

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Predrag Z. Nikić

POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA  
ZA GLUTATION PEROKSIDAZU I SUPEROKSID  
DISMUTAZU SA NASTANKOM I PROGRESIJOM  
KARCINOMA PRELAZNOG EPITELA MOKRAĆNE  
BEŠIKE

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Predrag Z. Nikić

THE ASSOCIATION OF GLUTATHIONE  
PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE  
GENE POLYMORPHISMS  
WITH UROTHELIAL BLADDER CANCER  
DEVELOPMENT AND PROGRESSION

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

**Mentor:**

**Prof. Dr Dejan Dragičević**

Vanredni Profesor Urologije  
Klinika za Urologiju, Klinički centar Srbije, Beograd  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Komentor:**

**Doc. Dr Marija Matić**

Docent Medicinske i kliničke biohemije  
Institut za Medicinsku i kliničku biohemiju  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi Komisije:**

**Prof. dr Zoran Džamić**

Redovni Profesor Urologije  
Klinika za Urologiju, Klinički centar Srbije, Beograd  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Marija Plješa Ercegovac**

Vanredni Profesor Medicinske i kliničke biohemije  
Institut za Medicinsku i kliničku biohemiju  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Goran Marušić**

Redovni Profesor Urologije  
Klinika za Urologiju, Klinički centar Vojvodine, Novi Sad  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Zahvaljujem se,

Prijateljima, na osvetljavanju puta prema uspehu i sreći

Neprijateljima, na snazi da na tom putu istrajem

Posvećeno,

Mojoj porodici... s ljubavlju onima koji su živi, i uspomeni na one koji više nisu

## SAŽETAK

### **POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION PEROKSIDAZU I SUPEROKSID DISMUTAZU SA NASTANKOM I PROGRESIJOM KARCINOMA PRELAZNOG EPITELA MOKRAĆNE BEŠIKE**

**Predrag Z. Nikić**

**Uvod:** Smatra se da oksidativni stres može imati ulogu u nastanku i progresiji karcinoma. Prvi sistem odbrane od oksidativnog stresa čine antioksidantni enzimi glutation peroksidaza 1 (*GPX1*) i superoksid dismutaza 2 (*SOD2*). Kod oba antioksidantna enzima uočen je genetski polimorfizam koji rezultuje njihovom izmenjenom enzimskom aktivnosti. U ovoj studiji ispitivana je povezanost genetskih varijanti *GPX1* i *SOD2* sa rizikom za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (UKMB), kao i moguća interakcija ovih genetskih varijanti sa poznatim faktorima rizika na rizik za nastanak UKMB. Pored toga, određivan je uticaj genetskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* na fenotipske karakteristike tumora, kao što su stadijum bolesti i histološki gradus tumora. Dodatno je procenjivana potencijalna prognostička uloga genetskih varijanti *GPX1* i *SOD2* u preživljavanju pacijenata sa metastatskim UKMB koji su lečeni hemioterapijom na bazi cisplatina.

**Materijal i Metode:** U ovu prospektivnu studiju bilo je uključeno 330 pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike (prosečne starosti  $65 \pm 10,3$  godina) i 227 zdravih osoba koje su činile kontrolnu grupu (prosečne starosti  $63,4 \pm 7,9$  godina). Polimorfizam *GPX1* (*rs1050450*) gena je bio određivan *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) metodom, a polimorfizam *SOD2* (*rs4880*) gena je bio određivan metodom kvantitativnog PCR (q-PCR). U cilju ispitivanja uticaja *GPX1* i *SOD2* genotipova na ukupno preživljavanje, pacijenti sa metastatskim UKMB koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju praćeni su u periodu od dve godine. Za procenu značajnosti razlike u frekvenciji dobijenih genotipova između ispitivanih bolesnika i kontrolne grupe korišćen je  $\chi^2$  test. Efekti genetskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2*, nezavisno ili u kombinaciji, i rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike su

procenjivani pomoću univarijantne logističke regresije. Ukupno preživljavanje pacijenata bilo je određivano Kaplan–Meier-ovom analizom preživljavanja i log-rank testom za procenu prognostičkog značaja.

**Rezultati:** Dobijeni rezultati su pokazali da su pušenje i profesionalna izloženost bili značajni nezavisni faktori rizika za nastanak UKMB (OR=3,9, 95%CI=2,9-6;  $p<0,001$ ; OR=1,9, 95%CI=1,1-3,2;  $p=0,013$ ). Pored toga, uočena je značajna povezanost između *SOD2* genotipa sa rizikom za nastanak UKMB ( $p<0,05$ ). Naime, prisustvo jednog ili oba *SOD2-Val* alela bilo je povezano sa značajno većim rizikom za nastanak UKMB (OR=1,55, 95%CI=1,03-2,3,  $p=0,03$ ). Štaviše, uočeno je postojanje kombinovanog efekta *SOD2* polimorfizma sa pušenjem u povećanju rizika za nastanak UKMB (OR=7,5, 95%CI=3,4-16,3,  $p<0,001$ ). S druge strane, nije uočeno postojanje povezanosti polimorfizma *GPX1* sa rizikom za nastanak UKMB. Međutim, stratifikacija prema stadijumu bolesti i gradusu tumora, pokazala je značajno veću učestalost detekcije *GPX1-Leu* alela kod pacijenata sa nižim stadijumom bolesti ( $p=0,049$ ) i nižim gradusom tumora mokraćne bešike ( $p=0,018$ ). Kaplan-Meier-ova analiza preživljavanja pokazala da ne postoji značajan uticaj *GPX1* i *SOD2* polimorfizma na ukupno preživljavanje pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju ( $p>0,05$ ).

**Zaključak:** Genetski polimorfizam antioksidantnog enzima *SOD2* modulira rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, nezavisno i u sadejstvu sa pušenjem. Genetski polimorfizam enzima *GPX1* povezan je sa fenotipskim karakteristikama i stepenom invazivnosti urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. *GPX1* i *SOD2* polimorfizam ne utiče na ukupno preživljavanje pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju.

**Ključne reči:** urotelijalni karcinom mokraćne bešike, genetski polimorfizam, ukupno preživljavanje, hemioterapija, *GPX1*, *SOD2*

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Urološka onkologija

**UDK:**

## ABSTRACT

### **THE ASSOCIATION OF GLUTATHIONE PEROXIDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE GENE POLYMORPHISMS WITH UROTHELIAL BLADDER CANCER DEVELOPMENT AND PROGRESSION**

**Predrag Z. Nikić**

**Background:** Oxidative stress is thought to be involved in cancer development and progression. Glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) and superoxide dismutase 2 (*SOD2*) play key roles in first line antioxidative defense. For both of them, genetic polymorphisms, resulting in altered enzyme activity have been described. The aim of this study was to investigate the association of *GPX1* and *SOD2* genetic variants with the risk of urothelial bladder cancer (UBC) development, and to evaluate possible interactions between these genetic polymorphisms and exposure to known risk factors for UBC. Moreover, we aimed to determine whether pathological features, such as stage of disease and histological grade, were influenced by genetic polymorphisms. Furthermore, the potential prognostic role of *GPX1* and *SOD2* genetic variants in overall survival was evaluated in metastatic UBC patients treated with cisplatin based chemotherapy.

