика ($\chi^2=0,208$, $p=0,648$, Log-Rank тест) између дефинисаних група. Петогодишње стопе преживљавања за анализиране групе су биле готово једнаке. Тако је преживљавање у групи са нижом концентрацијом MDA ($\leq 2,03$ nmol/mg) износило 54,7%, а у групи са вишом MDA концентрацијом ($> 2,03$ nmol/mg) 52,3% (Табела 11, Слика 39).



Слика 39. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на концентрацију малондиалдехида (MDA). Концентрација MDA је изражена у наномолима по милиграму укупних протеина (nmol/mg), а медијана (2,03) је представљала граничну вредност на основу које су дефинисане анализиране групе.

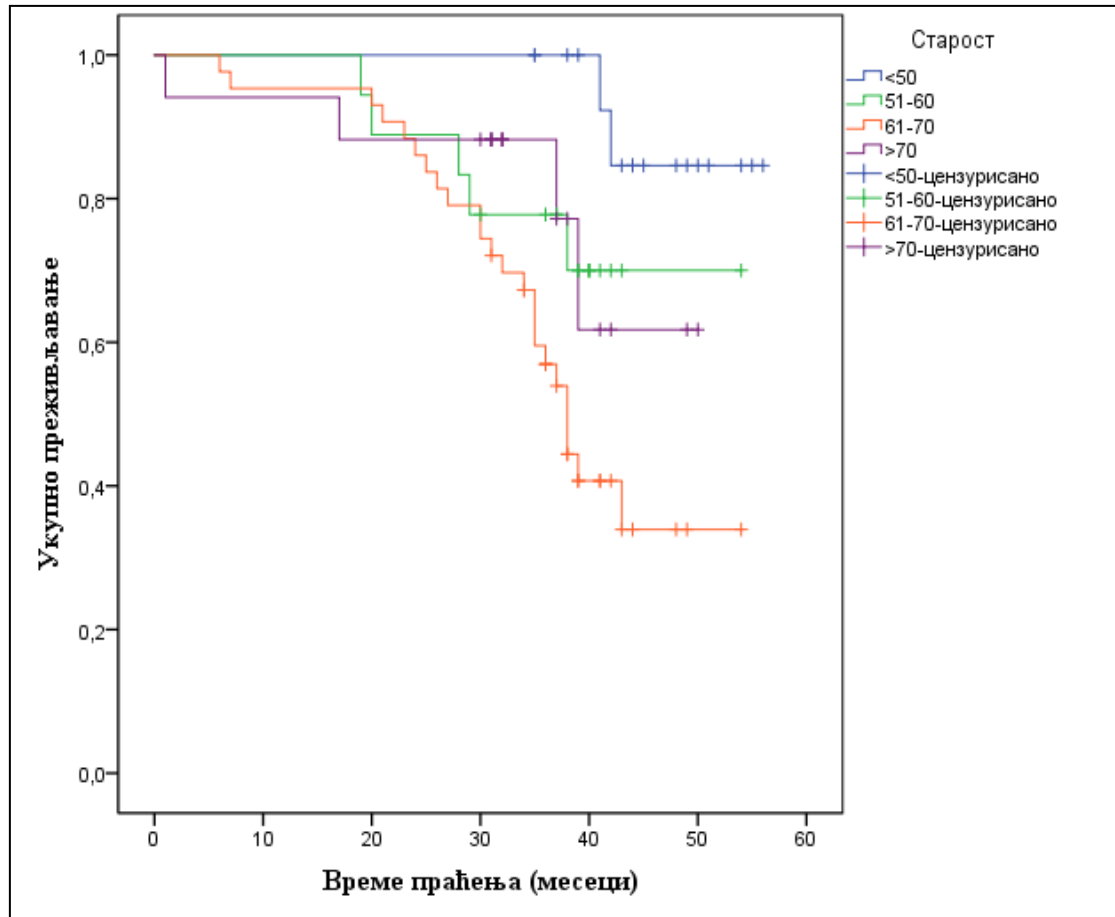
4.3.3 Утицај клиничко-патолошких одлика на преживљавање пацијената

Укупно преживљавање пацијената у односу на клиничко-патолошке параметре је приказано у **Табели 12**.

Табела 12. Укупно преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на клиничко-патолошке параметре у кохорти коју је чинило 95 испитаника од којих је узорковано ткиво. Преживљавање пацијената (%) је одређено Каплан-Мајер методом, а групе клиничко-патолошких параметара су поређене Log-Rank тестом (χ^2). Симбол (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

Месеци	Преживљавање (%)					p
	12	24	36	48	60	
Старост (године)						
≤50	100	100	100	84,6	84,6	$\chi^2=13,999$ $p=0,003^*$
51-60	100	88,9	77,8	70	70	
61-70	95,3	86	56,9	33,9	33,9	
>70	94,1	88,2	88,2	61,8	61,8	
Пол						
Мушки	98	90,2	71,2	52,6	52,6	$\chi^2=0,02$ $p=0,962$
Женски	95,5	88,6	76,7	56,9	56,9	
Величина тумора (cm)						
≤4	100	88,9	77,8	70,7	70,7	$\chi^2=22,540$ $p<0,001^*$
4,1-7	97,6	92,9	87,7	70,4	70,4	
7,1-10	100	100	68,8	60,2	60,2	
>10	88,2	70,6	41,2	0	0	
Градус						
Ниски (I-II)	97	95,5	82,1	64,3	64,3	$\chi^2=12,080$ $p=0,001^*$
Високи (III-IV)	96,6	75,9	55,2	34,5	34,5	
Стадијум						
1	97,3	94,6	89,1	77,2	77,2	$\chi^2=26,217$ $p<0,001^*$
2	100	100	90,9	77,9	77,9	
3	92,5	82,5	61,9	34	34	
4	100	75	0	0	0	
Хистол. подтип						
Светлоћелијски	95,9	90,5	74,7	61,4	61,4	$\chi^2=2,424$ $p=0,298$
Папиларни	100	76,9	69,2	36,9	36,9	
Хромофобни	100	100	64,3	0	0	

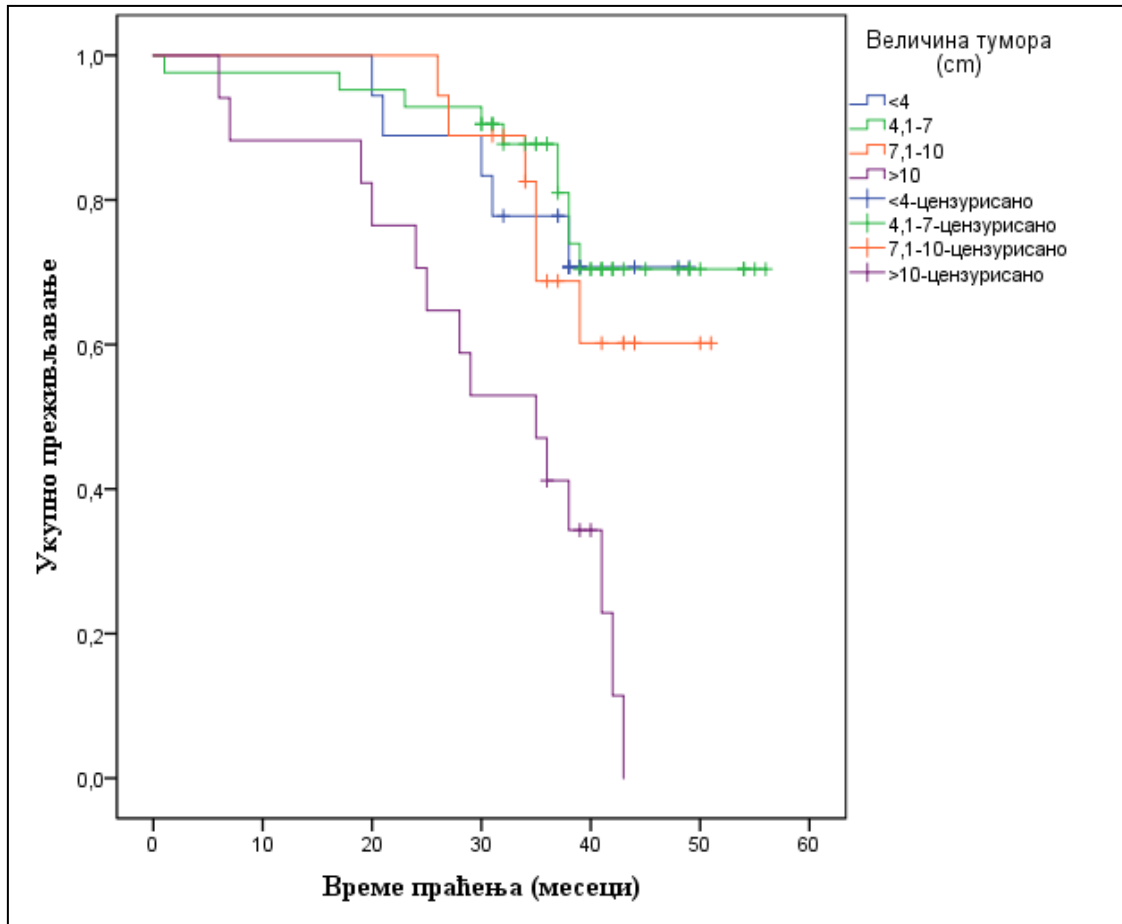
Резултати су показали статистички значајну разлику у преживљавању између старосних група пацијената ($\chi^2=13,999$, $p=0,003$, Log-Rank тест). Након 60 месеци преживљавање испитаника по старосним групама је износило: 84,6% у групи пацијената млађих од 50 година, 70% за оне старости од 51-60 година, 33,9% у групи старости од 61-70 година и 61,8% код старијих од 70 година (Табела 12, Слика 40).



Слика 40. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на старост.

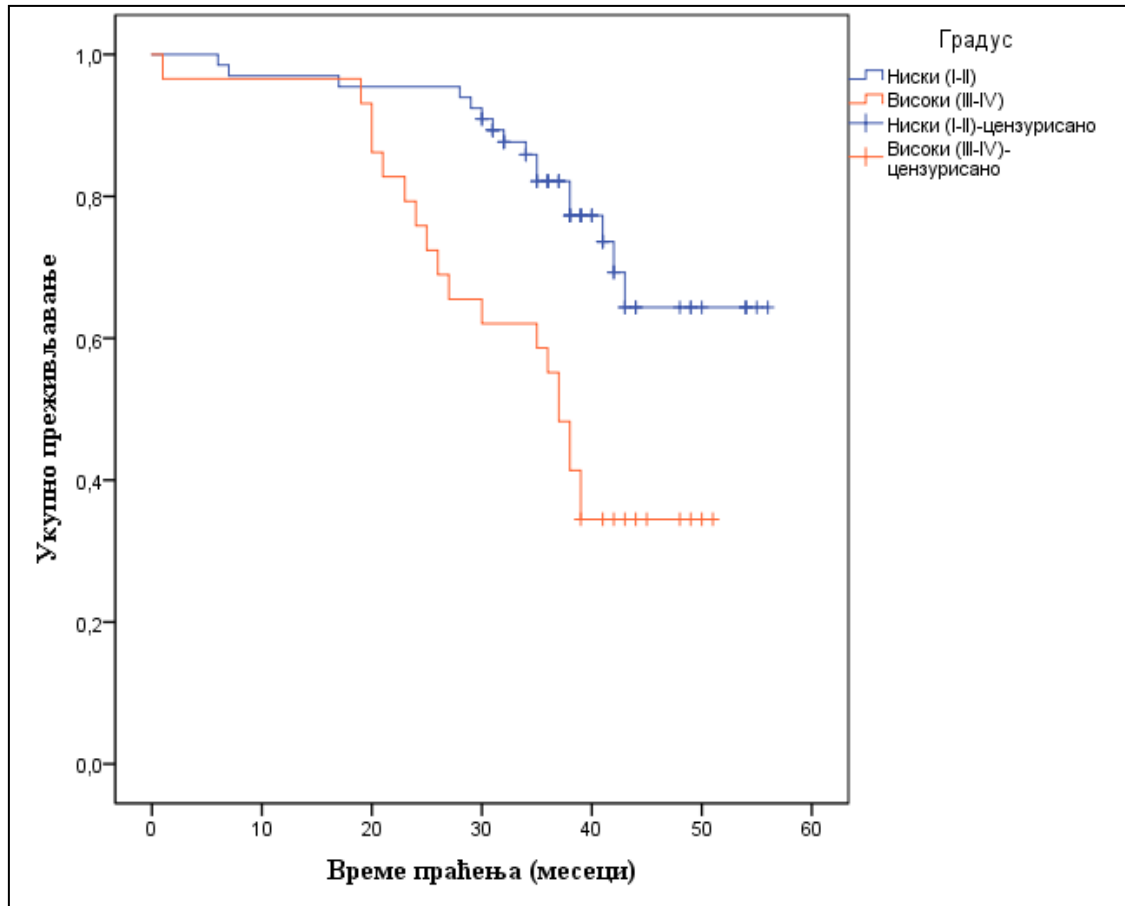
Није уочена значајна разлика у преживљавању између пацијената различитих полова ($p=0,962$). На крају периода праћења, укупно преживљавање је било готово једнако. Стопа преживљавања код мушкараца је износила 52,6%, а код жена 56,9% (Табела 12).

Дужина укупног преживљавања пацијената је зависила ($p<0,001$) од величине дијагностикованих тумора. Након 12, 36 и 60 месеци, стопе преживљавања пацијената у зависности од величине тумора су износиле: 100%, 77,8% и 70,7% у групи са туморима величине ≤ 4 cm; 97,6%, 87,7% и 70,4% у групи са величинном тумора од 4,1-7 cm; 100%, 68,8% и 60,2% у групи са туморима величине од 7,1-10 cm; 88,2%, 41,2% и 0% у групи са туморима величине >10 cm (Табела 12, Слика 41).



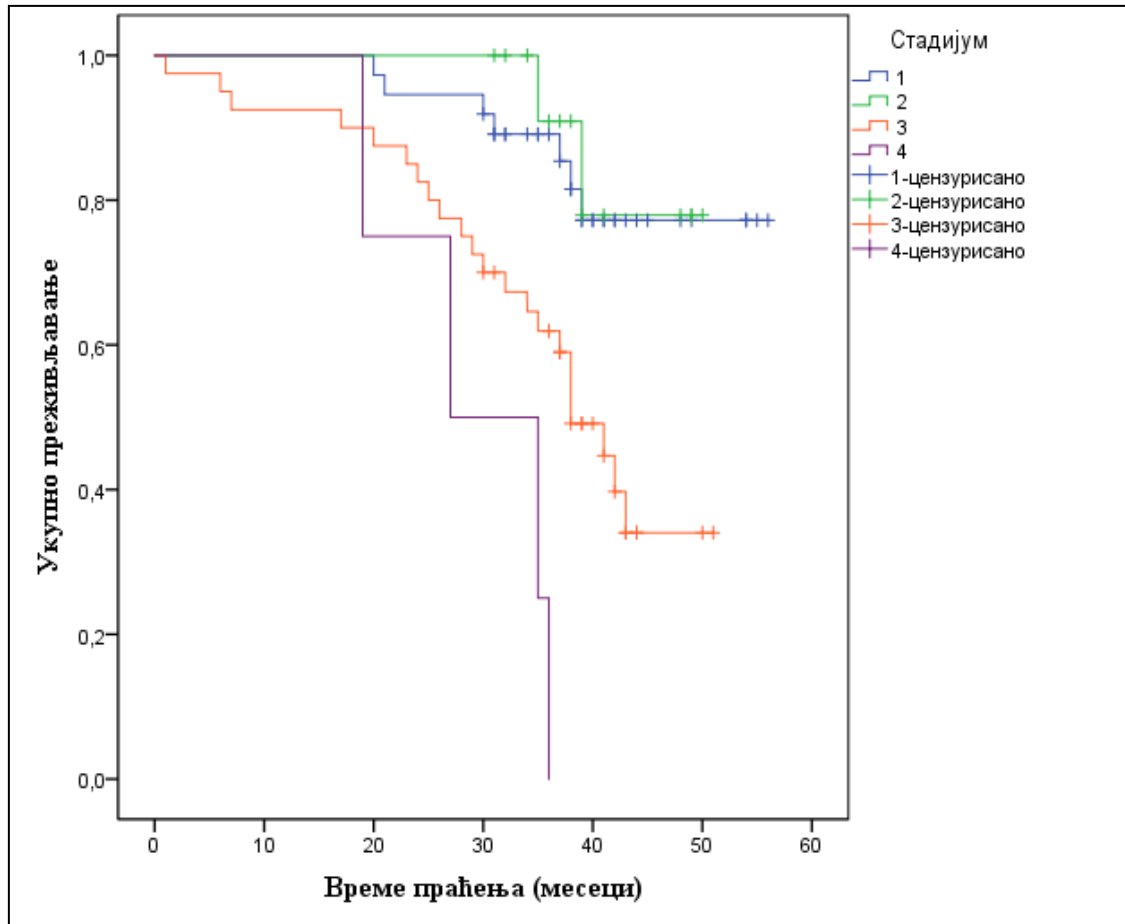
Слика 41. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на величину тумора.

Градус се још једном показао статистички значајним ($p=0,001$) за преживљавање пацијената. Петогодишња стопа преживљавања пацијената са туморима ниског градуса износила је 64,3% а код пацијената са туморима високог градуса 34,5% (Табела 12, Слика 42).



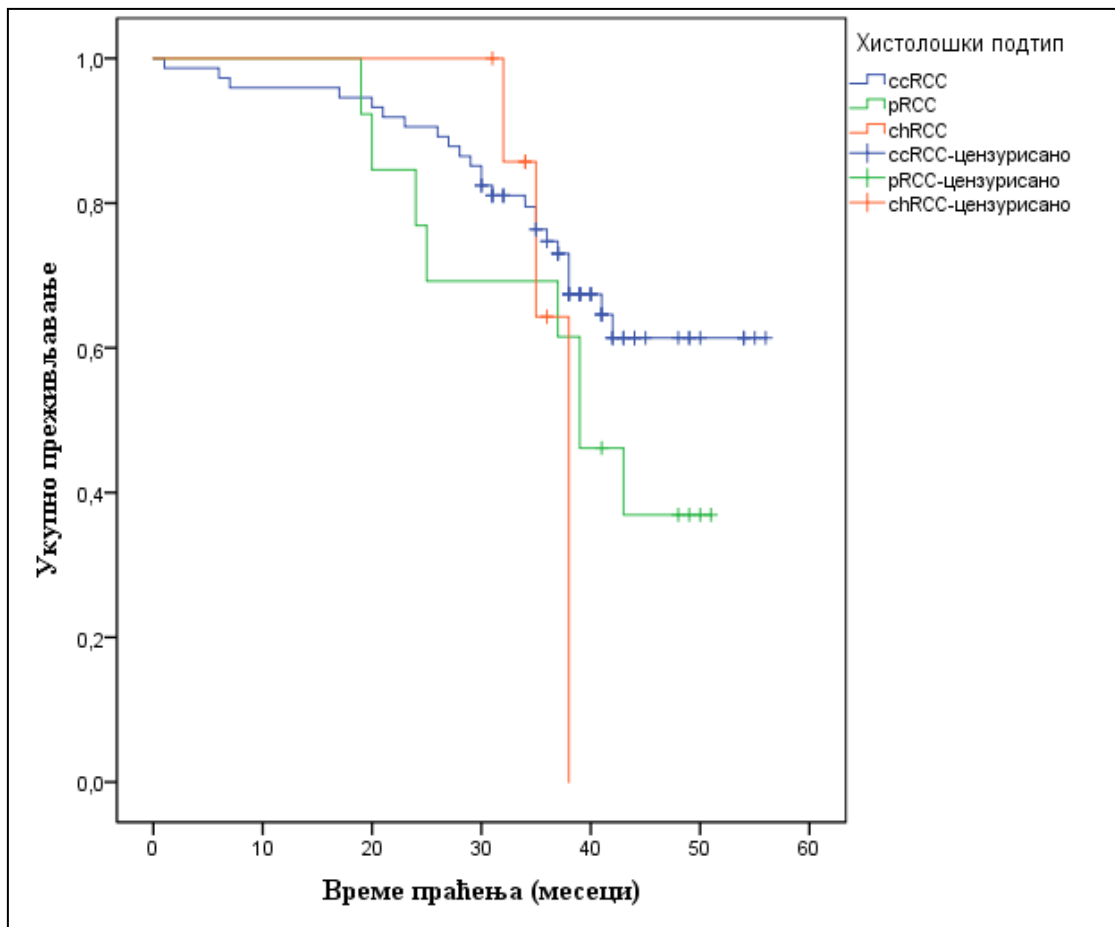
Слика 42. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на градус тумора. Градуси тумора су подељени у две групе: Ниски (тумори I и II градуса) и Високи (тумори III и IV градуса).

Стадијум тумора је значајно ($p < 0,001$) утицао на укупно преживљавање пацијената (Табела 12). Након 60 месеци, преживљавање испитаника са туморима првог и другог стадијума износило је 77,2% и 77,9%, а свега 34% код пацијената са туморима трећег стадијума. Нико од пацијената са туморима четвртог стадијума није био жив на крају петогодишњег периода праћења (Слика 43).



Слика 43. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на стадијум тумора.

Хистолошки подтип није показао статистички значајан утицај ($p=0,298$) на укупно преживљавање пацијената са RCC (Слика 44). Виша стопа преживљавања је забележена код испитаника са ccRCC (61,4%) у односу на оне са pRCC (36,9%), док је код пацијената са chRCC преживљавање износило 100%, 64,3% и 0% након 12, 36 и 60 месеци (Табела 12).



Слика 44. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега у односу на хистолошки подтип тумора. Анализиране групе су чинили пацијенти са следећим хистолошким подтиповима: светлоћелијски (ccRCC), папиларни (pRCC) и хромофобни (chRCC).

4.3.4 Предикциони потенцијал антиоксидативних параметара

Како би се утврдили предиктори преживљавања пацијената оболелих од RCC урађена је униваријантна и мултиваријантна регресиона анализа. У ову анализу су укључени клиничко-патолошки параметри који су статистички значајно утицали на преживљавање пацијената током петогодишњег периода праћења (величина тумора, градус и стадијум), као и АО параметри (GPx, GR и GSH) за које су р-вредности биле на граници статистичке значајности.

Након униваријанте анализе (Табела 13), као независни предиктори су се издвојили величина тумора ($p < 0,001$), градус ($p = 0,001$) и стадијум тумора

($p < 0,001$). У истој табели се види да су сва три анализирана АО параметра на граници статистичке значајности .

Табела 13. Униваријантна регресиона анализа утицаја клиничко-патолошких и антиоксидативних параметара на укупно преживљавање 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега од којих је узорковано ткиво. HR-однос шанси (енг. *hazard ratio*); CI-интервал поверења (енг. *confidence interval*). Символ (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

Варијабла	HR	95% CI	p
Величина тумора (cm)			<0,001*
≤4	1,0	-	
4,1-7	0,8	0,3-2,4	0,698
7,1-10	1,2	0,4-3,8	0,803
>10	4,1	1,5-11,5	0,007*
Градус			
Ниски (I-II)	1,0	-	
Високи (III-IV)	3,1	1,6-5,9	0,001*
Стадијум			<0,001*
1	1,0	-	
2	0,8	0,2-3,6	0,707
3	3,6	1,5-8,4	0,003*
4	11,9	3,4-42,0	<0,001*
GPx (mU/mg)			
≤3,36	1,0		
>3,36	1,9	0,9-3,8	0,068
GR (mU/mg)			
≤7,53	1,0		
>7,53	1,8	0,9-3,6	0,087
GSH (nmol/mg)			
≤58,26	1,0		
>58,26	1,9	0,9-3,9	0,068

Мултиваријантна анализа је потврдила величину тумора ($p=0,023$), градус ($p < 0,001$) и стадијум ($p=0,030$) тумора као значајне предикторе преживљавања пацијената оболелих од RCC (Табела 14).

Табела 14. Мултиваријантна регресиона анализа утицаја клиничко-патолошких одлика на укупно преживљавање 95 пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега од којих је узорковано ткиво. HR-однос шанси (енг. *hazard ratio*); CI-интервал поверења (енг. *confidence interval*). Симбол (*) означава статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

Варијабла	HR	95% CI	p
Величина тумора (cm)			0,023*
≤4	1,0		
4,1-7	0,4	0,1-1,2	0,090
7,1-10	0,4	0,09-1,5	0,153
>10	1,4	0,4-5,2	0,611
Градус			
Ниски (I-II)	1,0	-	
Високи (III-IV)	4,4	1,9-9,9	<0,001*
Стадијум			0,101
1	1,0	-	
2	0,9	0,2-4,9	0,925
3	3,3	1,1-9,8	0,030*
4	2,3	0,4-12,4	0,335

5. ДИСКУСИЈА

Тубуларни карцином бубрега (RCC) је најчешћи облик неоплазије бубрега који са своја три хистолошка подтипа обухвата преко 90% свих случајева. Инциденца RCC је порасла последњих деценија, између осталог и услед ране дијагностике што је последица употребе ултразвучне сонографије, магнетне резонанце и компјутеризоване томографије. Уз помоћ ових дијагностичких метода више од половине RCC бива случајно откривено прегледом због неког другог медицинског проблема [13]. Инциденца карцинома бубрега у Србији је релативно ниска у поређењу са већином европских земаља. Међутим, број оболелих константно расте код оба пола што је праћено и порастом морталитета. И даље се спроводе истраживања у циљу утврђивања прогностичких параметара на основу којих би се пацијенти са RCC стратификовали у ризичне групе.

5.1 ПЕТОГОДИШЊЕ ПРЕЖИВЉАВАЊЕ ПАЦИЈЕНАТА У ЗАВИСНОСТИ ОД КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИХ ОДЛИКА ТУМОРА

Петогодишње преживљавање испитаника укључених у ову студију је износило око 63% што је у складу са ранијим истраживањима. Тако је у Европи у периоду од 2000. до 2007. године укупно преживљавање пацијената износило 60,6% у поређењу са 72,4% колико је забележено у периоду од 2004. до 2010. године од стране SEER (енг. *Surveillance Epidemiology and End Results*) [4]. Старост, величина тумора, градус и стадијум су се издвојили као независни предикциони фактори (униваријантна анализа). Након мултиваријантне анализе, само су градус и стадијум тумора били статистички значајно повезани са укупним преживљавањем.

Пацијенти који су чинили анализирану кохорту су у највећем броју били у седмој деценији живота (43,8%) (**Табела 5**). Ово је уједно и старосна доб када се највише оболева од RCC. Испитаници старији од 60 година су имали значајно краће преживљавање у поређењу са онима у шестој деценији живота и млађима. Ово је потврђено и униваријантном анализом (**Табела 8**) која је показала да

пацијенти старости од 61-70 година и они преко 70 година имају 5,2, односно 6 пута, већи ризик од смртог исхода. Претходне студије [140], поред седме деценије живота, истичу и шесту као фактор са повећаним ризиком за неповољан исход, али то у овој студији није потврђено.

Полна дистрибуција је одлика RCC и огледа се у већем обољевању и смртности код мушкараца у односу на жене. У овој студији је однос полова био 1,4:1 у корист мушкараца (**Табела 5**), што је у складу са налазима Европског удружења за урологију [141]. Такође је потврђена веза између хистолошког подтипа и пола ($p=0,0009$), која се огледа у већој преваленци мушког пола код ccRCC и pRCC (**Табела 6**). Средински фактори (изложеност на раду, пушење, гојазност) доводе до општег повећања ризика за RCC [142], али не могу објаснити разлике у обољевању између полова. Повећање ризика за обољевања од RCC међу женама након хистеректомије [143] указује на потенцијалану улогу хормона у етиологији ове болести. *Ju и сар. (2013)* [144] су потврдили да естроген успорава раст ћелија RCC и индукује апоптозу, а да је главни ефектор деловања овог хормона ER β (енг. *estrogen receptor β*). Повећана експресија ER β је у вези са смањеним ризиком за обољевање од RCC и дужим укупним преживљавањем пацијената са RCC [144]. Мутације на X-везаним генима који немају свој хомолог на Y-хромозому (хемизиготи) могу бити потенцијални узрок већег обољевања од RCC код мушкараца. *Ван Хафтен и сар. (2009)* су забележили мутације на *UTX* гену (лоциран на Хр11.2) у туморском ткиву RCC пацијената [145]. Овај ген кодира хистон деметилазу H3K27 (енг. *H3 lysine 27 demethylase*) која врши модификацију хистона и има тумор супресивну функцију. Нижа *UTX* експресија је у вези са лошијом прогнозом и краћим укупним преживљавањем код пацијената са ccRCC [146]. Иако литературни подаци показују да мушкарци носе већи ризик за обољевање од RCC и имају нижу стопу преживљавања, резултати ове докторске дисертације су показали лошији исход код особа женског пола. Међутим, није било статистички значајне разлике у преживљавању међу половима.

Величина тумора је важна детерминанта патолошког стадијума тумора која је у корелацији са инвазијом тумора у ренални синус, потенцијалом за настанак метастаза и прогнозом [147]. У овој студији је показано да тумори већи

од 4 cm имају лошију прогнозу. Ризик од смрти код пацијената са тумором величине од 4,1-7 cm и од 7,1-10 cm био је 1,2 и 2,8 пута већи од оних код којих су тумори били <4 cm. Испитанци са тумором већим од 10 cm су имали чак 5 пута већи ризик од смртог исхода (**Табела 8**). Међутим, на основу резултата ове студије, величина тумора од 7 cm се може сматрати граничном тј. од значаја за укупно преживљавање пацијената са RCC. Наиме, пацијенти са туморима већим од ове вредности су имали значајно већи ризик за смртни исход (униваријантна анализа). Објашњење за повећан ризик од смртог исхода код RCC тумора већих од 7 cm делом лежи и у њиховој корелацији са вишим градусима. *Томсон и сар (2009)* су утврдили да у 59% случајева тумори већи од 7 cm су уједно и високог градуса, а да пораст у величини тумора за један центиметар увећава шансе за развој тумора високог градуса за чак 25% [148]. Исти аутори су показали да тумори већи од 7 cm у преко 90% случајева имају малигну форму. Величина тумора је фактор који је значајно утицао на преживљавање испитаника у овој студији и имао је предикциони потенцијал посматран независно од других параметара (униваријантна анализа), али након мултиваријантне анализе његова значајност није потврђена. Ово је делом у складу са литературним подацима, јер је показано да је прогностички значај величине тумора ограничен на RCC првог стадијума (pT1) [149, 150] који обухвата туморе бубрега величине до 7 cm.

Иако постоје различити системи за одређивање нуклеусног градуса тумора, систем по Фурману је најчешће у употреби. Неке студије су указале да Фурманов систем има прогностички значај само уколико су подаци груписани као тумори ниског (I-II) и тумори високог градуса (III-IV) [147, 151]. У овој студији, није утврђен значајан утицај овог параметра на укупно преживљавање пацијената уколико градуси нису груписани. Из тог разлога, у свим анализама градуси тумора су били груписани у две поменуте групе. Ово је донекле у складу са Фурмановим оригиналним извештајем у коме су тумори II и III градуса, посматрани независно, имали слично преживљавање као када су груписани, а статистички значајно другачије у односу на I и IV градус [147]. Већина тумора (64,3%) анализираних у овој студији је била ниског градуса, док је високи градус имало 35,7% анализираних узорака (**Табела 5**). Овакав однос је у складу са претходним налазима [152], а највероватније је последица ране дијагностике

услед употребе неинвазивних техника попут ултразвука, компјутеризоване томографије и магнетне резонанце [153]. Примена ових техника је у значајном мери повећала проценат случајно откривених RCC [154]. Уочена корелација између нуклеусног градуса и хистолошког подтипа се огледала у већем броју тумора ниског градуса код ccRCC (70,4%) и chRCC (71,4%), и већег броја тумора високог градуса (61,1%) код pRCC (**Табела 6**). Сличан однос је добијен у ранијим студијама [140, 155]. Већина pRCC у овој студији је припадала типу 2 који је углавном високог градуса [156]. Нуклеусни градус је, у овој студији, значајно утицао на укупно преживљавање пацијената са RCC. Испитаници са тумором високог градуса су имали 2,6 пута већи ризик за негативан исход болести у односу на оне са туморима ниског градуса (**Табела 8**). Мултиваријантном анализом је дефинитивно потврђено да је градус фактор који има прогностички значај код оболелих од RCC (**Табела 9**). Прогностички значај градуса уочен у овој студији је у складу са ранијим налазима. Већина аутора се слаже да је поред стадијума градус најзначајнији независни предикциони фактор за RCC [157-160].

Удео пацијената са туморима првог и другог стадијума је био незнатно већи (55,1%) у односу на оне са туморима трећег и четвртог стадијума (44,9%). Према литератури, специфично преживљавање болести (енг. *disease specific survival*, DSS) пацијената са туморима првог стадијума је 80-95%, пацијената са туморима другог стадијума 75-95%, а испитаника са туморима трећег стадијума око 60% [161, 162]. Током периода интензивне употребе цитокина у терапији RCC тзв. „ере цитокина“ (1980-2006) DSS код пацијената са тумором четвртог стадијума је износило мање од 10%, а просечно укупно преживљавање је било 16-20 месеци [162, 163]. Циљана терапија, која полако потискује имунотерапију, је повећала просечно укупно преживљавање пацијената са четвртим стадијумом RCC за две године [164]. У поређењу са поменутиим студијама, налази ове студије су слични за пацијенте са туморима првог и другог стадијума, јер је забележено преживљавање износило 79% и 81%. Код пацијената са туморима трећег стадијума су забележене нешто ниже вредности укупог преживљавања од 42%, а код оних са четвртим стадијумом тумора преживљавање је износило 33%. Униваријантна анализа је показала да су тумори трећег и четвртог стадијума носиоци ризика за смртни исход. Наиме, пацијенти са туморима трећег и четвртог

стадијума су имали 6,9 односно 10,7 пута већи ризик за негативна исход болести (Табела 8). У прилог налазима ове студије иде и снажна веза између RCC тумора трећег и четвртог стадијума и метастаза. Показано је да су тумори виших стадијума склонији метастазама у поређењу са онима првог и другог стадијума [37]. Мултиваријантна анализа (Табела 9) је потврдила ове налазе па се стадијум тумора може сматрати клиничко-патолошким фактором који има снажан предикциони потенцијал код пацијената са RCC. Налази ове студије су у складу са литературним подацима [158].

Резултати ове студије су показали очигледне разлике у преживљавању пацијената са различитим хистолошким подтипом RCC. Пацијенти са pRCC су имали најлошију стопу укупног преживљавања (53,5%) док су испитаници са chRCC имали најбољи исход (76,2%) (Табела 7). Ипак, хистолошки подтип није потврђен као независни предиктор преживљавања код RCC пацијената. Према неким ауторима pRCC је у вези са значајно бољим исходом у поређењу са ccRCC [37], док други нису утврдили значајну разлику у преживљавању између ова два подтипа RCC [165]. Нижа стопа преживљавања пацијената са папиларним подтипом RCC, нађена у овој студији, може бити резултат чињенице да је апсолутна већина пацијената имала pRCC тип 2. У поређењу са типом 1, тип 2 pRCC је агресивнија форма и има лошију прогнозу. Тако је показано да петогодишње DSS за тип 1 pRCC износи 92% а за тип 2 pRCC свега 44% [39], што је у складу са налазима ове студије. Када је у питању хромофобни подтип RCC, већина студија је утврдила да пацијенти са овим подтипом RCC имају значајно дуже петогодишње преживљавање у поређењу са пацијентима са светлоћелијским RCC [155, 166, 167]. У другим студијама процене преживљавања су варирале, али није утврђен статистички значај хистолошког подтипа за преживљавање пацијената оболелих од RCC [140, 168]. *Патард и сар. (2005)* [41] су на узорку од 4603 пацијента нашли да хистолошки подтип RCC има прогностички значај у униваријантној регресионој анализи, али након мултиваријантне анализе, статистички значајним су се показали градус и стадијум тумора.

5.2 АНТИОКСИДАТИВНИ СТАТУС ПАЦИЈЕНАТА ОБОЛЕЛИХ ОД ТУБУЛАРНОГ КАРЦИНОМА БУБРЕГА

Бубрези су органи који имају значајно већи проток крви по јединици масе у поређењу са другим органима у телу човека. Највећа количина крви завршава у кори бубрега где је место и највеће потрошње кисеоника. Иако чине свега 0,4% телесне масе одраслог човека [65] у бубрезима се искористи око 7% укупно утрошеног кисеоника у телу [169]. Разлог за то је њихова интензивна метаболичка активност, нарочито у зони тубула где се одвија секреција штетних материја у лумен и реапсорпција глукозе, воде и натријума. Добра прокрвљеност и снабдевање кисеоником чини бубреге подложним оксидативном стресу, нарочито у патолошким стањима. Интензивна метаболичка активност епителних ћелија тубула, гломеруларних ћелија и макрофага чини их главним генераторима реактивних кисеоничних врста (ROS) [170]. На унутарћелијском нивоу ROS настају у процесу оксидативне фосфорилације у митохондријама и као продукти мембранских протеина NADPH оксидаза (NOX) [33]. У физиолошким условима ROS имају сигналну улогу, а њихов физиолошки ниво одржава се путем антиоксидативног (АО) система. Овај систем чине мали молекули, попут GSH, који каталитички модификују ROS у мање штетне форме, док су SOD, CAT и GPx ензимски носиоци АО одбране у бубрезима. Поред њих, АО систему припадају и глутатион зависни ензими као што су GR и GST [63]. Оксидативни стрес је значајан фактор који доприноси патогенези различитих обољења бубрега. Оксидативни стрес, настао као последица промена у функционисању ћелија бубрега, је један од кључних фактора развоја и прогресије дијабетесне нефропатије [171]. Застој бубрега настао као последица хипертензије је, такође, у вези са оксидативним стресом [172]. Студија на анималном моделу [173] је показала да на унилатералну опструкцију бубрези реагују повећаном продукцијом ROS-а и смањеном активношћу SOD у кортексу и у сржи. *Сунами и сар. (2004)* су у сличној студији утврдили значајан пад нивоа CAT и GPx у бубрезима мишева са вештачки изазваном опструкцијом бубрега [174]. Хронична бубрежна исуфицијенција (енг. *chronic kidney disease, CKD*) је праћена прооксидативном активношћу бубрежних ћелија. Преостало функционално ткиво бубрега код

оболелих од CDK постаје хиперфункционално. Ова адаптација има за последицу повећање енергетских потреба хиперфункционалних ћелија што последично води интензивирању оксидативне фосфорилације у митохондријама [170] и продукције ROS. Повећан ниво MDA нађен у урину оболелих од CDK [175] је продукт липидне пероксидације која указује на оштећење реналних липида.