**Methods:** This prospectively designed study enrolled 330 patients with urothelial bladder cancer (mean age  $65 \pm 10.3$  years) and 227 healthy controls (mean age  $63.4 \pm 7.9$  years). *GPX1* (*rs1050450*) single nucleotide polymorphism was assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and *SOD2* (*rs4880*) single nucleotide polymorphism was determined by quantitative PCR (q-PCR). In order to estimate the impact of *GPX1* and *SOD2* genotypes on overall survival, patients with metastatic UBC who received cisplatin based chemotherapy were followed for two years. A chi-squared test was used to analyze the genotype frequency differences between two groups. The effect of genetic polymorphisms on UBC risk was evaluated using univariate logistic regression analysis. Overall survival was evaluated using Kaplan–Meier survival analysis with the log-rank test for prognostic significance.

**Results:** Our results showed that both cigarette smoking and occupational exposure were significant independent risk factors associated with UBC (OR=3.9, 95%CI=2.9-6;  $p<0,001$  and OR=1.9, 95%CI=1.1-3.2;  $p=0,013$ , respectively). We found significant association between *SOD2* genotype and risk of UBC development ( $p<0.05$ ). Namely, presence of at least one *SOD2-Val* allele was associated with a significantly increased risk of UBC (OR=1.55, 95%CI=1.03-2.3,  $p=0.03$ ). Furthermore, a combined effect of *SOD2* polymorphism with smoking has heightened the risk (OR=7.5, 95%CI=3.4-16.3,  $p<0.001$ ). No significant association of *GPX1* polymorphism with UBC risk was observed. Nevertheless, when stratified according to tumor stage and grade, *GPX1-Leu* allele was significantly more frequently observed in bladder cancer patients with low-stage ( $p=0.049$ ) and low-grade tumors ( $p=0.018$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed no association between both *SOD2* and *GPX1* polymorphisms and overall survival in patients with metastatic UBC who received cisplatin based chemotherapy ( $p>0.05$ )

**Conclusions:** Genetic polymorphism of the antioxidant enzyme *SOD2* modulates the risk of UBC development independently and in combination with cigarette smoking. Genetic polymorphism of the enzyme *GPX1* is associated with the phenotypic characteristics and invasiveness of UBC. *GPX1* and *SOD2* polymorphisms do not affect the overall survival in patients with metastatic UBC who received cisplatin-based chemotherapy.

**Key words:** urothelial bladder cancer, risk, genetic polymorphisms, overall survival, chemotherapy, *GPX1*, *SOD2*

**Scientific Field:** Medicine

**Scientific Discipline:** Urologic Oncology

**UDC:**



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 Karcinom mokraćne bešike	2
1.1.1 Epidemiologija karcinoma mokraćne bešike: incidenca, prevalenca i mortalitet	2
1.1.2 Dijagnoza karcinoma mokraćne bešike	7
1.1.2.1 Procena stadijuma bolesti	8
1.1.2.2 Patohistološka klasifikacija i procena gradusa tumora	11
1.1.2.3 Molekularna klasifikacija	13
1.1.3 Faktori spoljne sredine u nastanku karcinoma mokraćne bešike	14
1.1.4 Genetski faktori u nastanku karcinoma mokraćne bešike	18
1.1.5 Oksidativni stres u nastanku karcinoma mokraćne bešike	19
1.1.5.1 Glutation peroksidaza	20
1.1.5.2 Superoksid dismutaza	21
1.1.5.3 Polimorfizam gena za <i>GPX1</i> i <i>SOD2</i>	23
1.1.6 Lečenje karcinoma mokraćne bešike - nemetastatska bolest	25
1.1.7 Lečenje karcinoma mokraćne bešike - metastatska bolest	29
1.1.7.1 Oksidativni stres u terapijskoj efikasnosti cisplatin bazirane hemioterapije	32
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>37</b>
3.1 Selekcija ispitanika	38
3.2 Uzimanje uzoraka krvi	40
3.3 Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi	40
3.4 Određivanje <i>GPX1</i> polimorfizma	41
3.5 Određivanje <i>SOD2</i> polimorfizma	41
3.6 Statistička analiza	42
<b>4. REZULTATI</b>	<b>43</b>
4.1 Demografske i kliničke karakteristike ispitanika	44
4.2 Polimorfizam <i>GPX1</i> i <i>SOD2</i> gena kod pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike i kontrolne grupe	46
4.3 Povezanost genetskog polimorfizma <i>GPX1</i> sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike	50
4.4 Povezanost genetskog polimorfizma <i>SOD2</i> sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike	52
4.5 Demografske karakteristike pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju i kontrola	53
4.6 Ukupno preživljavanje pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju prema statusu prethodno uradjene cistektomije	54
4.7 Prognostička uloga polimorfizma <i>GPX1</i> i <i>SOD2</i> kod pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike koji su lečeni hemioterapijom na bazi cisplatina	56
<b>5. DISKUSIJA</b>	<b>60</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERENCE</b>	<b>72</b>