Познато је да се процес канцерогенезе одвија у три фазе и да ROS имају улогу у свакој од њих [176, 177]. ROS могу изазвати појаву мутација и лезија на молекулу ДНК и на тај начин узроковати канцерогенезу. Поред тога, ROS директно активирају сигналне путеве у ћелији који су повезани са малигном трансформацијом ткива. Поред повећане продукције ROS-а, малигно ткиво се карактерише и варирањем параметара АО система што има за последицу поремећај оксидо-редукционе равнотеже. Веза између оксидативног стреса и малигну обољења је показана код карцинома плућа [178], канцера панкреаса [179], канцера желуца [180], леукемије [181], канцера јајника [182] и канцера бешике [183].

Због релативно мале заступљености у општој популацији, карцином бубрега долази у фокус истраживача који се баве оксидативним стресом тек средином деведесетих година прошлог века. Први радови *Оберлеја и сар. (1994; 1996)* [184, 185] су базирани на имунохистохемијској анализи АО ензима у бубрежном ткиву оболелих од RCC. Каснија истраживања су на различите начине ограничена. У студији која је укључивала узорке бубрега 136 RCC пацијената *Соини и сар. (2006)* [186] су имунохистохемијски анализирали ниво CuZnSOD, MnSOD и CAT. Међутим, процена нивоа АО протеина у овој студији је заснована на граничним вредностима које су арбитрарне, стога, носи изврстан ниво субјективности. Друга студија [187] је урађена на узорцима малог броја пацијената и попут студије *Ганисамони и сар. (2012)* [188] је имала у фокусу активност АО ензима. Ова теза је урађена као свеобухватна студија која прати функционалну експресију АО ензима и доводи их у везу са патолошким параметрима значајним за процену степена малигнитета RCC и његовог потенцијала за ширење и појаву метастаза. Такође, у овој студији је први пут процењена улога и значај АО ензима за преживљавање пацијената са RCC.

5.2.1 Малигно ткиво бубрега је у стању оксидативног стреса и измењеног редокс баланса

Повишене PAB вредности забележене у RCC указују на присуство оксидативног стреса у малижном ткиву бубрега. Независно од градуса, у RCC је ниво PAB-а 3,5 пута већи у поређењу са здравим ткивом (Слика 13а). RCC трећег и четвртог стадијума су имали значајно веће PAB вредности у односу на здраво ткиво, али и у поређењу са RCC првог и другог стадијума (Слика 13б). Оксидативни стрес има значајну улогу у патогенези различитих малигнитета укључујући и RCC. ROS могу да индукују процес канцерогенезе и одрже прогресију тумора путем оштећења ДНК, као и да директно активирају ћелијске путеве сигналне трансдукције који су у вези са малижном трансформацијом. Претходно је показано да се током процеса раста тумора на ћелијском нивоу догађају промене у балансу између прооксиданата и антиоксиданата [189, 190]. То је у сагласности са налазима ово докторске дисертације јер је прогресија тумора у више стадијуме праћена додатним порастом нивоа PAB. Стога се може закључити да је оксидативни стрес, присутан у малижном ткиву бубрега, значајан за процес канцерогенезе, а посебно за раст и просторно ширење тумора.

У овој студији је у RCC забележен значајан пад активности АО ензима, што доприноси стању оксидативног стреса. Међутим, прооксидативно стање у малижном ткиву не мора бити само последица смањеног АО капацитета. У RCC је детектована повећана активност NOX ензима који продукују ROS [191]. Новија истраживања указују да је NOX4 главни извор $O_2^{\bullet-}$ у RCC [192]. Малигно ткиво бубрега подлеже метаболичком репрограмирању којим гликолиза, уместо оксидативне фосфорилације, постаје главни извор АТФ-а (Варбургов ефекат) у туморским ћелијама [53]. Ова метаболичка промена умањује значај митохондријалног електрон-транспортног ланца у продукцији $O_2^{\bullet-}$ у RCC [33], што поткрепљује хипотезу о NOX ензимима као главном извору ROS-а у RCC. Један од начина на који NOX доприносе расту је подстицање ангиогенезе. *Грег и сар. (2014)* су показали да инхибиција NOX4 зауставља раст тумора код мишева са субкутаном ксенографтом RCC [193]. Претпоставка је да се овај ефекат остварује спречавањем ROS дириговане транслокације HIF-2 α у нуклеус [194].

Последица је инхибиција трансактивације VEGF фактора раста који има кључну улогу у ангиогенези [195].

Повећана продукција ROS-а може имати тумор-супресиван ефекат, на пример, путем иницијације ћелијске смрти [196]. Још један молекулски пут којим оксидативни стрес спречава канцерогенезу је репликативно старење [197]. Репликативно старење се сматра стресним одговором ћелије на повећану продукцију ROS-а [198], јер оксидативни стрес доприноси скраћењу теломера. У RCC је регистровано скраћење теломера [199, 200] као последица комбинованог деловања непрестане ћелијске деобе и оксидативног стреса. Међутим, за разлику од здравог ткива бубрега, у RCC је регистрована и повећана активност теломераза [201, 202], ензима који доприносе елонгацији теломера, чиме је проблем репликативног старења превазиђен. Новија истраживања су указала да способност RCC-а да избегне старење може имати терапеутски значај. Наиме, *Пал и сар. (2015)* су показали да супресија експресије гена за везујуће протеине теломера (TRF1 и TRF2) редукује пролиферацију ћелија RCC и подстиче апоптозу [203].

У прилог тези да је малигно ткиво бубрега у стању оксидативног стреса је и варијација концентрације GSH забележена у овом истраживању. Без обзира на градус и стадијум, малигно ткиво је показало значајан пад у концентрацији GSH у поређењу са здравим ткивом (**Слика 14**). GSSG/2GSH редокс пар због своје велике заступљености у ћелијама (mM концентracије) [60] највише доприноси одржавању унутарћелијског редокс баланса. Редокс потенцијал GSSG/2GSH директно зависи од концентрације укупног GSH [204], тако да резултати ове студије показују да је дошло до промена редокс стања у малижном ткиву. Имајући у виду биолошку улогу GSH, пад у његовој концентрацији значи смањену антиоксидативну способност малижног ткива, али и измењен тиол-статус, што за последицу има повећану оксидацију -SH протеинских група и нарушавање функције протеина.

За разлику од ове студије, у карциному јетре (енг. *hepatocellular carcinoma, HCC*) је измерена двоструко већа концентрација GSH у односу на здраво ткиво [205]. Слични резултати су добијени код транзиоцелуларног карцинома бешике [206] и карцинома дебелог црева [207]. Поменути студије доводе у везу повећану концентрацију GSH са резистенцијом тумора на терапију,

јер је повећан ниво овог трипептида праћен и повећаном експресијом гена за GST. Иако узрапредовале форме RCC показују отпорност на хемиотерапију [208], на основу резултата ове студије се не може тврдити да GSH има значајну улогу у томе. Наиме, узрапредовале форме RCC нису имале већу GSH концентрацију (**Слика 14**) док је активност GST, ензима чија је физиолошка улога елиминација ксенобиотика, била значајно нижа у малигном ткиву бубрега у односу на здраво (**Слика 21 и Слика 27**). Повећан ниво GSH, нађен у различитим туморима, је праћен и повећаном експресијом гена за ензиме његове биосинтезе. Тако су *Хуанг и сар. (2001)* утврдили да је код НСС скок у концентрацији GSH праћен двоструким повећањем нивоа mRNA за γ -глутамилцистеин синтетазу (енг. *γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS*) и глутатион синтетазу (енг. *glutathione synthetase, GS*) [205]. У овој студији није праћена експресија гена за ензиме биосинтезе GSH. Међутим, *Пљеша-Ерцеговац и сар. (2008)* су утврдили повећану γ -GCS активност код RCC, али и више од десет пута нижу активност γ -глутамил трансферазе (енг. *γ -glutamyl transferase, γ -GT*) [187]. γ -GT је одговорна за одржавање тзв. γ -глутамилског циклуса који омогућава да GSH буде континуиран извор цистеина, аминокиселине која се лако оксидује [115], а представља лимитирајући фактор у синтези самог GSH [209]. Нижа активност γ -GT би могла да буде један од разлога ниже концентрације GSH измерене у малигном ткиву бубрега. Међутим, главни разлог пада концентрације GSH у RCC нађен у овој студији је активност GR-а, која је за више од 50% нижа у односу на контролно ткиво, независно од градуса и стадијума (**Слика 20в и Слика 26**). Прогресија тумора ка агресивнијим формама (виши градуси и стадијуми) није праћена повећањем концентрације GSH, што указује да GSH не доприноси значајно фази пропације канцерогенезе. Ово је у складу са резултатима *Хериса и сар. (2015)* који су истакли да је GSH значајан у фази иницијације канцерогенезе, док је у каснијим фазама значајније деловање тиоредоксина [210].

5.2.2 Липидна пероксидација као молекуларни механизам неопластичних промена у бубрегу

У овој студији је показано да RCC има повећану концентрацију продуката липидне пероксидације (MDA) у односу на здраво ткиво (Слика 15). Резултати указују да малигно ткиво бубрега продукује веће количине ROS-а у односу на здраво ткиво, што потврђује везу између оксидативног стреса и канцерогенезе [211]. Осим деловања ROS-а, на пораст концентрације MDA у малижном ткиву је утицало и опадање активности GPx. Наиме, резултати показују да малигно ткиво има за 75% нижу GPx активност (Слика 19в и Слика 25в) у односу на здраво ткиво бубрега. Бубрези су веома подложни штетном деловању ROS-а, јер значајан део структуре бубрежних липида чине полинезасићене масне киселине дугог ланца (енг. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) [172]. Управо су ови молекули главна мета деловања оксиданата [212], као што су ROS, што резултира липидном пероксидацијом (LPO). Последица деловања ROS-а на PUFA је настанак угљеноцентричних радикала (нпр. пероксил радикал ROO•) који су у стању да оксидују суседне молекуле липида и омогуће пропацију LPO [60]. Концентрација кисеоника је важан фактор који утиче на настанак ROO•. Малигно ткиво је у стању хипоксије [213] па је за очекивати да услед недостатка кисеоника дође до смањења продукције ROO• и међусобне реакције постојећих слободних радикала. Ови процеси би за последицу могли имати заустављање LPO и опадање концентрације MDA, нарочито код узнатковалих форми RCC. То се, међутим, не дешава. Резултати ове студије показују да је код узнатковалих форми RCC дошло до процентуално већег одступања концентрације MDA у поређењу са контролом. Повишен ниво MDA може бити подстакнут самом хипоксијом, јер ово стање индукује продукцију ROS-а, између осталог, кроз повећану активност NOX-а [214]. Један од разлога за веће одступање у концентрацији MDA код узнатковалих облика RCC-а би могла бити ензимски катализована LPO. Тако је код ccRCC III градуса измерена повећана експресија *ALOX5* гена који кодира 5-LOX (5-липооксигеназу) у односу на I градус [215]. Исти тренд експресије *ALOX5* гена је забележен код ccRCC виших стадијума у односу на ниже. Висока експресија COX2 (циклооксигеназа 2) протеина је у корелацији са вишим

градусима и стадијумима ccRCC [216]. 5-LOX доприноси повећаној синтези липидних хидропероксида кроз каталитичку пероксидацију арахидонске киселине, док су ензими из COX фамилије одговорни за пероксидацију линолеинске киселине [62]. Из свега наведеног се може претпоставити да LOX и COX у условима оксидативног стреса катализују пероксидацију липида чији продукти бивају оксидовни од стране ROS-а и на тај начин посредно одржавају висок ниво MDA у RCC. У прилог хипотези о постојању доприноса ензимски катализоване LPO прогресији RCC иду резултати студије која је на узорку од 196 пацијената оболелих од RCC показала мање укупно преживљавање код испитаника са повећаном експресијом COX1 протеина [217].

Уочене промене концентрације MDA у овој студији су у сагласности са ранијим налазима [188] у којима је код виших градуса RCC регистрован пораст липидне пероксидације. Сличан тренд промене нивоа MDA је уочен у малигном ткиву јајника. *Санчез и сар. (2006)* су у узорцима карцинома јајника утврдили да се са стадијумом пропорционално повећава и концентрација MDA [218]. Ниво MDA и NO у малигном ткиву је позитивно корелисан са градусом код оболелих од карцинома дојке [219].

LPO се сматра потенцијалним механизмом којим деловање ксенобиотика води малигној трансформацији бубрежног ткива. *In vivo* студије на пацовима и мишевима су показале да примена гвожђе-нитроацетата (C₆H₆FeNO₆), снажног бубрежног канцерогена, изазива LPO што за последицу има некрозу у проксималним тубулима, и високу инциденцу (60-92%) RCC [220]. Резултати изложени у овој докторској дисертацији иду у прилог поменутој хипотези, јер је код RCC повећање концентрације MDA истовремено праћено смањеном активношћу GST. Ово указује на смањену способност малигног ткива да елиминише штетне агенсе. Липидна пероксидација у малигном ткиву бубрега има за последицу смањење нивоа GSH, јер овај трипепид може спонтано да реагује са производима LPO као што је HNE (4-хидрокси-2-ноненал) [221]. На тај начин LPO директно утиче на антиоксидативни потенцијал малигног ткива бубрега. GSH представља кофактор значајан за активност GST, стога LPO на посредан начин утиче и на опадање способности малигног ткива да врши детоксикацију.

5.2.3 Малигно ткиво бубрега се одликује измењним антиоксидативним статусом

У неопластичном ткиву бубрега је регистрована промена експресије и активности свих анализираних АО ензима. Активност АО ензима је смањена без изузетка, док се на транскрипционом и транслационом нивоу уочавају одређене специфичности. Последњих година у биомедицинским истраживањима је све више података добијених анализом генома, транскриптома или метаболома (енг. *omics data*). Циљ оваквог свеобухватног приступа је профилисање болести како би се уочиле промене од значаја за настанак и развој обољења на основу којих би се трасирала будућа истраживања. Такав приступ је довео до великих пројеката попут TCGA (енг. *The Cancer Genome Atlas*) са циљем анализе читавог генома код оболелих од малигнух болести, између осталог и од RCC [222, 223]. Анализом узорака 446 пацијената оболелих од ccRCC [224] идентификоване су мутације 19 гена (*VHL*, *PBRM1* и др.) које се могу сматрати општом одликом ове болести. За ову студију је значајно да сличне промене нису регистроване на генима за АО ензиме што указује да су промене експресије АО ензима регулисане на други начин (посттранскрипционим или посттранслационим модификацијама).

Резултати изложени у овој докторској дисертацији показују смањену активност CuZnSOD у малигнуом ткиву бубрега испитаника са RCC (**Слика 16** и **Слика 22**). Пад активности CuZnSOD је последица смањене експресије *SOD1* гена, што се огледа у нижим вредностима mRNA и протеина у RCC. Прегледом литературе је установљено да су подаци о експресији и активности CuZnSOD у малигнуом ткиву бубрега међусобно опречни. *Шверко и сар. (2011)* су на узорку од 28 пацијената са ccRCC регистровали пад у експресији CuZnSOD који није утицао на активност [225]. *Дурак и сар. (1997)* су нашли смањену активност CuZnSOD у туморском у односу на здраво ткиво бубрега [226]. Насупрот томе, *Виерира де Рибейро и сар. (2013)* су уочили прекомерну експресију *SOD1* гена у екстрактима ccRCC, што је објашњено чињеницом да је продукција ROS-а већа у малигним ћелијама [227]. Међутим, аутори ове студије нису мерили ензимску активност што оставља недоумицу да ли је експримирани CuZnSOD протеин функционалан. Слично је и када се упореде подаци истраживања нивоа CuZnSOD у другим

малигнитетима. Нижа активност CuZnSOD је измерена у карциному желуца [228] и простате [229], док је пораст активност забележен у карциному дебелог црева [230], јетре [231] и плућа [232]. Један од могућих разлога за овако опречне резултате добијене анализом истог параметра лежи у интратуморској хетерогености [49]. Узорковање дела тумора не даје могућност сагледавања читавог спектра промена које се дешавају на генском и екстрагенском нивоу у малигном ткиву.

Пораст PAB вредности у RCC измерен у овој студији (Слика 13) потврђује да се туморско ткиво бубрега налази у стању оксидативног стреса што је, свакако, последица продукције ROS-а. Резултати, такође, показују одсуство одговора на оксидативни стрес који би се огледао у повећаној активности CuZnSOD. Насупрот томе, забележен је пад експресије *SOD1* гена и последично ензимске активности. Ниједан од анализираних клиничко-патолошких фактора није утицао на ниво CuZnSOD, што наводи на закључак да прогресија RCC није у директној вези са експресијом овог ензима. Опадање нивоа CuZnSOD забележено у овој студији доприноси општој слици измењеног антиоксидативно-прооксидативног баланса у малигно трансформисаним бубрезима. Непосредна веза између експресије гена за CuZnSOD и канцерогенезе бубрега није показана. *SOD1*^{-/-} мишеви током живота развију карцином јетре, али не и бубрега [73]. *Сиомек и сар. (2010)* су у бубрезима *SOD1*^{-/-} мишева детектовали повишен ниво 8-oxodG (8-оксо-7-хидро-2'-деоксигуанозин) што указује на оксидативна оштећења ДНК [233]. Одсуство малигних промена у бубрезима ових мишева аутори објашњавају повећаном активношћу NF-κB протеина.

Основна физиолошка улога CuZnSOD је елиминација O₂^{•-}. Познато је да O₂^{•-} доприноси канцерогенези изазивањем генетичке нестабилности [60]. Иако је експресија CuZnSOD нижа у RCC, анализа активности јасно показује да се ради о функционалном протеину који и у малигном ткиву обавља своју улогу. То наводи на закључак да CuZnSOD путем смањене експресије и активности учествује у одржавању повишеног нивоа O₂^{•-} неопходног за одржавање пролиферативног фенотипа ћелија у RCC. Допринос CuZnSOD канцерогенези бубрега се може посматрати кроз садејство са NADPH оксидазама за које је показано да активно продукују O₂^{•-} у RCC. Нижи ниво CuZnSOD, уз повећану експресију NOX1,

доприноси одржавању високе концентрације $O_2^{\cdot-}$, кључног сигналног молекула који доприноси повећаној експресији HIF-2 α [234]. HIF-2 α је значајан за канцерогенезу бубрега, јер подстиче експресију TGF- α (трансформациони фактор раста алфа) који је митоген за епителне ћелије проксималних тубула [191]. У физиолошким условима епителне ћелије бубрега синтетишу pVHL који интерагује са HIF-2 α , доводи до његове полиубиквитинације и касније разградње у протеазомима. Будући да је код 80% ccRCC VHL мутиран [235], може се закључити да нижи ниво CuZnSOD у pVHL дефицијентним ћелијама доприноси канцерогенези бубрега путем стабилизације HIF-2 α .

Резултати показују да је малигна трансформација ткива бубрега у вези са порастом активности MnSOD (Слика 17 и Слика 23). Оваква промена је последица повећане експресије SOD2 гена и усходне регулације MnSOD протеина. Између диференцираних и недиференцираних група RCC није регистрована разлика ни на једном нивоу експресије. За разлику од ове студије, Соини и сар. (2006) су уочили повећану експресију MnSOD протеина у ccRCC нижих стадијума у односу на више, указујући на потенцијални значај овог ензима у раним фазама канцерогенезе [186]. Исти аутори су утврдили да је чак 83,7% ccRCC било позитивно на MnSOD, што га чини најчешће експримираним АО ензимом. Резултати ове докторске дисертације су у сагласности са још неким ранијим студијама [225, 236], што наводи на закључак да је усходна регулација MnSOD одлика RCC.

MnSOD је локализована у матриксу митохондрија па њена повећана активност указује да у RCC постоји унутарћелијска специфичност у погледу толеранције на пораст супероксид анјон радикала. Док се у цитосолу одржава висок ниво $O_2^{\cdot-}$, између осталог и путем смањене активности CuZnSOD, у митохондријама је неопходна његова потпуна елиминација, тј. превођење у H_2O_2 . Метаболичко репрограмирање у малигним ћелијама фаворизује гликолизу на рачун оксидативне фосфорилације [237] и на тај начин умањује значај митохондрија као извора АТФ-а. Експресија гена за гликолитичке ензиме је у вези са агресивнијим формама RCC као што су ccRCC и тип 2 pRCC [238]. Смањена улога митохондрија у енергетском метаболизму RCC намеће питање биолошког смисла повећане активности митохондријалне SOD. Одговор делом лежи у

повећаној продукцији ROS-а, на првом месту $O_2^{\bullet-}$, што је последица смањене оксидативне фосфорилације, као и неопластичне трансформације ћелија [239]. Повећање концентрације супероксид анјон радикала у матриксу митохондрија би довело до додатних промена на мтДНК, и структури унутрашње мембране, што би резултирало апоптозом. MnSOD катализује превођење $O_2^{\bullet-}$ у H_2O_2 који се даље транспортује у цитосол и на тај начин омогућава малигним ћелијама да избегну апоптозу. Додавање антиоксидативних агенаса, као што су MnSOD и CoQ, инхибира продукцију проапоптотског Вах протеина [239] па се може закључити да MnSOD у малигним ћелијама бубрега има антиапоптотску улогу.

Веза између канцерогенезе и MnSOD је сложена и улога овог ензима у процесу неопластичне трансформације зависи од врсте тумора. Нема сумње да је улога овог ензима у нормалним ћелијама протективна и тумор-супресивна. Наиме, $SOD2^{-/-}$ фенотип мишева је леталан, док хетерозиготи ($SOD2^{+/-}$) у више од 80% случајева имају неопластичне лезије [240]. *Лу и сар. (1997)* су показали да повећана експресија MnSOD успорава раст малигнућ ћелија карцинома усне дупље [241]. Претходно су *Лу и сар. (1995)* на моделу канцерских ћелија дојке (MCF-7) показали да прекомерна експресија MnSOD потпуно зауставља ћелијски циклус [242]. Међутим, повећана експресија MnSOD је нађена у чак 93% метастатских тумора желуца [243]. Анализа узорака ткива 163 пацијента са колоректалним карциномом [244] је показала виши ниво MnSOD протеина у канцеру у односу на нормалну мукозу. Такође, аутори су указали на везу између повишеног нивоа MnSOD протеина и смањеног укупног преживљавања пацијената са колоректалним карциномом. Повећана експресија MnSOD нађена је још у карциному коже, панкреаса, простате, туморима на мозгу и централном нервном систему [245]. Све претходно наведено указује да MnSOD има различиту улогу у процесу канцерогенезе у зависности од врсте и стадијума канцера. Међутим, *Мајо и сар. (2018)* су у свом ревијалном раду сугерисали да је тумор-супресивна улога овог ензима показана *in vitro*, док резултати добијени из пацијената указују на активну улогу MnSOD у прогресији и инвазији тумора [82]. Резултати ове докторске дисертације подржавају тезу о активном доприносу MnSOD канцерогенези. Имајући у виду физиолошку улогу овог ензима, са сигурношћу се може тврдити да H_2O_2 има улогу кључног сигналног молекула

путем кога MnSOD доприноси развоју тумора. Водоник пероксид оксидује цистеинске остатке РТР-а (протеин тирозин фосфатаза) чиме омогућава редокс регулисану експресију рецептора фактора раста (VEGF-R, EGF-R, PDGF-R) [191] и тако утиче на ангиогенезу и раст тумора. Такође, H₂O₂ индукује активност металопротеиназа (ММР) и тиме доприноси промени фенотипа малигнух ћелија кроз епително-мезенхималну транзицију што резултира њиховом већомј покретљивошћу [82]. На тај начин MnSOD путем H₂O₂ сигнализације утиче на инвазивну способност тумора. Међутим, ниво H₂O₂ у ћелији не зависи само од MnSOD, већ и од ензима који га разграђују па се улога MnSOD у канцерогенези мора посматрати кроз садејство са CAT и GPx.

У хуманим ћелијама постоји више ензима способних да реагују са H₂O₂, као што су CAT, GPx ензимска фамилија, Ptx. Ова чињеница говори да је контрола нивоа H₂O₂ од значаја за нормалну физиологију ћелије. Физиолошки значај водоник пероксида не произилази из његове високе реактивности (OH[•] и O₂^{•-} су знатно реактивнији), већ из стабилности и способности да прође кроз ћелијске мембране. Управо ове особине омогућавају водоник пероксиду да врши улогу сигналног молекула. На основу резултата ове докторске дисертације може се закључити да је у малигним ћелијама бубрега сигнализација путем водоник пероксида очувана. Наиме, поред повећане активности MnSOD у RCC је детектована значајно нижа активност CAT и GPx (**Слика 18, Слика 19, Слика 24 и Слика 25**). Наравно, не треба изгубити из вида да је у RCC детектовна активност CuZnSOD, која, иако снижена, указује на постојање функционалног ензима способног да продукује H₂O₂.

Пад активности CAT у малигнуом ткиву бубрега је последица смањене експресије CAT гена. Наиме, у поређењу са нормалним ткивом бубрега, у RCC је регистрована нижа релативна количина CAT mRNA и протеина (**Слика 18 и Слика 24**). Нисходна регулација CAT није само одлика карцинома бубрега. Сличан тренд промене експресије овог ензима уочен је у карциному плућа [246], бешике [247], дебелог црева [230] и утеруса [248]. Међутим, виши ниво CAT је регистрован у малигнуом ткиву дојке [249], желуца [250] и коже [251]. Резултати ове докторске дисертације, као и наведених студија, указују да је експресија каталазе ткивно тј. тумор специфична.

Стање оксидативног стреса уочено у RCC у овој студији је свакако делом последица ниже активности CAT. Међутим, управо би оксидативни стрес могао бити разлог смањене експресије CAT гена. *Min и сар. (2010)* су показали да продужено излагање ћелијских линија хуманог карцинома јетре (Hep3B и Huh7) деловању ROS-а узрокује пад експресије CAT гена услед метилације CpG острваца на промотору [252]. Значајно је поменути да је метилација промотора на CAT гену регистрована код готово 30% третираних ћелија, док је иста промена уочена код чак 73,3% узорака тумора јетре. Оксидативни стрес је стање које доприноси прогресији тумора [253] па би метилација промотора CAT гена могла да објасни додатни пад нивоа mRNA регистрован код високоградусних RCC у односу на нискоградусне (**Слика 18а**). Ово је у складу са најновијим истраживањима у којима је показано да виши градуси RCC имају већи број хиперметилованих CpG места у поређењу са нижим [254, 255].

Продужено излагање оксидативном стресу је стање слично хроничним запаљенским процесима која се одликују продукцијом ROS-а и могу претходити неопластичним лезијама ткива услед промена на ДНК [256]. Нижа активност CAT чини бубреге осетљивијим на инфламаторне процесе [257]. Ово указује да CAT потенцијално може имати тумор-супресивну улогу у раној фази канцерогенезе. Будући да малигне ћелије продукују значајане количине H₂O₂ [258], усходна регулација CAT би могла негативно да утиче и на прогресију тумора. Малигни фенотип канцерских ћелија се може обрнути смањењем нивоа H₂O₂ [259] што указује на тумор-супресивн ефекат CAT. Наравно, за пуни ефекат деловања CAT од значаја би било и супримирање активности MnSOD, бар када је карцином бубрега у питању.

Из свега досад изложеног се може закључити да је инхибиција активности каталазе предуслов за иницијацију и један од фактора који омогућава прогресију тумора. Разлог је то што је ово веома потентан ензим који је готово немогуће заситити супстратом [60] због велике брзине којом врши дисмутацију водоник пероксида.

Измерена CAT активност у RCC је износила свега 20% своје активности у контролном ткиву (**Слика 18в** и **Слика 24в**). Овај пад активности је сразмеран тренду опадања mRNA, али не и протеина. Малигно ткиво бубрега је имало

значајно нижи ниво протеина (**Слика 186** и **Слика 246**), али разлика у односу на контролу није тако изразита. Могуће је да је значајан проценат детектованог САТ протеина нефункционалан, али још увек није разграђен. Смањена функција САТ протеина може бити и последица генског полиморфизма [260] или оштећења услед повећане продукције ROS-а [261]. Разградњи САТ у протеазомима [262] претходи фосфорилација тирозинских остатака (Tyr₂₃₁, Tyr₃₈₆) која је катализована од стране тирозин киназног хетеродимера (c-Abl и Arg). Занимљиво, фосфорилација САТ повећава њену функцију чак четири до пет пута [263] док истовремено убрзава њену разградњу. Међутим, интеракција између хетеродимера и каталазе је редокс регулисана и промовисана је при нижим концентрацијама H₂O₂ [263]. Претпоставка је да у условима високе концентрације H₂O₂ у RCC долази до дефосфорилације САТ, што, парадоксално, смањује њену активност, али повећава стабилност самог протеина [264] и успорава његову разградњу. Један од разлога слабе активности каталазе би могао бити недостатак пероксизома у малигним ћелијама [265].

Цитосолна глутатион пероксидаза (GPx1) је предмет истраживања већ дуги низ година. На основу досадашњих сазнања, постоји уверење да својом антиоксидативном и антиинфламаторном активношћу GPx1 може допринети спречавању канцерогнезе барем у почетној фази [98]. Међутим, њена улога у каснијим фазама канцерогнезе није у потпуности разјашњена.

У овој студији је уочено да малигна трансформација утиче на транскрипцију *GPX1* гена, као и на активност самог ензима. Међутим, на транслационом нивоу није било разлике између RCC и здравих контрола (**Слика 19** и **Слика 25**). Повећање нивоа *GPX1* mRNA у туморима може бити резултат адаптације ћелије на смањену експресију *CAT* гена (**Слика 18** и **Слика 24**) у условима високе концентрације H₂O₂. Постојање везе између експресије гена за ова два ензима показано је *in vitro* у MCF-7 ћелијама канцера дојке где је висока експресија *CAT* гена узроковала инхибицију експресије *GPX1* и *PRDX2* (пероксиредоксин-2) гена [266]. Резултати ове докторске дисертације и наведене студије потврђују „хијерархијски“ однос између ензима чији је супстрат H₂O₂. САТ је ефикаснија при високим концентрацијама H₂O₂ [90], какве су регистроване у малигном ткиву, док су GPx1 и Prx2 одговорне за одржавање физиолошке

концентрације H_2O_2 и његове сигналне функције [267]. Међутим, у условима када је САТ активност редукована, ћелије покушавају да одговоре на стресни изазов повећаном експресијом *GPX1* гена. Очигледно је овај механизам стресног одговора очуван на транскрипционом нивоу и у малигним ћелијама бубрега. Са друге стране, пад нивоа *GPX1* mRNA уочен код високоградусних RCC у односу на нискоградусне (**Слика 19а**) би могао да значи нарушавање и овог механизма одбране код агресивних недиференцираних тумора. Значајна разлика у нивоу mRNA између RCC стадијума 3-4 и стадијума 1-2 је пре свега последица одсуства промене у експресији *GPX1* гена код нижих стадијума болести. Ова недоследност је највероватније последица интратуморске хетерогености која је једна од одлика ове болести [49].

Повећана експресија *GPX1* би могла бити последица одсуства инхибиторних механизма као што су мутације или епигенетске модификације. *Руденко и сар. (2013)* нису детектовали губитак хетерозиготности за *GPX1*, као ни присуство CpG острваца на промотору [268], док су *Пронина и сар (2017)* регистровали хиперметилацију *GPX1* у свега 14% ccRCC [269]. Експресија *GPX1* може бити редукована услед интеракције са малим некодирајућим РНК (miRNA), попут *MIR-129-2* [270]. Међутим, код ccRCC је показана инхибиција гена за *MIR-129-2* и *MIR-9-1* управо као последица хиперметилације [271, 272].

У малигним ткиву бубрега није регистрована промена у нивоу GPx1 протеина у односу на здраво ткиво (**Слика 19** и **Слика 25**). Ово може бити последица повећане транслације уз истовремену деградацију оштећеног протеина. Наиме, GPx1 је осетљива на оксидативна оштећења [273] настала у условима високе концентрације оксиданата, као што су слободни радикали. Оксидативна оштећења убрзавају протеолитичку разградњу овог ензима [274].

И поред повећане експресије гена и релативно стабилног нивоа протеина, активност GPx1 у RCC износи свега 25% активности измерене у нормалном ткиву (**Слика 19** и **Слика 25**). За разлику од САТ која директно реагује са H_2O_2 , GPx1 захтева присуство GSH као кофактора који је неопходан за редуkcију Cys-SeOH остатака на активном месту овог ензима [263]. У RCC је измерена значајно нижа концентрација GSH (**Слика 14**) што умањује редуkcиони потенцијал малигног ткива услед нарушеног редокс баланса. У условима високе концентрације H_2O_2 и

недовољно GSH може доћи до иреверзибилне инактивације GPx1 [274]. Као један од фактора који је потенцијално утицао на опадање активности свакако је оксидативно оштећење GPx1 протеина.

Из свега наведеног се може закључити да, упркос усходној регулацији GPx1 гена, овај ензим не може да одговори на повећан ниво H₂O₂ у малигном ткиву и тиме надомести недостатак каталазне активности. Очигледно концентрација H₂O₂ превазилази каталитичке могућности GPx1, посебно у условима измењеног редокс статуса.

Редокс статус ћелија у највећој мери зависи од тиоредоксин и глутатион система чији је важан део GR [275]. Функција GR-а је ограничена на рециклирање GSH, али је ефекат њене активности много шири захваљујући учешћу GSH у бројним физиолошким процесима. Управо се из тог разлога овај ензим проучава у различитим патолошким стањима. Тако, на пример, GR дефицитарни (GSR null) мишеви имају смањену способност да се изборе са инфекцијама узрокованим бактеријама услед нарушене бактерицидне способности фагоцита [276]. Када су у питању малигне болести, *Ли и сар. (2018)* су показали, *in vivo*, да инхибиција GR-а супримира субкутани раст меланома, као и појаву плућних метастаза [277]. Потенцијални механизам за ово је повећана продукција ROS-а услед смањења нивоа расположивог GSH. Повећана активност GR-а је регистрована у малигним, али и у премалигним променама утеруса [248]. Ове две студије указују да GR доприноси прогесији карцинома. То је разлог зашто је овај ензим означен као потенцијална мета будућих терапеутика [278].

Када је у питању карцином бубрега, резултати ове докторске дисертације показују значајно смањену активност GR-а у малигном ткиву пацијената са RCC (Слика 20 и Слика 26). Ово објашњава пад концентрације GSH регистрован у RCC, јер је услед смањене активности GR-а измењен однос између редуковане и оксидоване форме GSH у корист GSSG. Међутим, упркос великом значају овог ензима за одржавање концентрације GSH, ово није једини разлог опадања нивоа GSH у RCC. Већ је било речи о значају ензима биосинтезе GSH, али треба истаћи да је трошење GSH у RCC делом резултат метаболичких промена. Наиме, показано је да акумулирани фумарат, настао као последица утишавања гена за фумарат хидратазу (FH) [279], директно реагује са GSH дајући глутатион

сукцинат (GSF) [280]. Занимљиво, GSF је супстрат за GR, што води опадању нивоа NADPH [281], чиме се додатно нарушава редокс статус у RCC. На овај начин, глутатион, посредно, смањује способност GR да обавља своју примарну улогу. Резултати ове студије показују да је активност GR-а у RCC регулисана на нивоу експресије. Наиме, у малигнуом ткиву је забележен значајан пад релативног нивоа GR mRNA и протеина у односу на здраво ткиво бубрега (Слика 20 и Слика 26). Поређењем тумора различитих стадијума није уочено варирање активности, али ни експресије GR. Ово указује да GR не доприноси просторном ширењу RCC. На другој страни, варирање у експресији GR је у вези са прогресијом тумора у агресивније форме. Повећана продукција ROS-а доприноси агресивнијем фенотипу [282] па резултати указују да експресија гена за GR може бити редокс регулисана. Међутим, и код мање агресивних форми је забележен пад у активности GR-а што указује на пост-транслационе промене попут карбонилације, за коју је показано да инхибира активност овог ензима [283]. Један од разлога за пад активности GR код нижих градуса RCC, упркос одсуству промена на транскрипционом и транслационом нивоу, може бити оксидације тиол група у активном центру [284] услед деловања ROS-а. Повећана активност GR доприноси агресивном фенотипу канцера простате [282] и просторном ширењу колоректалног карцинома [230]. Насупрот овим студијама, пад активности GR има потенцијално тумор-супресиван ефекат на канцерогенезу бубрега, јер смањује расположивост GSH и тиме нарушава АО капацитет малигнуог ткива. Посредно, GR утиче и на пад активности GPx, чиме доприноси повећању нивоа водоник пероксида. Имајући у виду да је GR део глутатион система који је кључан у дистрибуцији електрона за рибонуклеотид редуктазу [285], пад активности GR би могао да наруши процес репликације ДНК у малигним ћелијама и тиме супримира раст тумора.