# **1. UVOD**

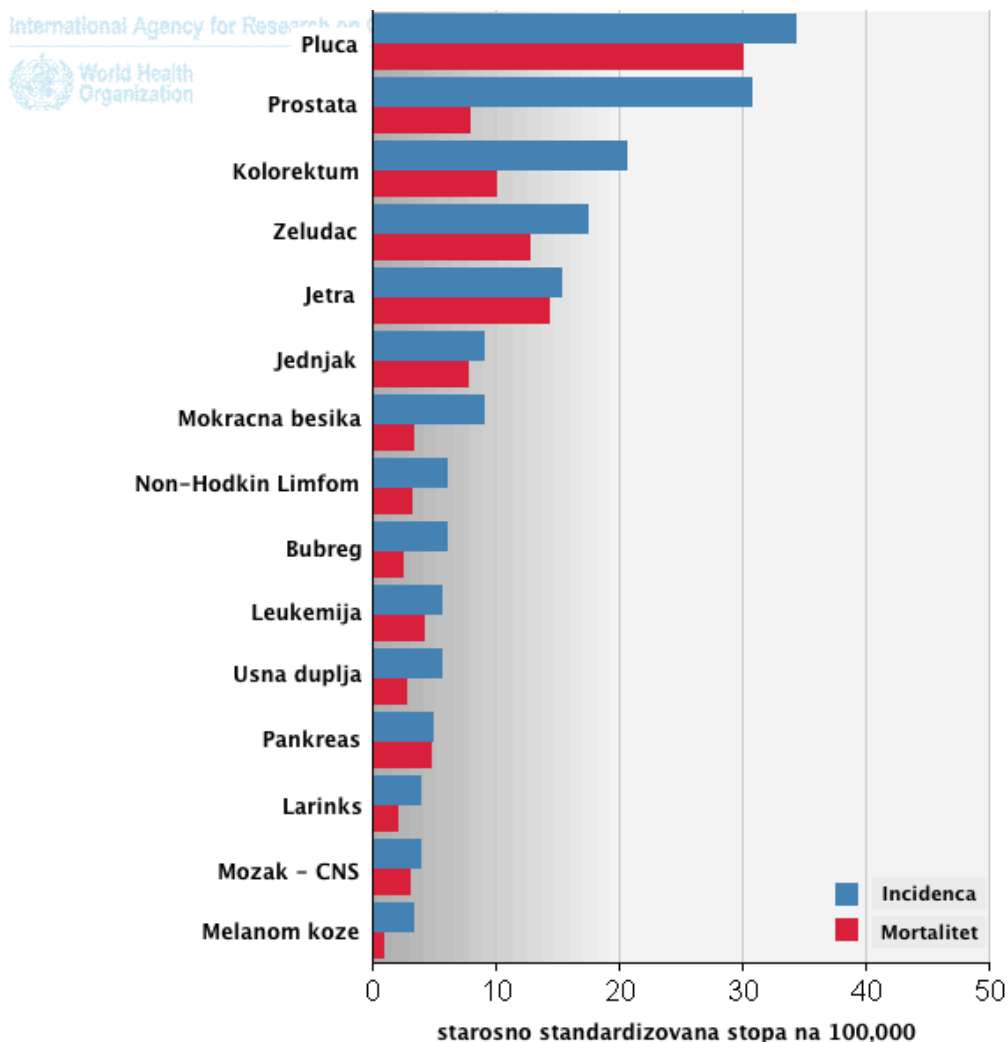
## **1.1 Karcinom mokraćne bešike**

Među svim urološkim malignim tumorima, urotelijalni karcinom mokraćne bešike (UKMB) je drugi po učestalosti, odmah posle karcinoma prostate. Kao ozbiljna i potencijalno smrtonosna bolest, koja zahteva doživotno praćenje, uz značajno visok rizik za progresiju i suboptimalan odgovor na primenjenu terapiju, predstavlja veliko socio-ekonomsko opterećenje svake zemlje. Uloga urologa je neophodna u svakom segmentu kako istraživanja, tako i lečenja ove bolesti.

### **1.1.1 Epidemiologija karcinoma mokraćne bešike: incidenca, prevalenca i mortalitet**

U razvijenim zemljama, kao što su Severna Amerika i Evropa, predominantni histološki tip karcinoma mokraćne bešike je urotelijalni karcinom. U celokupnoj svetskoj populaciji, urotelijalni karcinom mokraćne bešike po učestalosti nalazi se na 7-om mestu kod muškaraca, na 17-om kod žena, a zbirno na 9-om mestu (Grafikon 1) (Ferlay J i sar, 2015) . Incidenca je veća u zemljama razvijenog sveta, gde se po učestalosti nalazi na 4-om kod muškaraca i na 7-om mestu kod žena. Kao razlog smrti zbog karcinoma, urotelijalni karcinom mokraćne bešike se nalazi na 8-om mestu kod muškaraca i zbirno na 13-om mestu (Siegel RL i sar, 2017). U Evropi, najveća stopa smrtnosti zbog urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike je medju muškarcima u Turskoj, i to za 50% više u odnosu na najveću procenjenu stopu mortaliteta u Evropi, a tri puta više nego u Severnoj Americi (Siegel RL i sar, 2017). Postoje značajne varijacije u incidenci urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike u svetu. Najveća incidenca je u zemljama Zapadne Evrope i Severne Amerike, a najniža u zemljama Istočne Evrope i Azije. Međutim, tačna procena incidence ne može se precizno odrediti zbog postojanja značajne heterogenosti u načinu saopštavanja u nacionalnim registrima pacijenata i različite metodologije analize ovih podataka među različitim zemljama. Šta više, unutar iste zemlje, stopa incidence i mortaliteta pokazuje značajne varijacije i tumači se razlikom u

izloženosti faktorima rizika, uspehu detekcije, dijagnostičkom praksom i razlikama u načinu lečenja.



Grafikon 1. Starosno standardizovana procena stope incidence i mortaliteta najčešćih karcinoma na 100000 osoba oba pola u celom svetu - GLOBOCAN 2012 (preuzeto sa GLOBOCAN 2012 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> , Feb 2018)

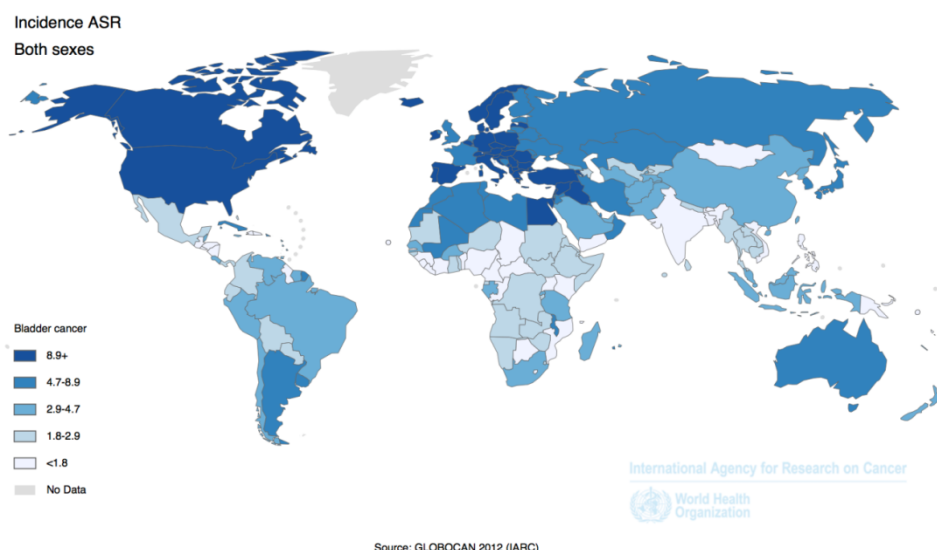
Skorašnja globalna studija pokazala je da stopa incidence i mortaliteta opada u razvijenim zapadnim zemljama, ali raste u nekim zemljama Istočne Evrope i zemljama u razvoju (Ferlay J i sar, 2015) (Grafikon 2 i Grafikon 3). Procenjuje se da će globalno incidenca urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike i dalje ostati značajno visoka, pre svega zbog evidentnog povećanja broja novih slučajeva u zemljama u razvoju (Leal J i sar, 2016). Populaciono predviđanje stope

incidence i mortaliteta urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike u Srbiji prema podacima GLOBOCAN-a iz 2012 godine prikazano je u Tabeli 1 i Tabeli 2.