Због своје физиолошке улоге, епителне ћелије проксималних тубула су изложене деловању ксенобиотика од којих неки могу бити канцерогени. Стога је у овој студији анализирана експресија GSTA1 ензима који је део GST- α ензимске суперфамилије [286]. Његова примарна улога је елиминација ксенобиотика у садејству са GSH. Са аспекта етиологије RCC, битно је истаћи да су проксимални тубули примарно место експресије GSTA1 [287].

Резултати показују да RCC одликује смањена експресија *GSTA1* гена која се огледа у мањој релативној количини mRNA у односу на контролно ткиво (Слика 21а и Слика 27а). Ово има за последицу опадање расположивости *GSTA1* протеина (Слика 21б и Слика 27б) и редуковану GST активност у малигном ткиву у односу на контролно (Слика 21в и Слика 27в). Укупна GST активност у RCC је износила свега 9% од измерене активности у здравом ткиву што јасно показује да малигно ткиво бубрега има смањену способност детоксикације. Овако драстичан пад активност GST, готово на граници детекције, је, вероватно, последица утицаја више фактора. Примарни фактор је смањена количина *GSTA1* протеина, као и мања концентрација GSH забележена у малигном ткиву. Додатни разлог за пад GST активности у RCC би могла бити некаталитичка (неензимска) функција *GSTA1* протеина која укључује интеракције са малим протеинским молекулима у циљу регулације ћелијске сигнализације [288]. Ово је део пост-транслационе модификације [289] *GSTA1* протеина који на тај начин постаје недоступан за каталитичке реакције. Борд и Менон (2013) су указали да мутација *GSTA1* гена која резултира заменом ароматичних аминокиселина (Tyr-Phe) у GSH везујућем делу активног центра узрокује пад активности до 90% [290]. Међутим, аутори наведене ревије истичу да мутација није једина одговорна за редукцију ензимске активности, што указује на њену мултифакторску регулацију.

У овој докторској дисертацији није забележена разлика ни на једном нивоу експресије *GSTA1* између RCC виших и нижих стадијума. Уочено варирање количине mRNA између виших и нижих градуса може бити последица генског полиморфизма [291], као и интратуморске хетерогености. Пораст нивоа *GSTA1* mRNA код високоградусних RCC није утицао на количину протеина што може бити последица нарушене стабилности mRNA у недиференцираним туморима [292].

Експресија GST је регулисана од стране више фактора што резултира тиме да сваки орган има јединствен GST профил [293]. Иако је у неколико студија регистрован пораст експресије *GSTA1* у RCC [287, 294], већина резултата упућује на то да је нисходна регулација овог ензима одлика малигнух промена бубрега [187, 295-297], што потврђују и налази ове докторске дисертације.

Активност GST забележена у нижим градусима и стадијумима RCC се није значајно мењала са прогресијом тумора (Слика 21в и Слика 27в) па резултати указују да је пад активности овог ензима вероватно део раних догађаја у канцерогенези бубрега. У прилог овој тврдњи иду налази студије *Симић и сар. (2003)* у којој је, код пацијената са RCC, измерена нижа активност GST- α у ткиву бубрега око тумора у поређењу са здравим ткивом бубрега [298]. Ови налази указују да се нарушавање активности овог ензима дешава пре појаве неопластичних лезија које би могле бити последица оксидативног стреса и повећане осетљивости епителних ћелија тубула на деловање канцерогена [299]. Имајући у виду локализацију GSTA1 и физиолошку улогу епителних ћелија, синергистичко деловање фактора средине, начина живота (пушење, изложеност на раду) и генског полиморфизма који резултира експресијом протеина мање активности би могао бити један од механизма иницијације канцерогенезе бубрега. *Ђорђевић и сар. (2016)* су показали да је комбинација генотипова *GSTM1-null/GSTP1-variant/GSTA1 low-activity*, регистрована код чак 94% пушача оболелих од ccRCC, у вези са повећаним ризиком од обољевања [300].

Резистенција RCC на хемиотерапију се доводи у везу са активношћу глутатион трансфераза [301]. Иако је специфично експримирана у цитосолу ћелија проксималних тубула где је епицентар настанка RCC [302], мало је вероватно да GSTA1 доприноси отпорности на терапију цитостатицима. Нисходна регулација *GSTA1* гена, слаба ензимска активност уз смањену концентрацију GSH забележени у овој докторској дисертацији, указују на малу каталитичку способност овог ензима у малигном ткиву бубрега. Међутим, у хуманим бубрезима су поред GST- α експримирани и ензими из GSTM и GSTP субфамилија [113]. Више студија је показало непромењену или чак повећану експресију GSTP1 у RCC [187, 303], али и у другим канцерима са високим процентом отпорности на деловање цитостатика [304-306]. И поред озбиљних индикација које доводе у везу неуспех терапије и експресију ензима из GST ензимске суперфамилије, отпорност тумора на деловање лекова треба посматрати као процес који не зависи само од једног фактора. Савремена истраживања указују да се ради о мултифакторском процесу који поред ензима способних да редукују дејство лекова (GSTP1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) [307], укључује протеинске

транспоретере [308], али и непосредно окружење самог тумора [309]. Наравно, не сме се изгубити из вида интратуморска хетерогеност, као и постојање индивидуалних разлика у погледу ензимских изоформи које значајно утичу на њихову каталитичку способност.

Занимљив налаз ове докторске дисертације је нисходна регулација *GSTA1* гена у условима стабилне експресије његовог регулатора Nrf2 (Слика 28 и Слика 29). Иако се расположива количина Nrf2 у RCC не разликује од оне забележене у контролном ткиву, то није утицало на опадајући тренд експресије *GSTA1*. Немогућност Nrf2 да регулише експресију *GSTA1* гена у RCC може бити последица промене на промотору [310] где се налази везујуће место за овај транскрипциони фактор, али и модификације самог Nrf2 протеина.

Веза између канцерогенезе и Nrf2 протеина је сложена и још увек недовољно јасна. Активност овог протеина је кључна у превенцији хемијски изазваног малигнитета [311], што се постиже контролом експресије гена за ензиме фазе II метаболизма ксенобиотика о чему је било речи у уводу. Регулацијом генске експресије ензима биосинтезе глутатиона [312], Nrf2 доприноси одржавању оптималног редокс статуса и тако спречава појаву оксидативног стреса чија је веза са канцерогенезом показана у бројним студијама [190]. Поређењем RCC различитих стадијума није уочена разлика ни на једном нивоу експресије Nrf2. На другој страни, регистрован је пад у експресији *NRF2* у RCC виших градуса у односу на контролно ткиво што није имало ефекта на количину протеина која је остала непромењена и код виших и код нижих градуса. Из резултата се може закључити да у анализираном узорку RCC-а, Nrf2 показује стабилну експресију која се не мења са прогресијом тумора што је у сагласности са литературним подацима. Наиме, код више различитих врста карцинома показана је стабилна или чак повишена експресија овог транскрипционог фактора [313-315]. Кеар1, протеински регулатор Nrf2, је такође имао стабилну експресију у малигном ткиву бубрега у поређењу са контролним ткивом (Слика 30 и Слика 31). Непромењена експресија Nrf2 у RCC је, највероватније, последица баланса између његове *de novo* синтезе и Кеар1 регулисане разградње [123], што наводи на закључак да је у анализираном узорку RCC Кеар1-Nrf2 сигнализација делом очувана. Међутим, пораст нивоа Кеар1 у високоградусним RCC се није одразио

на количину Nrf2 (Слика 28 и Слика 30), што може бити знак нарушене пост-транслационе регулације Nrf2 код агресивнијих фенотипова RCC. Ово може бити последица измењеног Keap1 протеина услед перманентног оксидативног стреса или мутација на *CUL3* [316], што онемогућава формирање E3 убиквитин лигазног комплекса неопходног за убиквитинацију и каснију разградњу Nrf2 [130]. Промена нивоа Keap1 у канцерима је најчешће у вези са метилацијом промотора на *KEAP1* гену [317], и резултира смањењем расположивости овог протеина у ћелијама. Резултати изложени у овој дисертацији не потврђују ове налазе, јер се експресија *KEAP1* није мењала у RCC. Међутим, ово се не може сматрати општим трендом за RCC, па су тако *Фабрицио и сар. (2017)* регистровали метилацију на *KEAP1* промотору код 49% ccRCC [318], што још једном потврђује велику хетерогеност ове врсте малигнух тумора. На основу стабилне експресије Nrf2 уз потенцијално нарушену регулацију од стране Keap1, може се закључити да RCC показују конститутивну експресију овог транскрипционог фактора. Nrf2 регулише експресију гена за АО ензиме и ензиме метаболизма ксенобиотика, утиче на превенцију апоптозе [319] и модулише пролиферацију и раст туморских ћелија [317] па његова експресија у RCC може бити један од кључних догађаја канцерогенезе. Ово потврђује да је Nrf2 неселективни цитопротектор [320] који спречава малигну трансформацију здравих ћелија, али са друге стране доприноси заштити и промоцији канцерских ћелија. Пораст експресије Nrf2 протеина је позитивно корелисан са инвазивним фенотипом меланома [321] и агресивнијом формом pRCC (тип 2) [316]. Такође, код неситноћелијског карцинома плућа и карцинома бешике, стабилизација и експресија Nrf2 је у вези са резистенцијом на хемиотерапеутике [322, 323]. Nrf2 директно или индиректно контролише преко 200 различитих гена [324]. Стога резултати који показују везу између експресије овог транскрипционог фактора и лошије прогнозе код пацијената са различитим карциномима [325-327] не представљају изненађење. У последњих петнаест година је установљено да је Nrf2 један од кључних фактора раста и резистенције солидних тумора због чега се јавила потреба за развојем терапеутика способних да га инхибирају [328]. До данас је регистрован немали број инхибитора Nrf2/ARE сигнализације [128] међу којима има синтетичких, али и једињења природног, најчешће биљног порекла. Сва истраживања су још увек у претклиничкој фази,

али је јасно да ће се ова област редокс биологије у наредним годинама кретати у правцу развоја лекова чије ће деловање бити засновано на експлоатацији прекомерне активности Nrf2/ARE молекулског пута [329]. Ово је од посебног значаја за третман пацијената са RCC, јер и поред до сада регистрованих лекова и даље постоји потреба за ефикаснијим терапеутицима.

5.3 ПЕТОГОДИШЊЕ ПРЕЖИВЉАВАЊЕ ПАЦИЈЕНАТА У ЗАВИСНОСТИ ОД АНТИОКСИДАТВИНИХ ПАРАМЕТАРА

Из досада изложених резултата као и на основу литературе се може рећи да је оксидативни стрес стање повезано са канцером бубрега [265] које је узроковано редукијом ћелијског антиоксидативног пула [330]. Поред значајно редуковане експресије и активности АО ензима у канцерском ткиву бубрега, регистроване у овој дисертацији, као и у ранијим студијама [186, 187], код пацијената са RCC је показана повећана активност ензима који продукују ROS [191], а то има за последицу пораст нивоа оксидативног стреса [188, 220, 331, 332]. Све ово указује да је перманентни оксидативни стрес одлика RCC. Међутим, у малигном ткиву бубрега готово свих пацијената детектована је активност свих АО ензима што указује да је њихова функција, иако смањена, делом очувана. Још увек трају напори да се пронађе скуп предикционих и прогностичких маркера преживљавања код пацијената оболелих од RCC [333]. Ово је био разлог да се испита утицај активности анализираних АО ензима, као и концентрације GSH и MDA, на преживљавање пацијената са RCC.

У овој студији је уочен могући утицај активности GPx и GR као и нивоа GSH на преживљавање. Наиме, пацијенти код којих је измерена повећана активност GPx и GR као и повећана концентрација GSH су имали нижу стопу преживљавања и готово два пута већи ризик од смртног исхода (**Табела 11** и **Табела 13**). Претходно је указано на значај GSH и ензима његове биосинтезе за процес канцерогенезе [116], о чему је било речи и у дискусији ове дисертације. Повишен ниво гама глутамил трансферазе (γ -GT) у стањима оксидативног стреса је повезан са растом тумора и преживљавањем. Екстрацелуларни GSH представља главни извор цистеина који је од посебног значаја за процес синтезе протеина у

ћелијама тумора које се брзо деле [334]. *Хофбауер и сар. (2014)* су потврдили да претерапеутски ниво γ -GT у серуму представља независни прогностички фактор за пацијенте са RCC, при чему је виши ниво γ -GT у вези са лошијом прогнозом [335]. Насупрот експресији на луминалној површини секреторних и абсорптивних ћелија у нормалном ткиву бубрега, γ -GT је експримиран на читавој ћелијској површини код RCC. Ово има за последицу повишен ниво γ -GT и пораст интрацелуларног нивоа GSH, што је у корелацији са прогресијом тумора [335]. Међутим, у овој докторској дисертацији напредовање тумора није праћено додатном променом нивоа GSH, док су *Ганисамони и сар. (2012)* уочили везу између нижег нивоа GSH и вишег градуса RCC и метастаза [188]. Иако веза између клиничко-патолошких параметара и концентрације GSH није показана у овој студији, значајан налаз представља то да су пацијенти са повећаном концентрацијом GSH у туморском ткиву имали лошији исход. Ово указује на потенцијални тумор-протективни ефекат глутатиона.

Што се тиче GSH зависних ензима, резултати су донекле опречни. *Пљеша-Ерцеговац и сар. (2008)* су утврдили да је активност GPx и GR значајно нижа у туморском ткиву RCC [187], што је у сагласности за резултатима ове докторске дисертације, док је друга студија показала да нема значајне промене у активности ових ензима у поређењу са здравим ткивом бубрега [332]. У основи ових резултата је велика интратуморска хетерогеност која је једна од кључних одлика ове врсте малигнитета. Треба ипак истаћи да су, у овој студији, пацијенти са повећаном интратуморском активношћу GPx и GR имали лошију прогнозу, што указује на тумор-протективну улогу ових ензима. Резултати ове докторске дисертације нису показали везу између активности GST и укупног преживљавања. Међутим, други аутори сматрају GST високо специфичним дијагностичким маркером за примарни ccRCC, али се његов прогностички значај добија тек уколико се градус изузме из мултиваријантне анализе [302].

Ниво липидне пероксидације је виши код RCC него у здравом ткиву бубрега, али није показао везу ни са једним клиничко-патолошким фактором значајним за преживљавање пацијената са RCC. Насупрот овој студији, утврђена је корелација између виших градуса и повећане липидне пероксидације у туморском ткиву бубрега [188]. *Виера де Рибейро и сар. (2013)* су нашли

прекомерну експресију CuZnSOD у екстрактима ccRCC, што је објашњено чињеницом да је продукција ROS генерално већа у малигним ћелијама [227]. Нижа експресија *SOD1* гена, забележена у студији, је праћена падом у количини протеина и ензимске активности. Иако је промена нивоа SOD и CAT нађена у туморском ткиву у овој, као и у ранијим студијама [188], веза са хистопатолошким карактеристикама није уочена. Резултати изложени у овој докторској дисертацији указују на одсуство корелације између стадијума RCC и нивоа анализираних АО ензима, GSH и MDA што је у сагласности са литературним подацима [336].

Анализа преживљавања пацијената од којих је узорковано ткиво је још једном потврдила значај клиничко-патолошких параметара за исход болести. Укупно преживљавање је износило 54,6% што је у складу са литературом [4]. Униваријантна анализа је издвојила величину тумора, градус и стадијум као независне предикторе преживљавања. Након мултиваријантне анализе величина тумора и градус су остали значајни за исход болести. Величина тумора се сматра значајном одредницом стадијума тумора и у корелацији је са инвазијом реналног синуса, метастатским потенцијлом RCC и прогнозом [147]. Овде је, још једном, потврђено да пацијенти са тумором већим од 7 cm имају лошију прогнозу. Ризик од смртог исхода за пацијенте са тумором величине од 7,1-10 cm и >10 cm је био 1,2 и 4,1 пута већи у поређењу са онима код којих величина тумора није прелазила 4 cm (**Табела 13**).

6. ЗАКЉУЧАК

У овој докторској дисертацији су дефинисана три главна циља у оквиру којих су, на основу приказаних резултата, изведени следећи закључци:

I **Анализа утицаја клиничко-патолошких параметара на преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега (RCC)**

- 1. Старост пацијената је фактор који значајно утиче на укупно преживљавање испитаника оболелих од RCC.** На крају петогодишњег периода праћења, регистровано је ниже укупно преживљавање пацијената у седмој и осмој деценија живота као и 5, односно 6 пута већи ризик од смртог исхода. Закључено је да испитаници у седмој и осмој деценији живота представљају ризичне групе са већом вероватноћом за негативан исход третмана.
- 2. Пол пацијената оболелих од RCC није утицао на укупно преживљавање.** Иако је код жена забележена мања стопа преживљавања током петогодишњег периода праћења, ризик од смртог исхода је био готово једнак код оба пола.
- 3. Величина тумора је клиничко-патолошки фактор који значајно утиче на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Раст тумора је у вези са лошијим исходом болести. Пацијенти са туморима већим од 7 cm су имали мању стопу преживљавања. Величина тумора од 7 cm се може сматрати граничном, јер су тумори величине од 7,1-10 cm и >10 cm имали 2,8 и 5 пута већи ризик од смртог исхода.
- 4. Градус тумора значајно утиче на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Испитаници са туморима високог градуса (III и IV) су имали 1,4 пута нижу стопу укупног преживљавања у односу на оне са туморима ниског градуса (I и II). Високоградусни тумори су у вези са лошијом прогнозом јер носе 2,6 пута већи ризик од негативног исхода након третмана.

5. **Стадијум тумора значајно утиче на исход третмана код пацијената оболелих од RCC.** Након петогодишњег периода праћења, у групи пацијената са туморима трећег и четвртог стадијума у животу је било свега 42,4%, односно 33,3% испитаника. Поред тога, тумори трећег и четвртог стадијума носе 6,9 односно 10,7 пута већи ризик од смртог исхода у поређењу са туморима првог и другог стадијума.
6. **Хистолошки подтип тумора не представља фактор од значаја за укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Пацијенти са различитим хистолошким подтипом RCC нису имали значајно другачије стопе преживљавања. Такође, ризик од смртог исхода није значајно варирао у зависности од хистолошког подтипа RCC.

Старост пацијената, величина, градус и стадијум тумора су клиничко-патолошки фактори који независно једни од других значајно утичу на укупно преживљавање пацијената. Међутим, након анализе њиховог заједничког утицаја (мултиваријантна анализа) на исход болести, само су градус и стадијум тумора имали значајан ефекат на преживљавање пацијената оболелих од RCC. Имајући у виду мултифакторску основу карцинома бубрега, може се закључити да градус и стадијум тумора имају прогностички значај на основу кога се са великом сигурношћу може проценити исход болести након нефректомије.

II Одређивање АО статуса пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега (RCC)

1. **Малигно ткиво бубрега је у стању оксидативног стреса.** У канцерском ткиву бубрега је измерен повишен ниво PAB вредности у односу на здраво ткиво.
2. **Оксидативни стрес је значајан за раст и просторно ширење малигног ткива у бубрегу.** Тумори трећег и четвртог стадијума су имали за 31,6% виши ниво PAB вредности у поређењу са туморима првог и другог стадијума.

3. **Малигно ткиво бубрега је у стању нарушеног редокс баланса.** Овај закључак произилази из резултата који су показали значајно мању концентрацију GSH у малигном ткиву бубрега у односу на здраво ткиво.
4. **Нарушавање редокс статуса бубрега се одвија у премалигним или раним фазама канцерогенезе.** Сличан пад концентрације GSH је регистрован код нижих градуса и стадијума као и код недиференцираних тумора (виши градуси) и просторно унапредовалих форми (виши стадијуми) RCC.
5. **Пораст концентрације MDA у RCC у поређењу са контролним ткивом указује на повећање липидне пероксидације у малигно трансформисаном ткиву.** Код унапредовалих форми RCC је уочено веће одступање у концентрацији MDA у односу на здраво ткиво, што указује да је прогресија тумора праћена пропагацијом липидне пероксидације.
6. **Малигно ткиво бубрега одликује смањена активност CuZnSOD што је последица самњене експресије *SOD1* гена.** Резултати су показали да малигно ткиво, без обзира на градус и стадијум, има смањену количину *SOD1* mRNA и последично пад нивоа CuZnSOD протеина.
7. **Малигну трансформацију ткива бубрега карактерише пораст активности MnSOD.** Примарни фактор који утиче на пораст ензимске активности је усходна регулација експресије *SOD2* гена. Наиме, туморско ткиво бубрега је имало значајно више вредности *SOD2* mRNA и MnSOD протеина у поређењу са здравим ткивом.
8. **Варирање експресије CAT је у вези са малигном трансформацијом ткива.** У туморском ткиву бубрега је, без обзира на градус и стадијум, регистрована 80% нижа активност CAT у односу на контролно ткиво. Пад активности је последица смањене експресије *CAT* гена и значајног опадања нивоа CAT протеина.
9. **Варирање експресије *CAT* гена је у вези са прогресијом тумора.** Код недиференцираних тумора је регистрована промена експресије CAT на нивоу транскрипције. Тумори вишег градуса су имали значајно нижи ниво *CAT* mRNA у поређењу са нискоградусним туморима.

- 10. Експресија GPx се значајно мења у малижном ткиву на нивоу транскрипције и ензимске активности.** У RCC је регистрован виши ниво *GPX1* mRNA у поређењу са здравим ткивом бубрега. Активност GPx је имала супротан тренд па је у малижном ткиву забележен значајан пад ензимске активности у односу на контроле.
- 11. Активност GPx у RCC је регулисана на посттранслационом нивоу.** Ниво GPx1 протеина се није значајније мењао у малижном ткиву бубрега у поређењу са контролним, док је активност GPx у RCC била за 75% нижа у односу на активност измерену у контролном ткиву.
- 12. Недиференцирани тумори показују пад експресије *GPX1* гена.** Високоградусни тумори су имали значајно нижи ниво *GPX1* mRNA у поређењу са нискоградусним RCC.
- 13. Активност GR у малижном ткиву бубрега је резултат нисходне регулације *GR* гена, али и посттранслационих модификација.** У RCC, независно од градуса и стадијума, је измерена значајно нижа активност GR. Ово је последица смањене експресије *GR* гена и нижег нивоа GR протеина. Нискоградусни тумори нису показали промену нивоа GR протеина, али је активност ензима била значајно нижа у поређењу са здравим ткивом.
- 14. Промена експресије *GR* гена је у вези са агресивнијим формама RCC.** Резултати су показали значајно нижи ниво *GR* mRNA и GR протеина код високоградусних тумора у односу на контролно ткиво, али и у поређењу са нискоградусним RCC.
- 15. Пад активности GST, регистрован у RCC, је резултат деловања више фактора.** Активност GST у туморском ткиву је била значајно нижа у односу на здраво ткиво бубрега, што је последица значајно нижег нивоа *GSTA1* mRNA и смањене количине *GSTA1* протеина. Међутим, пад GST активности у малижном ткиву, који значајно превазилази пад количине протеина, указује на постојање додатних механизма регулације функционалности GST.

16. Малигно ткиво бубрега се карактерише стабилном експресијом Nrf2.

Ниво Nrf2 протеина у туморском ткиву, независно од градуса и стадијума, је остао непромењен у поређењу са здравим ткивом бубрега.

17. Инхибиторна улога Кеар1 је нарушена код недиференцираних тумора.

Овај закључак произилази из резултата који показју да у високоградусним туморима пораст нивоа Кеар1 протеина није довео до опадања нивоа Nrf2.

Малигно ткиво бубрега пацијената оболелих од RCC је у стању оксидативног стреса које доприноси расту и просторним ширењу тумора. Оксидативни стрес је последица ниже концентрације GSH и смањене способности ензима АО одбране да елиминирају реактивне врсте кисеоника. Усходна регулација експресије SOD2 гена, која има за последицу повећану активност MnSOD указује на протективну улогу овог ензима у малижном ткиву бубрега. Поред тога, нижа активност CAT и GPx показују да је потенцијал малиног ткива да елиминира H_2O_2 смањен, што указује на значајну улогу овог молекула у процесу канцерогенезе бубрега. Активност GST која је била на граници детекције није се мењала код узнапредовалих форми RCC што сугерише да је опадање активности овог ензима део раних догађаја у етиопатогенези RCC. Имајући у виду улогу GST у елиминацији штетних агенаса, нарушавање њене функције је један од фактора који доприноси малигној трансформацији ткива бубрега. Стабилна експресија Nrf2, уз смањену инхибицију од стране Кеар1 код недиференцираних тумора, указују да је очување функционалности овог транскрипционог фактора један од кључних догађаја у процесу канцерогенезе бубрега.

III Испитивање утицаја параметара антиоксидативног статуса на укупно преживљавање пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега (RCC)

1. **Активности SOD, CAT и GST нису значајно утицале на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Није уочена статистички значајна разлика у укупном преживљавању између пацијената са нижим и вишим активностима SOD, CAT и GST.
2. **Активност GPx представља фактор који потенцијално утиче на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Након петогодишењег периода праћења, у групи пацијената са повећаном активношћу GPx у животу је било 41% испитаника, док је преживљавање испитаника са нижом активношћу GPx износило 65%. Повећана активност GPx у малигном ткиву бубрега носи 1,9 пута већи ризик од смртог исхода.
3. **Активност GR представља фактор који потенцијално утиче на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Након пет година, свега 29,8% пацијената са вишом активношћу GR је било у животу, у односу на 70% испитаника код којих је у малигном ткиву забележена нижа активност GR. Поред тога, повећана активност GR у малигном ткиву бубрега носи 1,8 пута већи ризик од смртог исхода.
4. **Концентрација GSH потенцијално утиче на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Повећана концентрација GSH у малигном ткиву бубрега повећава тенденцију ка лошијем исходу болести. Пацијенти са вишом концентрацијом GSH су имали нижу стопу преживљавања (41,8%) у поређењу са испитаницима код којих је концентрација GSH била нижа (64,9%). Виша концентрација GSH у малигном ткиву бубрега носи 1,9 пута већи ризик од смртог исхода.
5. **Концентрација MDA није од значаја за укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC.** Укупно преживљавање пацијената са мањом концентрацијом MDA је било готово једнако преживљавању испитаника код којих је концентрација MDA била већа.

Анализа утицаја АО параметара на укупно преживљавање пацијената оболелих од RCC је указала на потенцијални ефекат GSH, GPx и GR. Повишен ниво ових параметара у малигном ткиву бубрега је у вези са лошијим исходом, што указује на потенцијалну тумор-протективну улогу глутатиона и глутатион зависних ензима. Готово два пута већи ризик од смртог исхода забележен код испитаника са повишеним нивоом GSH, GPx и GR сугерише да ови параметри могу имати и предикциони значај код оболелих од тубуларног карцинома бубрега.

Резултати ове докторске дисертације указују на значај и међусобну повезаност антиоксидативних и клиничко-патолошких параметара у комплексној мрежи интеракција геномских, биохемијских и клиничких фактора значајних за настанак, прогресију, дијагностику и прогностику тубуларног карцинома бубрега, као и за преживљавање и процену исхода ове болести. Од испитиваних клиничко-патолошких фактора, градус и стадијум тумора су испољили најјачи ефекат на преживљавање RCC пацијената, као и значајан прогностички потенцијал за исход болести након нефректомије. Оксидативни стрес, настао као последица пада нивоа GSH, сниженог капацитета ензима АО одбране и нарушеног механизма његове регулације транскрипционим фактором Nrf2 се показао као фактор који значајно доприноси расту и просторном ширењу RCC, а компоненте глутатионског редокс циклуса као параметри значајни за укупно преживљавање пацијената и предикцију исхода болести.

Значај ове докторске дисертације је у оригиналном научном доприносу молекуларној биомедицини и бољем познавању молекулских механизма и клиничко-патолошких фактора значајних за RCC, њиховој повезаности, као и потенцијалној примени добијених резултата у циљу унапређења актуелне клиничке праксе и побољшања исхода болести код пацијената са тубуларним карциномом бубрега.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin MD, et al. International Classification of Diseases for Oncology (3rd ed) Geneva: World Health Organization; 2013.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-86.
4. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol* 2015; 67: 519-30.
5. Eble JN, Togashi K, Pisani P. Renal cell carcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, (eds). *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon: IARC Press; 2004. p. 12-87.
6. Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark* 2011;9(1-6):461-73.
7. Motzer RJ, Russo P, Nanus DM, Berg WJ. Renal cell carcinoma. *Curr Probl Cancer* 1997;21(4):185-232.
8. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet* 2009;373(9669):1119-32.
9. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(18):1331-4.
10. Zhao JJ, Chen PJ, Duan RQ, Li KJ, Wang YZ, Li Y. miR-630 functions as tumor oncogene in renal cell carcinoma. *Arch Med Sci* 2016;12:473-8.
11. Ritchie AWS, Chisholm GD. The natural history of renal carcinoma. *Semin Oncol* 1983;10:390-400.
12. Domagała-Haduch M, Cedrych I, Jasiówka M, Niemiec M, Skotnicki P. Analysis of adverse events of sunitinib in patients treated for advanced renal cell carcinoma. *Arch Med Sci* 2016;2:360-4.

13. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol* 2015;67(5):913-24.
14. Golovastova MO, Korolev DO, Tsoy LV, Varshavsky VA, Xu WH, Vinarov AZ, et al. Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives. *Curr Urol Rep* 2017;18(1):3.
15. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 2005;114(1):101-8.
16. Tsivian M, Moreira DM, Caso JR, Mouraviev V, Polascik TJ. Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29(15):2027-31.
17. Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, et al. Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2006;118(3):728-38.
18. Handa K, Kreiger N. Diet patterns and the risk of renal cell carcinoma. *Public Health Nutr* 2002;5(6):757-67.
19. Hsu CC, Chow WH, Boffetta P, Moore L, Zaridze D, Moukeria A, et al. Dietary risk factors for kidney cancer in Eastern and Central Europe. *Am J Epidemiol* 2007;166(1):62-70.
20. Bellocco R, Pasquali E, Rota M, Bagnardi V, Tramacere I, Scotti L, et al. Alcohol drinking and risk of renal cell carcinoma: results of a meta-analysis. *Ann Oncol* 2012;23(9):2235-44.
21. Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF Jr, Järholm B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* 2000;343(18):1305-11.
22. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* 2008;167(4):438-46.
23. Rini BI, Cohen DP, Lu DR, Chen I, Hariharan S, Gore ME, et al. Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(9):763-73.

24. Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschlägel B, Schill W, et al. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. *Int J Epidemiol* 2000;29(6):1014-24.
25. Pukkala E. Cancer incidence among Finnish oil refinery workers, 1971-1994. *J Occup Environ Med* 1998;40(8):675-9.
26. Pavlovich CP, Schmidt LS, Phillips JL. The genetic basis of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 2003;30(3):437-54.
27. Scelo G, Hofmann JN, Banks RE, Bigot P, Bhatt RS, Cancel-Tassin G, et al. International cancer seminars: a focus on kidney cancer. *Ann Oncol* 2016; 27: 1382-85.
28. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2011;60(4):615-21.
29. Adibi M, Karam JA, Wood CG. Reporting geographic and temporal trends in renal cell carcinoma: why is this important? *Eur Urol* 2015;67(3):531-2.
30. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. Reply from Authors re: Adibi M, Karam JA, Wood CG. Reporting Geographic and Temporal Trends in Renal Cell Carcinoma: Why Is This Important? *Eur Urol* 2015;67:531-2: Tackling Inequalities in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2015;67:532-3.
31. Cancer Incidence and Mortality in Central Serbia (1999-2013). Institute of Public Health of Serbia „Dr Milan Jovanović Batut“.
<http://www.batut.org.rs/index.php?content=185>
32. Martignoni G, Tardanico R, Pea M, Brunelli M, Gobbo S, Ficarra V. Renal tumors. In: Mikuz G, (ed). *Clinical Pathology of Urologic Tumors*. London: Informa Healthcare; 2007. p. 1-41.
33. Shanmugasundaram K, Block K. Renal Carcinogenesis, Tumor Heterogeneity, and Reactive Oxygen Species: Tactics Evolved. *Antioxid Redox Signal* 2016; 25: 685-701.
34. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-64.
35. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 2016;70(1):93-105.

36. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Montes SF, et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur Urol* 2019. pii: S0302-2838(19)30152-6.
37. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27(5):612-24.
38. Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol* 2001;32(6):590-5.
39. Pignot G, Elie C, Conquy S, Vieillefond A, Flam T, Zerbib M, et al. Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. *Urology* 2007;69(2):230-5.
40. Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases. *J Urol* 1995;154:964-7.
41. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 2005;23:2763-71.
42. Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM, et al. Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Am J Surg Pathol* 2002;26(12):1542-52.
43. Badowska-Kozakiewicz AM, Budzik MP, Koczkodaj P, Przybylski J. Selected tumor markers in the routine diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Arch Med Sci* 2016;12:856–63.
44. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994;7(1):85-90.
45. Bratslavsky G, Sudarshan S, Neckers L, Linehan WM. Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(16):4667-71.
46. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol* 2010;7(5):277-85.
47. Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* 2011;469(7331):539-42.

48. Khailany RA, Igci M, Bayraktar E, Erturhan S, Karakok M, Arslan A. VHL, PBRM1 and SETD2 genes in kidney cancer: a molecular investigation. *International Journal of Medical, Health, Biomedical and Pharmaceutical Engineering* 2015;9(5):389-92.
49. Lindgren D, Sjölund J, Axelson H. Tracing Renal Cell Carcinomas back to the Nephron. *Trends Cancer* 2018;4(7):472-84.
50. Choueiri TK, Vaishampayan U, Rosenberg JE, Logan TF, Harzstark AL, Bukowski RM, et al. Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in patients with papillary renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2013;31(2):181-6.
51. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2016;374(2):135-45.
52. Contractor H, Zariwala M, Bugert P, Zeisler J, Kovacs G. Mutation of the p53 tumour suppressor gene occurs preferentially in the chromophobe type of renal cell tumour. *J Pathol* 1997;181(2):136-9.
53. Lucarelli G, Rutigliano M, Sallustio F, Ribatti D, Giglio A, Lepore Signorile M, et al. Integrated multi-omics characterization reveals a distinctive metabolic signature and the role of NDUFA4L2 in promoting angiogenesis, chemoresistance, and mitochondrial dysfunction in clear cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY)* 2018;10(12):3957-85.
54. Hakimi AA, Reznik E, Lee CH, Creighton CJ, Brannon AR, Luna A, et al. An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* 2016;29(1):104-16.
55. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* 2002;30(4):406-10.
56. Krishnan B, Truong LD. Renal epithelial neoplasms: the diagnostic implications of electron microscopic study in 55 cases. *Hum Pathol* 2002;33(1):68-79.
57. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, (ed). *Oxidative Stress*. London: Academic Press; 1985. p. 1–8.

58. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 20145;224:164-75.
59. Sies H, Jones D. Oxidativestress. In: Fink G, (ed). *Encyclopedia of Stress 3* (2nd ed). Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 45–8.
60. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed). Oxford: Oxford University Press; 2007.
61. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32(8):595-603.
62. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482(3):419-25.
63. Cano-Europa E, Blas-Valdivia V, Franco-Colin M, Ortiz-Butron R. Regulation of the Redox Environment. In: Gowder SJT, (ed). *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Rijeka: IntechOpen; 2015. p. 3-15.
64. Đukić MM. Oksidativni stres-slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. Beograd: Mono i Manjana; 2008.
65. Gayton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology* (11th ed). Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
66. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998;201(Pt 8):1203-9.
67. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(21):10405-9.
68. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1988;107(6 Pt 1):2169-79.
69. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 2001;276(42):38388-93.
70. Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, Wigderson M, Sherman L, Bernstein Y, et al. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J* 1985;4(1):77-84.

71. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;33(3):337-49.
72. Wong PC, Waggoner D, Subramaniam JR, Tessarollo L, Bartnikas TB, Culotta VC, et al. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2886-91.
73. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005;24(3):367-80.
74. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 2005;26(4-5):340-52.
75. Valentine JS, Hart PJ. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):3617-22.
76. Brouwer M, Hoexum Brouwer T, Grater W, Brown-Peterson N. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem J*. 2003 Aug 15;374(Pt 1):219-28.
77. Barra D, Schinina ME, Simmaco M, Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G, et al. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1984;259(20):12595-601.
78. Raven PH. A Multiple Origin for Plastids and Mitochondria: Many independent symbiotic events may have been involved in the origin of these cellular organelles. *Science* 1970;169:641-6.
79. Fridovich I. Evidence for the symbiotic origin of mitochondria. *Life Sciences* 1974;14:819-26.
80. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 1984;222(3):649-55.

81. Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic Biol Med* 1997;23(2):314-20.
82. Mayo JC, Sainz RM, Quiros-Gonzalez I. MnSOD/SOD2 in Cancer: The Story of a Double Agent. *Reactive Oxygen Species* 2018;5(14):86–106.
83. Wang LI, Miller DP, Sai Y, Liu G, Su L, Wain JC, et al. Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(23):1818-21.
84. Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, Zhai R, Su L, Zhou W, et al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2008;112(5):1037-42.
85. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 2002;8(4):323-34.
86. Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(20):9715-9.
87. Kang SK, Rabbani ZN, Folz RJ, Golson ML, Huang H, Yu D, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57(4):1056-66.
88. Rocha ER, Selby T, Coleman JP, Smith CJ. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 1996;178(23):6895-903.
89. Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* 2010;1(10):888-97.
90. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59(3):527-605.
91. Shingu M, Yoshioka K, Nobunaga M, Yoshida K. Human vascular smooth muscle cells and endothelial cells lack catalase activity and are susceptible to hydrogen peroxide. *Inflammation* 1985;9(3):309-20.
92. Góth L, Nagy T. Acatlasemia and diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys* 2012;525(2):195-200.