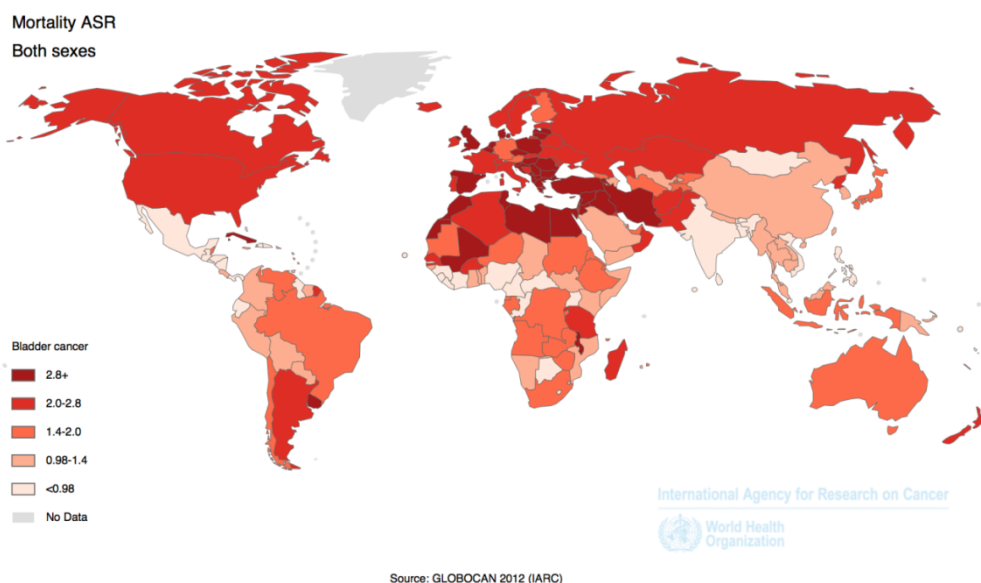
Oko 75% novo dijagnostikovanih slučajeva urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike su mišićno-neinvazivni i odlikuju se visokim stepenom rekurencije uprkos lokalnoj terapiji. Preostalih 25% novodijagnostikovanih slučajeva predstavljaju mišićno-invazivni karcinomi mokraćne bešike. Prevalenca i mortalitet urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike su u najvećoj meri određeni stadijumom bolesti, uspehom lečenja, kao i drugim kompetitivnim uzrocima smrti (Marcos-Gragera R i sar, 2015). Mišićno-neinvazivni karcinomi mokraćne bešike imaju visoku prevalencu obzirom da se odlikuju nižom stopom progresije i dugačkim preživljavanjem, za razliku od mišićno-invazivnih karcinoma mokraćne bešike gde je rizik od smrti zbog progresije značajno visok. Ukupno posmatrano, prevalenca urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike je među najvećim od svih uroloških malignoma (Svatek, R. S. i sar, 2014).

Jednostavan epidemiološki instrument za procenu efikasnosti nacionalnih programa za dijagnozu i lečenje karcinoma, je odnos mortaliteta prema incidenci (*engl. mortality-to-incidence ratio, MIR*). Premda je sirova stopa incidence i mortaliteta veća u razvijenim nego u manje razvijenim zemljama, MIR je veći u manje razvijenim zemljama. Na isti način, pokazano je da kod žena postoji veći MIR kao fenomen ujednačeno prisutan na globalnom nivou (Wang S-C i sar, 2017). Kod muškaraca se urotelijalni karcinom mokraćne bešike tri do četiri puta češće otkriva nego kod žena (Fajkovic H i sar, 2011). Incidenca se povećava sa godinama starosti, a kod aktuelnih pušača urotelijalni karcinom mokraćne bešike se prosečno otkriva u ranijem uzrastu nego kod onih koji nisu nikada pušili (Burger M i sar, 2013). Karakteristično je da preko 90% pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike su stariji od 55 godina. Prosečna starost u momentu dijagnoze kod muškaraca je 69 godina, kod žena je 71 godina, a zbirno za oba pola je 73 godine (Horstmann M i sar, 2008). Ekstremno retko se otkriva kod dece i mladih osoba. Rasne razlike su uočene u Severnoj Americi gde dva puta češće oboljevaju belci, u poredjenju sa Latino i Afro-Američkom populacijom. Premda muškarci imaju veću incidencu, kod žena se češće otkriva uznapredovali stadijum bolesti u momentu dijagnoze, kao i češća pojava recidiva, progresije i mortaliteta

zbog karcinoma posle primenjenog lečenja (Messer JC i sar, 2014). Ovakva diskrepanca u demografskim trendovima objašnjava se postojanjem različitih kontributivnih faktora kao što su - značaj polnih hormona, učestalost izloženosti duvanskom dimu, različita profesionalna ekspozicija karcinogenima, različita metabolička aktivnost enzima, kao i disparitet u obimu primenjenih dijagnostičkih procedura u evaluaciji hematurije (Wolff I i sar, 2015). Pokazano je da žene sa hematurijom imaju značajno duži vremenski period kašnjenja u postavljanju dijagnoze zbog odlaganja upućivanja urologu i ređe imaju urađeno kompletno ispitivanje porekla hematurije u poređenju sa muškarcima (Garg T i sar, 2014).



Grafikon 2. Starosno standardizovana procena stope incidence karcinoma mokraćne bešike na 100000 osoba oba pola u celom svetu - GLOBOCAN 2012 (preuzeto sa GLOBOCAN 2012 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> , Feb 2018)



Grafikon 3. Starosno standardizovana procena stope mortaliteta karcinoma mokraćne bešike na 100000 osoba oba pola u celom svetu - GLOBOCAN 2012 (preuzeto sa GLOBOCAN 2012 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> , Feb 2018)

Tabela 1. Populaciona procena broja novih slučajeva karcinoma mokraćne bešike prema starosnim grupama do 2020 godine u Srbiji - GLOBOCAN 2012 (preuzeto sa GLOBOCAN 2012 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> , Feb 2018)

Godina	broj novih slučajeva UKMB	muškarci	žene	oba pola
2012	svi uzrasti	1371	468	1839
	uzrast < 65	595	179	774
	uzrast ≥ 65	776	289	1065
2020	svi uzrasti	1399	486	1885
	uzrast < 65	561	171	732
	uzrast ≥ 65	838	315	1153
	demografska promena (2020 - 2012)			
	svi uzrasti	28	18	46
	uzrast < 65	-34	-8	-42
	uzrast ≥ 65	62	26	88

UKMB - urotelijalni karcinom mokraćne besike

Tabela 2. Populaciona procena broja umrlih zbog karcinoma mokraćne bešike prema starosnim grupama do 2020 godine u Srbiji - GLOBOCAN 2012 (preuzeto sa GLOBOCAN 2012 (IARC), <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>, 05 Feb 2018)

Godina	broj umrlih zbog UKMB	muškarci	žene	oba pola
2012	svi uzrasti	510	175	685
	uzrast < 65	116	31	147
	uzrast ≥ 65	394	144	538
2020	svi uzrasti	495	176	671
	uzrast < 65	110	30	140
	uzrast ≥ 65	385	146	531
	demografska promena (2020 - 2012)			
	svi uzrasti	-15	1	-14
	uzrast < 65	-6	-1	-7
	uzrast ≥ 65	-9	2	-7

UKMB - urotelijalni karcinom mokraćne bešike

### 1.1.2 Dijagnoza karcinoma mokraćne bešike

Bezbolna makroskopska hematurija je najčešći simptom, obično je intermitentna i postoji kod oko 85% slučajeva (Loo, RK i sar, 2013). Iritativni simptomi donjeg urinarnog trakta su drugi najčešći simptom, i karakteristično su udruženi sa postojanjem *carcinoma in situ* (CIS) ili mišićno - invazivnog karcinoma mokraćne bešike. Podatak o postojanju makroskopske ili mikroskopske hematurije kod osoba sa visokim rizičnim profilom (npr. pušači), zahteva detaljnu evaluaciju urinarnog trakta. Inicijalni dijagnostički postupak obuhvata - fizikalni pregled, kompletne laboratorijske analize (kompletna krvna slika, biohemija, sediment urina, urinokultura), cistoskopiju, citologiju urina, i radiografsko ispitivanje gornjeg urinarnog trakta. Cistoskopija podrazumeva endoskopski pregled mokraćne bešike i cele uretre kojim se verifikuju lokalizacija, veličina, izgled i broj tumorskih promena, promene u okolini tumora i druge abnormalnosti mukoze. Fluorescentna (*engl. blue light*) cistoskopija ima prednost u odnosu na klasičnu