93. Liao AC, Craver BM, Tseng BP, Tran KK, Parihar VK, Acharya MM, et al. Mitochondrial-targeted human catalase affords neuroprotection from proton irradiation. *Radiat Res* 2013;180(1):1-6.
94. Olsen RH, Johnson LA, Zuloaga DG, Limoli CL, Raber J. Enhanced hippocampus-dependent memory and reduced anxiety in mice over-expressing human catalase in mitochondria. *J Neurochem* 2013;125(2):303-13.
95. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27(9-10):951-65.
96. Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys* 1993;305(2):541-5.
97. Flohe L, Wingender E, Brigelius-Flohe R. The regulation of glutathione peroxidases. In: Forman HJ, Cadenas E, (eds). *Oxidative stress and signal transduction*. New York: Chapman & Hall; 1997. p. 415– 35.
98. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3289-303.
99. Lee WP, Lee CL, Lin HC. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase are essential in the early stage of adriamycin resistance before P-glycoprotein overexpression in HOB1 lymphoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;38(1):45-51.
100. Lu YP, Lou YR, Yen P, Newmark HL, Mirochnitchenko OI, Inouye M, et al. Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer Res* 1997;57(8):1468-74.
101. Ramming T, Hansen HG, Nagata K, Ellgaard L, Appenzeller-Herzog C. GPx8 peroxidase prevents leakage of H₂O₂ from the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 2014;70:106-16.
102. Hall L, Williams K, Perry AC, Frayne J, Jury JA. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J* 1998;333 (Pt 1):5-9.

103. Chen YI, Wei PC, Hsu JL, Su FY, Lee WH. NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. *Am J Transl Res* 2016;8(4):1626-40.
104. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* 2016;95:27-42.
105. Ithayaraja Chandra M. Mini-review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2011;9(2):104-15.
106. Cheng ML, Ho HY, Wu YH, Chiu DT. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient cells show an increased propensity for oxidant-induced senescence. *Free Radic Biol Med* 2004;36(5):580-91.
107. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* 2010;17(9):1373-80.
108. Radford R, Frain H, Ryan MP, Slattery C, McMorrow T. Mechanisms of chemical carcinogenesis in the kidneys. *Int J Mol Sci* 2013;14(10):19416-33.
109. Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, et al. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 1997;25(2):368-78.
110. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
111. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3267-88.
112. Monks TJ, Anders M, Dekant W, Stevens JL, Lau SS, van Bladeren PJ. Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;106(1):1-19.
113. Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat Rev Urol* 2009;6(5):281-9.
114. Smith CV, Jones DP, Guenther TM, Lash LH, Lauterburg BH. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140(1):1-12.
115. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3143-53.

116. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:972913.
117. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43(2):143-81.
118. Wu JH, Batist G. Glutathione and glutathione analogues; therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3350-3.
119. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(21):9926-30.
120. Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol* 1995;15(8):4184-93.
121. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999;13(1):76-86.
122. Raghunath A, Sundarraj K, Arfuso F, Sethi G, Perumal E. Dysregulation of Nrf2 in Hepatocellular Carcinoma: Role in Cancer Progression and Chemoresistance. *Cancers (Basel)* 2018;10(12). pii: E481.
123. Sihvola V, Levonen AL. Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response. *Arch Biochem Biophys* 2017;617:94-100.
124. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev* 2018;98(3):1169-1203.
125. Silva-Islas C, Santana RA, Colín-González AL, Maldonado PD. Nrf2 activation, an innovative therapeutic alternative in cerebral ischemia. In: Balestrino M, (ed). *Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke*. Rijeka: IntechOpen; 2012. p. 347-78.
126. Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res* 2018;134:92-99.

127. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 2000;275(21):16023-9.
128. Zhu J, Wang H, Chen F, Fu J, Xu Y, Hou Y, et al. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy. *Free Radic Biol Med* 2016;99:544-56.
129. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, et al. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol* 2013;33(12):2402-12.
130. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* 2013;1:45-9.
131. Beutler E. Catalase. In: Beutler E, (ed). *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. 3rd ed. Orlando: Grune and Stratton; 1984. p. 105-6.
132. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem* 2007;40(3-4):248-54.
133. Sahebari M, Shakeri F, Azadi HG, Arjmand MH, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh MR, et al . Pro-oxidant- Antioxidant Balance (PAB) in Rheumatoid Arthritis and its Relationship to Disease Activity. *Curr Rheumatol Rev* 2015;11(1):28-33.
134. Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrgang S, Schlöndorff D, Kretzler M. Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int* 2003;64(1):356-60.
135. Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, et al. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2007;8:47.
136. Bjerregaard H, Pedersen S, Kristensen SR, Marcussen N. Reference genes for gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction of renal cell carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2011;20(4):212-7.

137. Wierzbicki PM, Klacz J, Rybarczyk A, Slebioda T, Stanislawowski M, Wronska A, et al. Identification of a suitable qPCR reference gene in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35(12):12473-87.
138. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
139. Javidroozi M, Zucker S, Chen W-T. Plasma seprase and DPP4 levels as markers of disease and prognosis in cancer. *Dis Markers* 2012;32:309-20.
140. Lee WK, Byun SS, Kim HH, Rha KH, Hwang TK, Sung GT, et al. Characteristics and prognosis of chromophobe non-metastatic renal cell carcinoma: A multicenter study. *Int J Urol* 2010;17:898-904.
141. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 2010;58(3):398-406.
142. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 2010;7:245-57.
143. Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Increased risk of renal cell carcinoma subsequent to hysterectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(11):999-1003.
144. Yu CP, Ho JY, Huang YT, Cha TL, Sun GH, Yu DS, et al. Estrogen inhibits renal cell carcinoma cell progression through estrogen receptor- β activation. *PLoS One* 2013;8(2):e56667.
145. van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet* 2009;41(5):521-3.
146. Wang J, Liu L, Xi W, Long Q, Wang Y, Bai Q, et al. Prognostic value of UTX expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2016;34(8):338.e19-27.
147. Samaratunga H, Gianduzzo T, Delahunt B. The ISUP system of staging, grading and classification of renal cell neoplasia. *J Kidney Cancer VHL* 2014;1:26-39.

148. Thompson RH, Kurta JM, Kaag M, Tickoo SK, Kundu S, Katz D, et al. Tumor size is associated with malignant potential in renal cell carcinoma cases. *J Urol* 2009;181:2033-6.
149. Cheville JC, Blute ML, Zincke H, Lohse CM, Weaver AL. Stage pT1 conventional (clear cell) renal cell carcinoma: pathological features associated with cancer specific survival. *J Urol* 2001;166(2):453-6.
150. Lau WK, Cheville JC, Blute ML, Weaver AL, Zincke H. Prognostic features of pathologic stage T1 renal cell carcinoma after radical nephrectomy. *Urology* 2002;59(4):532-7.
151. Qayyum T, McArdle P, Orange C, Seywright M, Horgan P, Oades G, et al. Reclassification of the Fuhrman grading system in renal cell carcinoma-does it make a difference? *Springerplus* 2013;2:378.
152. Keegan KA, Schupp CW, Chamie K, Hellenthal NJ, Evans CP, Koppie TM. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by subtype and stage. *J Urol* 2012;188(2):391-7.
153. Gardner TA, Tirkes T, Mellon M, Koch MO. Imaging techniques for the patient with renal cell carcinoma. *Semin Nephrol* 2011;31(3):245-53.
154. Lightfoot N, Conlon M, Kreiger N, Bissett R, Desai M, Warde P, et al. Impact of noninvasive imaging on increased incidental detection of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2000;37(5):521-7.
155. Leibovich BC, Lohse CM, Crispen PL, Boorjian SA, Thompson RH, Blute ML, et al. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. *J Urol* 2010;183:1309-16.
156. Eronat O, Onursever A, Suren D, Yildirim M, Kandemir O, Ali Kahya H. VEGF receptor subtypes may serve as novel prognostic factors and putative indicators for anti VEGF receptor treatment response in renal cell carcinoma cases. *JBUON* 2016;21:1250-8.
157. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2530-40.
158. Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2010; 28: 319-27.

159. Flanigan RC, Polcari AJ, Huguenin CM. Prognostic variables and nomograms for renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2011; 18: 20-31.
160. Grivas N, Kafarakis V, Tsimaris I, Raptis P, Hastazeris K, Stavropoulos NE. Clinico-pathological prognostic factors of renal cell carcinoma: A 15-year review from a single center in Greece. *Urol Ann* 2014; 6: 116-21.
161. Elmore JM, Kadesky KT, Koeneman KS, Sagalowsky AI. Reassessment of the 1997 TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer* 2003;98:2329-34.
162. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *BMJ* 2014;349:g4797.
163. Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P, et al. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:832-41.
164. Lee JL, Park I, Park K, Park S, Ahn Y, Ahn JH, et al. Efficacy and safety of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma and poor risk features. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:687-93.
165. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma. *Cancer* 2000;89:604-14.
166. Capitanio U, Cloutier V, Zini L, Isbarn H, Jeldres C, Shariat SF, et al. A critical assessment of the prognostic value of clear cell, papillary and chromophobe histological subtypes in renal cell carcinoma: a population-based study. *BJU Int* 2009;103:1496-500.
167. Teloken PE, Thompson RH, Tickoo SK, Cronin A, Savage C, Reuter VE, Russo P. Prognostic impact of histological subtype on surgically treated localized renal cell carcinoma. *J Urol* 2009;182:2132-6.
168. Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson GV. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur Urol* 2005;48:593-600.

169. Hansell P, Welch WJ, Blantz RC, Palm F. Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2013; 40(2):123-37.
170. Brown SA. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38: 157-66.
171. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 2008;57(6):1446-54.
172. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrol* 2012;2012:465897.
173. Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Molina H, Vallés P. Angiotensin II type I antagonist on oxidative stress and heat shock protein 70 (HSP 70) expression in obstructive nephropathy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2005; 51(6):547-55.
174. Sunami R, Sugiyama H, Wang DH, Kobayashi M, Maeshima Y, Yamasaki Y, et al. Acatlasemia sensitizes renal tubular epithelial cells to apoptosis and exacerbates renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286(6):F1030-8.
175. Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Apr;284(4):F863-9.
176. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7:97-110.
177. Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Pavlović I, Gavrilović L, Popović N, Pajović SB. Antioxidant Status and Sex Hormones in Women with Simple Endometrial Hyperplasia. In: Gowder SJT, (ed.) *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Rijeka: IntechOpen; 2015. p. 243-279.
178. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008;11(1):1-15.
179. Edderkaoui M, Hong P, Vaquero EC, Lee JK, Fischer L, Friess H, et al. Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289(6):G1137-47.

180. Oliveira CP, Kassab P, Lopasso FP, Souza HP, Janiszewski M, Laurindo FR, et al. Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer: reduction of oxidative stress. *World J Gastroenterol* 2003;9(3):446-8.
181. Reid TM, Loeb LA. Mutagenic specificity of oxygen radicals produced by human leukemia cells. *Cancer Res* 1992;52(5):1082-6.
182. Chan DW, Liu VW, Tsao GS, Yao KM, Furukawa T, Chan KK, et al. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 2008;29(9):1742-50.
183. Miyajima A, Nakashima J, Yoshioka K, Tachibana M, Tazaki H, Murai M. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br J Cancer* 1997;76(2):206-10.
184. Oberley TD, Sempf JM, Oberley MJ, McCormick ML, Muse KE, Oberley LW. Immunogold analysis of antioxidant enzymes in human renal cell carcinoma. *Virchows Arch* 1994;424(2):155-64.
185. Oberley TD, Sempf JM, Oberley LW. Immunogold analysis of antioxidant enzymes in common renal cancers. *Histol Histopathol* 1996;11(1):153-60.
186. Soini Y, Kallio JP, Hirvikoski P, Helin H, Kellokumpu-Lehtinen P, Tammela TL, et al. Antioxidant enzymes in renal cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2006; 21: 157-65.
187. Pljesa-Ercegovic M, Mimic-Oka J, Dragicevic D, Savic-Radojevic A, Opacic M, Pljesa S, et al. Altered antioxidant capacity in human renal cell carcinoma: role of glutathione associated enzymes. *Urol Oncol* 2008; 26: 175-81.
188. Ganesamoni R, Bhattacharyya S, Kumar S, Chauhan A, Mete UK, Agarwal MM, et al. Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma. *J Urol* 2012; 187: 1172-6.
189. Ridge CA, Pua BB, Madoff DC. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma. *Semin Intervent Radiol* 2014; 31: 3-8.
190. Hatem E, Azzi S. Oxidative Stress in carcinogenesis and therapy. *J Cell Signal* 2016; 1(1):102.
191. Block K. Oxidative stress and redox-signaling in renal cell cancer. In: Amato R, (ed). *Emerging Research and Treatments in Renal Cell Carcinoma*. Rijeka: IntechOpen; 2012.

192. Fitzgerald JP, Nayak B, Shanmugasundaram K, Friedrichs W, Sudarshan S, Eid AA, et al. Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin 6- and 8- production. *PLoS One* 2012;7(1):e30712.
193. Gregg JL, Turner RM 2nd, Chang G, Joshi D, Zhan Y, Chen L, et al. NADPH oxidase NOX4 supports renal tumorigenesis by promoting the expression and nuclear accumulation of HIF2 α . *Cancer Res* 2014;74(13):3501-11.
194. Nayak BK, Feliens D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, et al. Stabilization of HIF-2 α through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 2013;32(26):3147-55.
195. Martínez-Sáez O, Gajate Borau P, Alonso-Gordoa T, Molina-Cerrillo J, Grande E. Targeting HIF-2 α in clear cell renal cell carcinoma: A promising therapeutic strategy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;111:117-23.
196. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2018;80:50-64.
197. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
198. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002;27(7):339-44.
199. Mehle C, Ljungberg B, Roos G. Telomere shortening in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1994;54(1):236-41.
200. Willeit P, Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstätter A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA* 2010;304(1):69-75.
201. Fujioka T, Hasegawa M, Suzuki Y, Suzuki T, Sugimura J, Tanji S, et al. Telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2000;7(1):16-21.
202. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc* 2011;110(5):275-89.
203. Pal D, Sharma U, Singh SK, Kakkar N, Prasad R. Over-expression of telomere binding factors (TRF1 & TRF2) in renal cell carcinoma and their inhibition by using SiRNA induce apoptosis, reduce cell proliferation and migration invitro. *PLoS One* 2015;10(3):e0115651.

204. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30(11):1191-212.
205. Huang ZZ, Chen C, Zeng Z, Yang H, Oh J, Chen L, et al. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J* 2001;15(1):19-21.
206. Savic-Radojevic A, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Opacic M, Dragicevic D, Kravic T, et al. Glutathione S-transferase-P1 expression correlates with increased antioxidant capacity in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 2007;52(2):470-7.
207. Butler RN, Butler WJ, Moraby Z, Fettman MJ, Khoo KK, Roberts-Thomson IC. Glutathione concentrations and glutathione S-transferase activity in human colonic neoplasms. *J Gastroenterol Hepatol* 1994;9(1):60-3.
208. Teppo HR, Soini Y, Karihtala P. Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:1485283.
209. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134(3):489-92.
210. Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC, et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell* 2015;27(2):211-22.
211. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2016;81:163-75.
212. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:360438.
213. Szachowicz-Petelska B, Dobrzyńska I, Skrodzka M, Darewicz B, Figaszewski ZA, Kudelski J. Phospholipid composition and electric charge in healthy and cancerous parts of human kidneys. *J Membr Biol* 2013;246(5):421-5.
214. Catalá A. Lipid peroxidation inhibition, effects and mechanisms. New York: Nova Publishers; 2017.

215. Faronato M, Muzzonigro G, Milanese G, Menna C, Bonfigli AR, Catalano A, et al. Increased expression of 5-lipoxygenase is common in clear cell renal cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2007;22(10):1109-18.
216. Tuna B, Yorukoglu K, Gurel D, Mungan U, Kirkali Z. Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma. *Urology*. 2004 Dec;64(6):1116-20.
217. Yu ZH, Zhang Q, Wang YD, Chen J, Jiang ZM, Shi M, et al. Overexpression of cyclooxygenase-1 correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(6):3729-34.
218. Sanchez M, Torres JV, Tormos C, Iradi A, Muñiz P, Espinosa O, et al. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett* 2006;233(1):28-35.
219. Qebesly HS, Zakhary MM, Abd-Alaziz MA, Abdel Ghany AA, Maximus DW. Tissue levels of oxidative stress markers and antioxidants in breast cancer patients in relation to tumor grade. *AL-AZHAR ASSIUT MEDICAL JOURNAL*.
220. Gago-Dominguez M, Castelao JE. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med* 2006;40(4):721-33.
221. Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biol* 2015;4:193-9.
222. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015;19(1A):A68-77.
223. Hutter C, Zenklusen JC. The Cancer Genome Atlas: Creating Lasting Value beyond Its Data. *Cell* 2018;173(2):283-5.
224. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499:43-9.
225. Šverko A, Sobočanec S, Kušić B, Mačak-Šafranko Z, Sarić A, Leniček T, et al. Superoxide dismutase and cytochrome P450 isoenzymes might be associated with higher risk of renal cell carcinoma in male patients. *Int Immunopharmacol* 2011;11(6):639-45.

226. Durak I, Bedük Y, Kavutcu M, Oztürk S, Canbolat O, Ulutepe S. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes in cancerous and non-cancerous human kidney tissues. *Int Urol Nephrol* 1997;29(1):5-11.
227. Vieira de Ribeiro AJ, Sandim V, Ornellas AA, Reis RS, Domont G, Alves G. Differential proteome of clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC) tissues. *Int Braz J Urol* 2013;39(1):83-94.
228. Monari M, Trincherro A, Calabrese C, Cattani O, Serrazanetti GP, Foschi J, et al. Superoxide dismutase in gastric adenocarcinoma: is it a clinical biomarker in the development of cancer? *Biomarkers* 2006;11(6):574-84.
229. Arsova-Sarafinovska Z, Eken A, Matevska N, Erdem O, Sayal A, Savaser A, et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clin Biochem* 2009;42(12):1228-35.
230. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11(3):403-6.
231. Skrzycki M, Scibior D, Podsiad M, Czczot H. Activity and protein level of CuZnSOD and MnSOD in benign and malignant liver tumors. *Clin Biochem* 2008;41(1-2):91-6.
232. Svensk AM, Soini Y, Pääkkö P, Hiravikoski P, Kinnula VL. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2004;122(3):395-404.
233. Siomek A, Brzoska K, Sochanowicz B, Gackowski D, Rozalski R, Foksinski M, et al. Cu,Zn-superoxide dismutase deficiency in mice leads to organ-specific increase in oxidatively damaged DNA and NF- κ B1 protein activity. *Acta Biochim Pol* 2010;57(4):577-83.
234. Block K, Gorin Y, New DD, Eid A, Chelmicki T, Reed A, et al. The NADPH oxidase subunit p22phox inhibits the function of the tumor suppressor protein tuberlin. *Am J Pathol* 2010;176(5):2447-55.
235. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4726-34.