(*engl. white light*), zato što preciznije može da detektuje lezije u ravni mukoze, ali se rutinski i dalje ne primenjuje u svim centrima (Kausch I i sar, 2010). Citološki pregled urina nije alternativa, već dopuna cistoskopiji, i ima veliki značaj u otkrivanju karcinoma visokog gradusa i CIS. Pozitivan nalaz citologije urina, uz istovremeno normalan nalaz cistoskopskog pregleda zahteva detaljan pregled ostalih delova urinarnog trakta (Yafi FA i sar, 2015). Molekularni i genetski markeri trenutno se ispituju u dijagnozi karcinoma mokraćne bešike, ali još uvek niti jedan nije pokazao da efikasno može da zameni cistoskopiju i citologiju urina. Radiografska snimanja su neophodna u svim slučajevima u cilju evaluacije gornjeg urinarnog trakta i kliničke procene stadijuma bolesti. Vrsta radiografskih pretraga koje će biti urađene, u najvećoj meri zavisi od procene invazivnosti tumora u nalazu cistoskopskog pregleda. Kod postojanja invazivnih tumora, osim procene operabilnosti, detaljnim radiografskim ispitivanjem neophodno je isključiti postojanje metastaza. Transuretralna resekcija tumora mokraćne bešike (TURBT) ima presudni značaj u postavljanju definitivne dijagnoze. Patohistološki pregled materijala dobijenog posle TURBT određuje histološki tip tumora, gradus i procenjuje stepen invazije, odnosno patološki stadijum bolesti. Prema svim svetskim vodičima za lečenje tumora mokraćne bešike, TURBT treba ponoviti unutar 4-6 nedelja posle prethodne resekcije ako je urađen inkompletna inicijalni TURBT, ako nije dobijen mišićni sloj inicijalnom resekcijom (osim u slučaju postojanja dobro diferentovanog Ta tumora), ako je dijagnostikovano pT1 stadijum bilo kog gradusa, i kod svih tumora visokog gradusa (Power NE i sar, 2016).

#### 1.1.2.1 Procena stadijuma bolesti

U cilju procene stadijuma bolesti koristi se tumor - nodus - metastaze (TNM) klasifikacija za maligne tumore kreirana od strane Union International Contre le Cancer (UICC) (Edge SB i sar, 2010). Klinička procena stadijuma bolesti obeležava se prefiksom cTNM (*engl. clinical-TNM*), a patohistološka procena stadijuma označava se kao pTNM (*engl. pathological - TNM*) (Tabela 3).

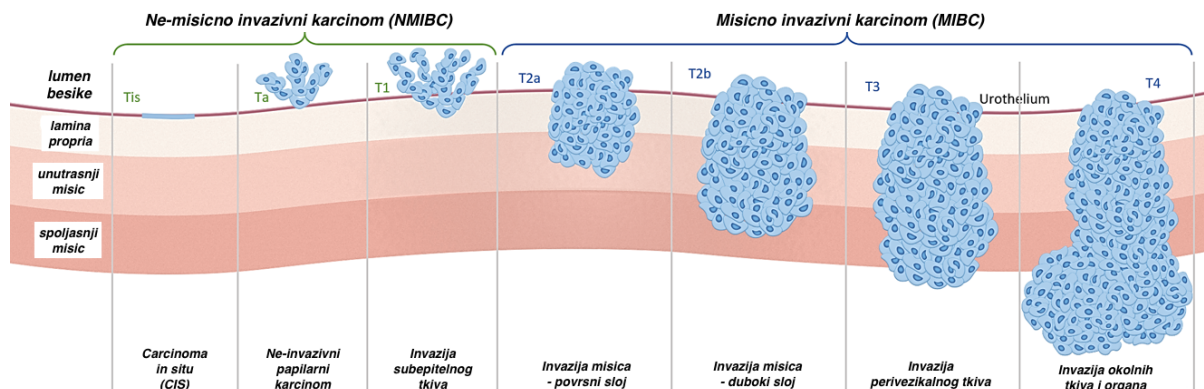
Tabela 3. UICC TNM klasifikacija karcinoma mokraćne bešike (*adaptirano iz Edge and American Joint Committee on Cancer, 2010*)

T - primarni tumor	
TX	primarni tumor nije procenjen
T0	ne postoji tumor
<i>Ne-mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike</i>	
Ta	ne-invazivni papilarni karcinom
Tis	Carcinoma in situ (CIS) : "flat" lezija
T1	invazija subepitelnog vezivnog tkiva
<i>Mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike</i>	
T2	invazija mišića
T2a	invazija mišića - unutrašnja polovina
T2b	invazija mišića - spoljašnja polovina
T3	invazija perivezikalnog masnog tkiva
T3a	mikroskopska invazija
T3b	makroskopska invazija
T4	invazija bilo koje od sledećih struktura : prostata, uterus, vagina, karlični zid, abdominalni zid
T4a	invazija prostate, uterusa ili vagine
T4b	invazija karličnog zida ili abdominalnog zida
N - Limfni nodusi	
NX	regionalni limfni nodusi nisu procenjeni
N0	nema metastaza u regionalnim limfnim nodusima
N1	metastaza u jednom limfnom nodusu u maloj karlici (hipogastrične, obturatorne, spoljašnje ilijačne ili presakralne)
N2	metastaze u više limfnih nodusa u maloj karlici (hipogastrične, obturatorne, spoljašnje ilijačne ili presakralne)
N3	metastaze u limfnim nodusima oko zajedničkih ilijačnih sudova
M - udaljene metastaze	
MX	udaljene metastaze nisu procenjene
M0	nema udaljenih metastaza
M1	postoje udaljene metastaze

Uprkos dokazima o postojanju jasnih razlika u molekularno biološkim istraživanjama i upadljivo različitog kliničkog ponašanja tumora koji se patohistološki karakterišu odsustvom invazije mišićnog sloja mokraćne bešike, i dalje se svi ovi tumori svrstavaju u istu grupu koja se naziva nemišićno-invazivni karcinom mokraćne bešike (*eng. non-muscle-invasive bladder cancer, NMBIC*).

Tumori Ta stadijuma su ograničeni na urotelijum, imaju papilarnu konfiguraciju sa egzofitnim izgledom i ne penetriraju u submukozno vezivno tkivo urotelijuma, niti u mišićni sloj detruzora. Obično su niskog gradusa. Premda je rekurencija uobičajena, posebno ako su multipli, progresija je veoma retka. U oko 3-18% slučajeva Ta karcinomi mokraćne bešike su visokog gradusa (prosečno kod 7%) (Soloway MS, 2007). Tumori T1 stadijuma nastaju u urotelijumu, penetriraju kroz bazalnu membranu i zahvataju submukozno vezivno tkivo, ali ne i mišićni sloj detruzora. Obično su papilarni, a nodularni ili sesilni izgled je suspektan na postojanje dublje invazije. T1 tumori se karakterišu veoma heterogenim ponašanjem u smislu ušestalosti pojave rekurencije i progresije. Carcinoma in situ (CIS) je uvek karcinom visokog gradusa ograničen na urotelijum. Za razliku od papilarnih tumora, CIS ima izgled nepapilarne promene u ravni mukoze, često teško vidljive. Prezentera se kao solitarna lezija, multipla ili difuzna. Može postojati izolovano, ili u kombinaciji sa T1 tumorom. Premda histološki neinvazivan i ograničen na mukozu, CIS je prekursor u razvoju mišićno invazivnog karcinoma. Kod 40-83% pacijenata ako se ne leči, CIS progredira u mišićno-invazivni karcinom (Casey RG i sar, 2015).

Tumori mokraćne bešike koji imaju patohistološku sliku zahvatanja mišićnog sloja sa ili bez prodora izvan zida mokraćne bešike svrstavaju se u grupu mišićno-invazivnih karcinoma mokraćne bešike (*engl. muscle-invasive bladder cancer, MIBC*). U skoro u svim slučajevima kod MIBC postoji urotelijalni karcinom visokog gradusa. Papilarna neoplazma sa niskim malignim potencijalom i urotelijalni karcinom niskog gradusa su ekstremno retki, i stoga patohistološki sistemi za gradiranje koji se koriste kod NMIBC nemaju prognostički značaj kod MIBC. Nemogućnost radiografskih metoda da precizno detektuju mikroskopske promene, poput dubine invazije i/ili postojanje mikrometastaza, ogleda se u činjenici da klinički (cTNM) i patohistološki (pTNM) stadijum bolesti vrlo često se ne podudaraju. Stoga, patohistološki procenjen stadijum bolesti je najznačajniji prognostički faktor kod NMIBC i kod MIBC (Grafikon 4).

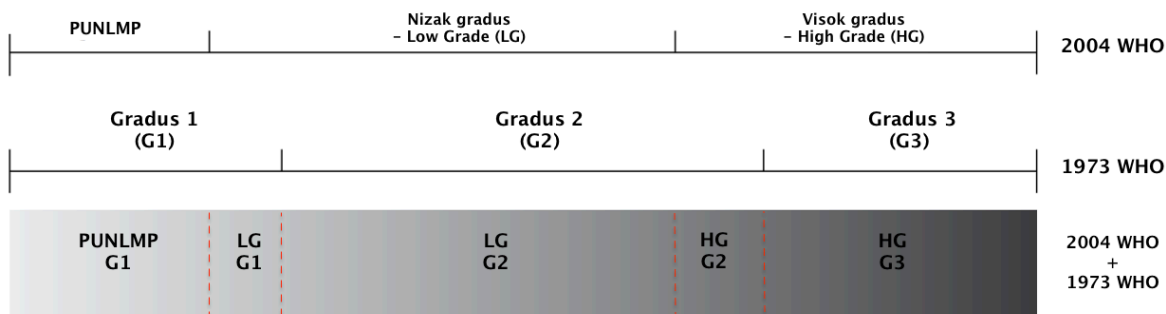


Grafikon 4. Graficki prikaz stadijuma tumorske bolesti (pT) prema stepenu invazivnosti karcinoma mokraćne bešike (*adaptirano iz Knowles MA i sar, 2015*)

### 1.1.2.2 Patohistološka klasifikacija i procena gradusa tumora

Termin karcinom prelaznog epitela (*engl. Transitional cell carcinoma, TCC*) koji se do skoro koristio, danas je zamenjen novim nazivom karcinom urotelijuma (*engl. Urothelial carcinoma, UC*) koji preciznije ukazuje da poreklo ovih tumora može biti na svim mestima gde postoji urotelijum. U preko 90% slučajeva, karcinom urotelijuma lokalizovan je u mokraćnoj bešici (*engl. Urothelial bladder cancer, UBC*), u 8% lokalizacija je u pijelonu ili kaliksima bubrega, a 2% potiče iz uretera ili uretre (Kamat AM i sar, 2016). Karcinom urotelijuma je najčešći histološki tip u zemljama razvijenog sveta. Na drugom mestu prema učestalosti nalazi se skvamocelularni karcinom, sa značajno većom prevalencom u zemljama gde postoje endemska područja infekcije parazitom *Schistosoma haematobium*. Ostali histološki tipovi su retki. Patohistološki gradus urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike ima dokazanu prediktivnu vrednost i predstavlja značajan prognostički faktor u proceni rizika za rekurenciju i progresiju NMIBC. Trenutno se za procenu patohistološkog gradusa urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike koriste klasifikacija Svetske zdravstvene organizacije (*engl. World Health Organization, WHO*) iz 1973 (Mostofi FK i sar, 1973) i revidirana WHO klasifikacija iz 2004 godine (Eble JN i sar, 2004). Prema WHO 2004 klasifikaciji, u lezije u ravni mukoze spadaju urotelijalna hiperplazija, reaktivna urotelijalna atipija, atipija nepoznatog značaja, displazija i CIS. Prema istoj klasifikaciji, u neinvazivne

papilarne urotelijalne karcinome, uvršteni su papilarna urotelijalna neoplazma niskog malignog potencijala (*engl. papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, PUNLMP*) i urotelijalni karcinom niskog (*engl. low grade, LG*) i visokog gradusa (*engl. high grade, HG*). PUNLMP se definiše kao promena koja nema citološke karakteristike malignog tumora, već se sastoji iz normalnih ćelija sa papilarnom konfiguracijom. Premda imaju beznačajan rizik za progresiju, ove lezije nisu u potpunosti benigne obzirom da imaju tendenciju da se ponovo javljaju (Eble JN i sar, 2004). Za razliku od WHO 1973 klasifikacije koja je razlikovala tri patohistološka gradusa, u novoj klasifikaciji postoje samo dva. Kao predmet značajnih kontroverzi medju patolozima, srednji gradus 2 je izbačen (Grafikon 5). Obe klasifikacije imaju potvrđenu prognostičku vrednost, a reproducibilnost je nešto bolja kod WHO 2004 klasifikacije (Pan CC i sar, 2010). U najvećem broju studija objavljenih do sada za NMIBC upotrebljavana je WHO 1973 klasifikacija. Prema preporuci Evropske Asocijacije Urologa, trenutno obe klasifikacije se ravnopravno koriste u cilju procene gradusa i dobijanja bolje substratifikacije tumora mokraćne bešike prema riziku za rekurenciju i progresiju (Babjuk M i sar, 2015).



tamnije gradirano označava da se rizik za progresiju povećava sa povećanjem gradusa; isprekidana linija obeležava razlike izmedju dve klasifikacije; WHO - Svetska zdravstvena organizacija; PUNLMP - papilarna urotelijalna neoplazma niskog stepena maligniteta; LG - nizak gradus; HG - visok gradus

Grafikon 5. Uporedni prikaz WHO patohistološke klasifikacije urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike iz 2004 i 1973 godine