236. Shi T, Dong F, Liou LS, Duan ZH, Novick AC, DiDonato JA. Differential protein profiling in renal-cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2004;40(1):47-61.
237. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell* 2016;166(3):555-66.
238. Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep* 2018;23(12):3698.
239. Hervouet E, Simonnet H, Godinot C. Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie* 2007;89(9):1080-8.
240. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, et al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 2003;16(1):29-37.
241. Liu R, Oberley TD, Oberley LW. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum Gene Ther* 1997;8(5):585-95.
242. Li JJ, Oberley LW, St Clair DK, Ridnour LA, Oberley TD. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene*. 1995;10(10):1989-2000.
243. Malafa M, Margenthaler J, Webb B, Neitzel L, Christophersen M. MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. *J Surg Res* 2000;88(2):130-4.
244. Janssen AM, Bosman CB, Sier CF, Griffioen G, Kubben FJ, Lamers CB, et al. Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1998;78(8):1051-7.
245. Hempel N, Carrico PM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11(2):191-201.
246. Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 2001;61(23):8578-85.

247. Jeon SH, Park JH, Chang SG. Expression of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase) in human bladder cancer. *Korean J Urol* 2007;48(9):921-6.
248. Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Kasapović J, Pajović SB. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrium of patients with polyps, myoma, hyperplasia and adenocarcinoma. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:149.
249. Portakal O, Ozkaya O, Erden Inal M, Bozan B, Koşan M, Sayek I. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem* 2000;33(4):279-84.
250. Hwang TS, Choi HK, Han HS. Differential expression of manganese superoxide dismutase, copper/zinc superoxide dismutase, and catalase in gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa. *Eur J Surg Oncol* 2007;33(4):474-9.
251. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2003;148(5):913-22.
252. Min JY, Lim SO, Jung G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett* 2010;584(11):2427-32.
253. Tafani M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, Polese M, et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:3907147.
254. Evelönn EA, Degerman S, Köhn L, Landfors M, Ljungberg B, Roos G. DNA methylation status defines clinicopathological parameters including survival for patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). *Tumour Biol* 2016;37(8):10219-28.
255. Evelönn EA, Landfors M, Haider Z, Köhn L, Ljungberg B, Roos G, et al. DNA methylation associates with survival in non-metastatic clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2019;19(1):65.
256. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010;49(11):1603-16.

257. Kobayashi M, Sugiyama H, Wang DH, Toda N, Maeshima Y, Yamasaki Y, et al. Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2005 Sep;68(3):1018-31.
258. Khan MA, Tania M, Zhang DZ, Chen HC. Antioxidant enzymes and cancer. *Chin J Cancer Res* 2010;22(2): 87-92.
259. López-Lázaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 2007;252(1):1-8.
260. Forsberg L, Lyrenäs L, de Faire U, Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med* 2001;30(5):500-5.
261. Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic Res* 2003;37(5):543-53.
262. Cao C, Leng Y, Liu X, Yi Y, Li P, Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Biochemistry* 2003;42(35):10348-53.
263. Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(5-6):619-26.
264. Sadi G, Bozan D, Yildiz HB. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem* 2014;393(1-2):111-22.
265. Frederiks WM, Bosch KS, Hoeben KA, van Marle J, Langbein S. Renal cell carcinoma and oxidative stress: The lack of peroxisomes. *Acta Histochem* 2010;112(4):364-71.
266. Glorieux C, Dejeans N, Sid B, Beck R, Calderon PB, Verrax J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2011;82(10):1384-90.

267. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011;15(7):1957-97.
268. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Bogatyrova OO, Vozianov SO, Zgonnyk YM, et al. Genetic and epigenetic changes of GPX1 and GPX3 in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell* 2013;29(5):395-401.
269. Pronina IV, Klimov EA, Burdenny AM, Beresneva EV, Fridman MV, Ermilova VD, et al. Methylation of the genes for the microRNAs miR-129-2 and miR-9-1, changes in their expression, and activation of their potential target genes in clear cell renal cell carcinoma. *Mol Biol (Mosk)* 2017;51(1):73-84.
270. Pronina IV, Loginov VI, Burdenny AM, Fridman MV, Kazubskaya TP, Dmitriev AA, et al. Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene* 2016;576(1 Pt 3):483-91.
271. Hildebrandt MA, Gu J, Lin J, Ye Y, Tan W, Tamboli P, et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 2010;29(42):5724-8.
272. Beresneva EV, Loginov VI, Khodyrev DS, Pronina IV, Kazubskaya TP, Karpukhin AV, et al. The hyper-methylated genes microRNA as potential markers of clear-cell carcinoma of kidney. *Klin Lab Diagn* 2017;62(1):13-8.
273. Tabatabaie T, Floyd RA. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch Biochem Biophys* 1994;314(1):112-9.
274. Pigeolet E, Remacle J. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 1991;11(2):191-5.
275. Lu J, Chew EH, Holmgren A. Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(30):12288-93.

276. Yan J, Ralston MM, Meng X, Bongiovanni KD, Jones AL, Benndorf R, et al. Glutathione reductase is essential for host defense against bacterial infection. *Free Radic Biol Med* 2013;61:320-32.
277. Li X, Wu J, Zhang X, Chen W. Glutathione reductase-mediated thiol oxidative stress suppresses metastasis of murine melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 2018;129:256-67.
278. Hwang GH, Ryu JM, Jeon YJ, Choi J, Han HJ, Lee YM, et al. The role of thioredoxin reductase and glutathione reductase in plumbagin-induced, reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cell lines. *Eur J Pharmacol* 2015;765:384-93.
279. Sudarshan S, Shanmugasundaram K, Naylor SL, Lin S, Livi CB, O'Neill CF, et al. Reduced expression of fumarate hydratase in clear cell renal cancer mediates HIF-2 α accumulation and promotes migration and invasion. *PLoS One* 2011;6(6):e21037.
280. Zheng L, Cardaci S, Jerby L, MacKenzie ED, Sciacovelli M, Johnson TI, et al. Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. *Nat Commun.* 2015;6:6001
281. Sullivan LB, Martinez-Garcia E, Nguyen H, Mullen AR, Dufour E, Sudarshan S, et al. The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling. *Mol Cell* 2013;51(2):236-48.
282. Freitas M, Baldeiras I, Proença T, Alves V, Mota-Pinto A, Sarmiento-Ribeiro A. Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase. *FEBS Open Bio* 2012;2:119-28.
283. Romero-Ramos M, Venero JL, Garcia-Rodriguez S, Ayala A, Machado A, Cano J. Semichronic inhibition of glutathione reductase promotes oxidative damage to proteins and induces both transcription and translation of tyrosine hydroxylase in the nigrostriatal system. *Free Radic Res* 2003;37(9):1003-12.
284. Schallreuter KU, Gleason FK, Wood JM. The mechanism of action of the nitrosourea anti-tumor drugs on thioredoxin reductase, glutathione reductase and ribonucleotide reductase. *Biochim Biophys Acta* 1990;1054(1):14-20.

285. Ren X, Santhosh SM, Coppo L, Ogata FT, Lu J, Holmgren A. The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. *Free Radic Biol Med* 2019;134:350-8.
286. Hollman AL, Tchounwou PB, Huang HC. The Association between Gene-Environment Interactions and Diseases Involving the Human GST Superfamily with SNP Variants. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(4):379.
287. Chuang ST, Chu P, Sugimura J, Tretiakova MS, Papavero V, Wang K, et al. Overexpression of glutathione s-transferase alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2005;123(3):421-9.
288. Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett* 2018;433:33-42.
289. Lo HW, Ali-Osman F. Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7(4):367-74.
290. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(5):3267-88.
291. Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Matic M, Coric V, Djukic T, Radic T, et al. Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors. *Int J Mol Sci* 2018;19(12):3785.
292. Benjamin D, Moroni C. mRNA stability and cancer: an emerging link? *Expert Opin Biol Ther* 2007;7(10):1515-29.
293. Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J, Awasthi S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;289(3):361-70.
294. Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J, Backdahl J, Tretiakova M, Qian CN, et al. Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* 2003;22(43):6810-8.
295. Klöne A, Weidner U, Hussnätter R, Harris J, Meyer D, Peter S, et al. Decreased expression of the glutathione S-transferases alpha and pi genes in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 1990;11(12):2179-83.
296. Howie AF, Forrester LM, Glancey MJ, Schlager JJ, Powis G, Beckett GJ, et al. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. *Carcinogenesis* 1990;11(3):451-8.

297. Eickelmann P, Ebert T, Warskulat U, Schulz WA, Sies H. Expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and glutathione S-transferases alpha and pi in human renal cell carcinoma and in kidney cancer-derived cell lines. *Carcinogenesis* 1994;15(2):219-25.
298. Simić T, Mimić-Oka J, Ille K, Dragicević D, Savić-Radojević A. Glutathione S-transferase isoenzyme profile in non-tumor and tumor human kidney tissue. *World J Urol* 2003;20(6):385-91.
299. Chikezie, P. C. Glutathione S-transferase activity in diagnostic pathology. *Metabolomics* 2015;5:153.
300. Coric VM, Simic TP, Pekmezovic TD, Basta-Jovanovic GM, Savic Radojevic AR, Radojevic-Skodric SM, et al. Combined GSTM1-Null, GSTT1-Active, GSTA1 Low-Activity and GSTP1-Variant Genotype Is Associated with Increased Risk of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS One* 2016;11(8):e0160570.
301. Narayanankutty A, Jdevagiri JT, Narayanankutty V. Glutathione, an antioxidant tripeptide: Dual roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. *Curr Protein Pept Sci* 2019; doi:10.2174/1389203720666190206130003. [Epub ahead of print]
302. Searchfield L, Price SA, Betton G, Jasani B, Riccardi D, Griffiths DF. Glutathione S-transferases as molecular markers of tumour progression and prognosis in renal cell carcinoma. *Histopathology* 2011;58(2):180-90.
303. Di Ilio C, Aceto A, Bucciarelli T, Angelucci S, Felaco M, Grilli A, et al. Glutathione transferase isoenzymes in normal and neoplastic human kidney tissue. *Carcinogenesis* 1991;12(8):1471-5.
304. 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.
305. Glasgow SC, Yu J, Carvalho LP, Shannon WD, Fleshman JW, McLeod HL. Unfavourable expression of pharmacologic markers in mucinous colorectal cancer. *Br J Cancer* 2005;92(2):259-64.

306. Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, Kim SJ, et al. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci* 2012;103(5):913-20.
307. Siegel D, Yan C, Ross D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol* 2012;83(8):1033-40.
308. Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys* 2010;500(2):116-22.
309. Ostman A. The tumor microenvironment controls drug sensitivity. *Nat Med* 2012;18(9):1332-4.
310. Ćorić V, Plješa-Ercegovac M, Džamić Z. The role of glutathione transferases in renal cell carcinoma. *MedPodml* 2016;67(3):42-8.
311. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(6):3410-5.
312. Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 2004;36(10):1208-13.
313. Wang J, Zhang M, Zhang L, Cai H, Zhou S, Zhang J, et al. Correlation of Nrf2, HO-1, and MRP3 in gallbladder cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. *J Surg Res* 2010;164(1):e99-105.
314. Hu XF, Yao J, Gao SG, Wang XS, Peng XQ, Yang YT, et al. Nrf2 overexpression predicts prognosis and 5-FU resistance in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(9):5231-5.
315. Liew PL, Hsu CS, Liu WM, Lee YC, Lee YC, Chen CL. Prognostic and predictive values of Nrf2, Keap1, p16 and E-cadherin expression in ovarian epithelial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(5):5642-9.
316. Ooi A, Dykema K, Ansari A, Petillo D, Snider J, Kahnoski R, et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2013;73(7):2044-51.

317. Fabrizio FP, Sparaneo A, Trombetta D, Muscarella LA. Epigenetic versus Genetic Dereglulation of the KEAP1/NRF2 Axis in Solid Tumors: Focus on Methylation and Noncoding RNAs. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:2492063.
318. Fabrizio FP, Costantini M, Copetti M, la Torre A, Sparaneo A, Fontana A, et al. Keap1/Nrf2 pathway in kidney cancer: frequent methylation of KEAP1 gene promoter in clear renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;8(7):11187-98.
319. Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB, Schmidlin CJ, Chapman E, Zhang DD. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019;59:555-75.
320. Gañán-Gómez I, Wei Y, Yang H, Boyano-Adánez MC, García-Manero G. Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radic Biol Med* 2013;65:750-64.
321. Hintsala HR, Jokinen E, Haapasaari KM, Moza M, Ristimäki A, Soini Y, Koivunen J, Karihtala P. Nrf2/Keap1 Pathway and Expression of Oxidative Stress Lesions 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and Nitrotyrosine in Melanoma. *Anticancer Res* 2016;36(4):1497-506.
322. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* 2006;3(10):e420.
323. Hayden A, Douglas J, Sommerlad M, Andrews L, Gould K, Hussain S, et al. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer. *Urol Oncol* 2014;32(6):806-14.
324. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med* 2014;66:36-44.
325. Solis LM, Behrens C, Dong W, Suraokar M, Ozburn NC, Moran CA, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2010;16(14):3743-53.
326. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Fountzilas E, Francoeur N, Sanisetty S, Grammatikos AP, et al. Keap1 mutations and Nrf2 pathway activation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2011;71(15):5081-9.

327. Ji X, Wang H, Zhu J, Tang Y, Zhou Y, Zhu L, et al. Correlation of Nrf2 and HIF-1 α in glioblastoma and their relationships to clinicopathologic features and survival. *Neurol Res* 2013;35(10):1044-50.
328. Jung BJ, Yoo HS, Shin S, Park YJ, Jeon SM. Dysregulation of NRF2 in Cancer: from Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Biomol Ther (Seoul)* 2018;26(1):57-68.
329. Leinonen HM, Ruotsalainen AK, Määttä AM, Laitinen HM, Kuosmanen SM, Kansanen E, et al. Oxidative stress-regulated lentiviral TK/GCV gene therapy for lung cancer treatment. *Cancer Res* 2012;72(23):6227-35.
330. Qin WS, Deng YH, Cui FC. Sulforaphane protects against acrolein-induced oxidative stress and inflammatory responses: modulation of Nrf-2 and COX-2 expression. *Arch Med Sci* 2016;12:871-80.
331. Soini Y, Kallio JP, Hirvikoski P, Helin H, Kellokumpu-Lehtinen P, Kang SW, et al. Oxidative/nitrosative stress and peroxiredoxin 2 are associated with grade and prognosis of human renal carcinoma. *APMIS* 2006;114:329-37.
332. Lusini L, Tripodi SA, Rossi R, Giannerini F, Giustarini D, del Vecchio MT, et al. Altered glutathione anti-oxidant metabolism during tumor progression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;91:55-9.
333. Rodriguez-Vida A, Strijbos M, Hutson T. Predictive and prognostic biomarkers of targeted agents and modern immunotherapy in renal cell carcinoma. *ESMO Open* 2016;1:e000013.
334. Castellano I, Merlino A. Gamma-glutamyl transpeptidases: Structure and Function. Basel: Springer; 2013.
335. Hofbauer SL, Stangl KI, de Martino M, Lucca I, Haitel A, Shariat SF, et al. Pretherapeutic gamma-glutamyltransferase is an independent prognostic factor for patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2014;111:1526-31.
336. Pirinççi N, Kaba M, Geçit İ, Güneş M, Yüksel MB, Tanık S, et al. Serum prolidase activity, oxidative stress, and antioxidant enzyme levels in patients with renal cell carcinoma. *Toxicol Ind Health* 2016;32:193-9.

8. БИОГРАФИЈА АУТОРА

Иван Љ. Павловић је рођен 7. јула 1983. године у Београду, где је завршио основну школу и средњу Медицинску школу. Дипломирао је на Биолошком факултету Универзитета у Београду 2010. године са просечном оценом 8,97, одбранивши дипломски рад под називом „Молекулски механизам деловања лекова на глатки мишић утеруса“ са оценом десет. Докторске студије је уписао 2011. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биологија.

Запослен је у Институт за нуклеарне науке „Винча“ од 1. фебруара 2012. године, где ради као истраживач сарадник у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију. Ангажован је на пројекту „Ћелијске и молекулске основе малигних и кардиоваскуларних обољења - клиничке импликације“ финансираног од стране Министарста просвете науке и технолошког развоја (Ш 41027) под руководством др Снежане Пејић, вишег научног сарадника Института за нуклеарне науке „Винча“. Иван Љ. Павловић је 2015. године био у двомесечном истраживачком боравку на Институту за патолошку физиологију Медицинског факултета Универзитета у Љубљани, где је радио на проблематици стресног одговора хепатоцита под руководством проф. Ирине Милисав.

Члан је Српског друштва за митохондријалну и слободно-радикалску физиологију, Друштва физиолога Србије, Српског биохемијског друштва и Друштва за истраживање слободних радикала-Европа (Society for Free Radical Research Europe, SFRR-E). Добитник је стипендије SFRR-E за учешће на летњој школи „FEBS Advanced Lecture Course: Redox-omic Technologies and their Application in Health and Disease“ одржаној 2018. године на Спецесу у Грчкој.

У досадашњој истраживачкој каријери, Иван Љ. Павловић је аутор и коаутор на 15 научних радова, 2 поглавља у књизи, 4 конгресна саопштења штампана у целини и 17 конгресних саопштења штампаних у изводу.

9. ПРИЛОЗИ

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Иван Љ. Павловић _____

број индекса _____ Б3027/2011 _____

Изјављујем

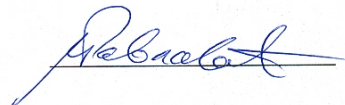
да је докторска дисертација под насловом

Прогностички значај клиничко-патолошких и антиоксидативних параметара
код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 27. 6. 2019. _____



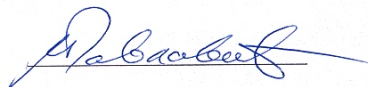
Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**Име и презиме аутора Иван Љ. ПавловићБрој индекса Б3027/2011Студијски програм БиологијаНаслов рада Прогностички значај клиничко-патолошких и антиоксидативних
параметара код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрегаМентор проф. др Снежана Б. Пајовић и проф. др Синиша ЂурашевићПотписани/а Иван Љ. Павловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторандаУ Београду, 27. 6. 2019.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Прогностички значај клиничко-патолошких и антиоксидативних параметара код пацијената оболелих од тубуларног карцинома бубрега

која је моје ауторско дело.

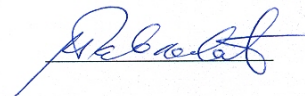
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 27. 6. 2019.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.