### 1.1.2.3 Molekularna klasifikacija

Simplifikovani sistemi tradicionalne patohistološke analize pokazali su se kao nedovoljni u proceni klinički heterogenog ponašanja tumora mokraćne bešike. Cancer Genome Atlas Project je ispitivanjem 131 slučaja sa MIBC, kompletirao jednu od najsveobuhvatnih molekularnih analiza karcinoma mokraćne bešike (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Tumori su evaluirani sekvenciranjem celokupnog genoma i velikim brojem drugih genetskih ispitivanja. Uočeno je konzistentno postojanje mutacija u mnogim genima, poremećaji u regulaciji nekoliko signalnih puteva, kao i alteracije koje utiču na pojavu epigenetskih promena u oko 89% tumora. Poslednjih godina, nekoliko studija predložilo je novu molekularnu klasifikaciju karcinoma mokraćne bešike koja je bazirana na genetskim ispitivanjima, prevashodno profilisanju ekspresije mRNK u celokupnom genomu (Knowles MA i sar, 2015; Li R i sar, 2016). Molekularni podtipovi otkriveni kod karcinoma mokraćne bešike imali su velike sličnosti sa molekularnom klasifikacijom koje je prethodno već napravljena za karcinom dojke (Damrauer JS i sar, 2014). Prema ovoj klasifikaciji, dva osnovna *intrinsic* podtipa MIBC su luminalni i bazalni, sa specifičnim kliničko-patološkim karakteristikama. Bazalni podtip MIBC je prevalentniji kod žena, histološki je bogatiji skvamocelularnim i sarkomatoidnim ćelijama, inicijalno se detektuje u odmaklijem stadijumu i ima lošiju prognozu. Luminalni podtip MIBC se histološki uglavnom karakteriše mikropapilarnim izgledom i ima bolju prognozu kada se otkrije u ranijem stadijumu bolesti. Uočena je i korelacija podtipova MIBC sa odgovorom na cisplatin baziranu hemioterapiju. Naime, luminalni podtip je udružen sa rezistencijom na cisplatin baziranu hemioterapiju koja se primenjuje kod urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Suprotno tome, kod pacijenata sa bazalnim podtipom uočen je odličan odgovor na neoadjuvantnu cisplatin baziranu hemioterapiju (Choi W i sar, 2014). Dokaz o postojanju imune ćelijske infiltracije kod specifičnih podtipova urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, usmerila je istraživanja u pravcu primene imunoterapije *checkpoint* inhibitorima kod ovih pacijenata. Stoga, molekularna klasifikacija urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike koja je bazirana na genetskom profilu omogućava bolju stratifikaciju

pacijenata prema prognostičkim i prediktivnim faktorima, i selekciju za izbor najbolje terapijske opcije. Trenutno, osim u kliničkim studijama, molekularna klasifikacija nema primenu u svakodnevnoj praksi (Kim J i sar, 2015).

### **1.1.3 Faktori spoljne sredine u nastanku karcinoma mokraćne bešike**

Postoje dobro poznati faktori rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike. Faktor rizika može biti bilo šta što povećava šansu da osoba oboli od karcinoma. Premda faktori rizika često utiču na nastanak karcinoma, najveći broj ovih faktora ne predstavlja direktan uzrok karcinoma. Kod nekih osoba koje istovremeno imaju više faktora rizika nikada se ne razvija karcinom, dok će kod nekih karcinom nastati bez evidentnog postojanja faktora rizika.

Izloženost faktorima spoljne sredine povezano je sa nastankom urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (Burger M i sar, 2013). Karcinogeni koji se izlučuju urinom ili enzimskim sistemima bivaju aktivirani iz prekusornih molekula u urinu mogu da deluju na urotelijum u pravcu karcinogeneze. Ovom "*field cancerization*" hipotezom se objašnjava karakteristično multifokalno pojavljivanje tumora na svim mestima urinarnog trakta gde postoji urotelijum (Jons TD i sar, 2005). Međutim, u najvećem broju slučajeva, pokazano je da multifokalni karcinomi urotelijuma imaju genetski monoklonalno poreklo. Ova "*monoclonality*" hipoteza smatra da karcinom nastaje na jednom mestu, a da intraluminalnim širenjem ili/i intraepitelijalnom migracijom se rasejava u urinarnom traktu (Hafner C i sar, 2002). Premda potpuno različite, obe ove hipoteze imaju značaj u objašnjenju mehanizama urotelijalne karcinogeneze, na sličan način kao u mehanizmu nastanka skvamocelularnog karcinoma usne duplje (Mohan M i sar, 2014). Hemijski karcinogeni predstavljaju značajan faktor rizika u velikom broju slučajeva urotelijalnog karcinoma, od kojih su najznačajniji pušenje i izloženost različitim industrijskim agensima. U epidemiološkim i laboratorijskim istraživanjima identifikovan je veliki broj potencijalno karcinogenih hemijskih jedinjenja. Većinu čine aromatični amini, kao i njihovi prekursori i derivati (2-naftilamin, benzidin i njihovi prekursori i derivati, 4-aminobifenil, 4-nitrobifenil i

2-amino-1-naftol) (Vineis P i Pirastu R, 1997). Međutim, istovremena izloženost multiplim hemijskim jedinjenjima, kao i dugačak latentni period između ekspozicije i nastanka urotelijalnog karcinoma u značajnoj meri otežava preciznu identifikaciju karcinogena.

Pušenje - Pušenje predstavlja najznačajniji poznati faktor rizika koji je odgovoran za povećanje incidence, i povezan je sa nastankom urotelijalnog karcinoma u oko 50% slučajeva kod oba pola. Pušenje se dovodi u vezu sa smrtnim ishodom zbog karcinoma mokraćne bešike kod muškaraca u 31%, i kod žena u 14% slučajeva širom sveta (Cumberbatch MG i sar, 2016).

Identifikovano je preko 60 karcinogena u duvanskom dimu, a tačan broj onih koji su povezani sa nastankom urotelijalnog karcinoma nije do kraja poznat. Najznačajniji karcinogeni u duvankom dimu su 4-aminobifenil, policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), N-nitroso jedinjenja i nezasićeni aldehidi (Hecht SS, 2006). Epidemiološke studije su jasno pokazale da kod pušača postoji značajno veći rizik za nastanak karcinoma urotelijuma, i to podjednako kod muškaraca i kod žena (50% i 52%) (Freedman ND i sar, 2011). Kod osoba koje su prekinule pušenje, ovaj rizik se smanjuje za 30% posle 1-4 godine, i više od 60% posle 25 godina od prestanka pušenja. Međutim, ni posle 25 godina rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike ne dostiže nivo rizika kao kod osoba koje nikada nisu pušile (Freedman ND i sar, 2016). Dokazano je prekid pušenja značajno smanjuje rizik za pojavu rekurencije nemišićno-invazivnih karcinoma mokraćne bešike (Chen CH i sar, 2007). Žene nepušači koje su u detinjstvu živele sa dva ili više pušača, imaju tri puta veći rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike u odnosu na žene koje nisu bile izložene duvankom dimu u detinjstvu. U odraslom dobu, žene nepušači koje žive sa osobom koja puši duže od 10 godina, imaju dva puta veći rizik da dobiju karcinom mokraćne bešike (Agudo A i sar, 2012). Kod muškaraca nije dokazana ova vrsta povezanosti niti u detinjstvu, niti u odraslom dobu. Američka Agencija za hranu i lekove je 2009 godine saopštila da i u elektronskim cigaretama postoji manja količina karcinogena poput dietilen glikola i nitrozoamina (Palazzolo DL, 2013). U nastanku mnogih bolesti, pušenje je vodeći faktor rizika na koji se merama prevencije može uticati. Procenjeno je da oko



polovina osoba pušača će umreti zbog bolesti povezanih sa pušenjem (Cogliano VJ i sar, 2011).

Okupacioni karcinogeni - Udruženost ekspozicije profesionalnim karcinogenima i urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike uočena je još pre jednog veka. Smatra se da je ovaj faktor rizika odgovoran u nastanku 10 do 20% slučajeva tumora mokraćne bešike (Purdue MP i sar, 2015). Osobe koje su profesionalno izložene hemijskim karcinogenima imaju do 200 puta veći rizik da obole od urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, čak i posle 30 godina posle prestanka izloženosti okupacionim karcinogenima (Kiriluk KJ i sar, 2012). Profesije sa značajnim okupacionim rizikom su metalna industrija, farbari, prerada gume i kože, tekstilna industrija, rudari, građevinski radnici, hemijska industrija boja, lakova, plastike itd. Postoji značajna povezanost između jedinjenja poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika (*engl.* polycyclic aromatic hydrocarbons, *PAH*) koji su sastavni delovi lakova i boja, i karcinoma mokraćne bešike (Vineis P i Pirastu R, 1997). Hemijska jedinjenja koja su ulazila u sastav farbi za kosu, povećavala su rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike pet puta kod osoba koje su profesionalno bile izložene u periodu dužem od 10 godina, kao što su frizeri (Czene K i sar, 2003). Povećan rizik nije dokazan kod osoba koje su za ličnu upotrebu sporadično koristile ove farbe za kosu, a promena hemijske formulacije farbi za kosu poslednjih decenija u značajnoj meri je smanjila ukupan karcinogeni rizik koji je prethodno postojao (Purdue MP i sar, 2015; Czene K i sar, 2003).

Jatrogeni faktori rizika - Ciklofosfamid je alkalizirajući lek najčešće korišćen u hemioterapiji karcinoma, i kao imunosupresiv kod autoimunih bolesti. Kod pacijenata koji su primali ciklofosfamid postoji devet puta veći rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike sa latentcom koja je kraća od deset godina (Travis LB i sar, 1995). Akrolein je urinarni metabolit ciklofosfamida koji je odgovoran za nastanak hemoragijskog cistitisa i karcinoma mokraćne bešike. Uroprotektant *Mesna* inaktivira urinarni akrolein i značajno smanjuje rizik kada se koristi istovremeno sa ciklofosfamidom (Tanaka T i sar, 2011). Fenacetin je analgetik za koji je dokazano da dugotrajnom upotrebom povećava rizik za nastanak karcinoma gornjeg urotelijuma, što je uslovalo povlačenje ovog analgetika iz upotrebe 1980-ih godina (Fortuny J i sar, 2007). Nema dokaza da ostali nesteroidni antiinflamatorni

lekovi povećavaju rizik u nastanku karcinoma urotelijuma (Genkinger JM i sar, 2007; Fortuny J i sar, 2007). Zračenje male karlice nije dokazano da povećava rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike (Shah SK i sar, 2006). Aristoholična kiselina je sastavni deo biljnih preparata tradicionalne kineske medicine, i postoje jasni dokazi da povećava incidencu karcinoma urotelijuma (Grosse Y i sar, 2013; Lai MN i sar, 2010).

Zagadjenje životne sredine - Hlorinacija vode za piće kao faktor rizika u nastanku urotelijalnog karcinoma je poslednjih decenija izazvala veliku pažnju istraživača, ali sa kontroverznim rezultatima u proceni značaja. Trihalometani su jedinjenja koja se formiraju kao nusprodukti korišćenja hlora za dezinfekciju vode za piće, i u većim koncentracijama mogu biti toksični (Tsuji JS i sar, 2014). U većini zemalja trenutno postoji stroga kontrola dozvoljenih količina hlora u vodi za piće. Arsen je metaloid za koji postoje jasni dokazi da povećava rizik u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (Villanueva CM i sar, 2003). Mere preduzete u cilju smanjenja koncentracije arsena u vodi za piće, značajno su uticale na smanjenje incidence karcinoma mokraćne bešike u regijama sveta gde je ovo bio problem (Steinmaus CM i sar, 2013). Prirodni izvor arsena su vulkanska zemljišta odakle dospeva u vodu za piće. Zagadjenje životne sredine je češći razlog kontaminacije vode, a arsen se nalazi u pesticidima, rudarstvu, metalurgiji, drvnjoj industriji, farmaceutskoj industriji, itd.

Ostali faktori rizika - Očekivalo bi se da povećan unos tečnosti na prirodan način vrši diluciju karcinogena izlučenih u urinu i redukuje vreme ekspozicije urotelijuma štetnim uticajima. Međutim, Ros i sar. su saopštili u svom istraživanju na 250.000 ispitanika praćenih u toku devet godina da ukupan dnevni unos tečnosti ne utiče značajno na rizik za pojavu urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (Ros MM i sar, 2011). Gojaznost, upotreba veštačkih zasladjivača, konzumiranje alkohola, kafa i čaj nisu dokazani kao faktori rizika u nastanku UKMB (Pelucchi C i La Vecchia C, 2009; Burger M i sar, 2013).

Bolesti ili stanja kao predisponirajući faktori u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike - Hronična urinarna retencija sa dilatacijom gornjeg urinarnog trakta omogućava duži kontakt karcinogena u urinu sa urotelijumom i predstavlja faktor rizika u nastanku UKMB (Silverman DT i sar, 2008; Burger M i

sar, 2013). U zemljama Afrike i zapadne Azije, hronična urinarna infekcija izazvana parazitom *Schistosoma hematobium* je povezana sa većom učestalošću pojave karcinoma mokraćne bešike. U endemskim područjima ova parazitarna infekcija je odgovorna za nastanak oko polovine slučajeva karcinoma mokraćne bešike, dok u ostalim regijama sveta učestalost je manja od 3% (Zaghloul MS, 2012). Karakteristično je da karcinom mokraćne bešike udružen sa shistozomijazom je skvamocelularni histološki tip, za razliku od urotelijalnog histološkog tipa koji je udružen sa pušenjem kao najznačajnijim faktorom rizika.

#### **1.1.4 Genetski faktori u nastanku karcinoma mokraćne bešike**

Karcinogeneza unutar epitelijuma je rezultat kompleksnih interakcija između onkogenih, tumor supresornih gena, pojačanja i preterane ekspresije normalnih gena koji kodiraju faktore rasta ili njihove receptore. Ove genetske abnormalnosti bilo same ili u sadejstvu sa spoljnim faktorima, mogu direktno da modifikuju rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike ili da utiču na prirodni tok i prognozu bolesti. Na indirektan način, genetski faktori mogu preko mehanizama aktivacije karcinogenih prekursora ili poremećaja detoksifikacije karcinogenih da utiču na rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike.

Individualne razlike u predispoziciji za nastanak karcinoma donekle se mogu objasniti genetskim razlikama u metaboličkoj aktivaciji i detoksikaciji karcinogenih. Dinamički ekvilibrijum između karcinogen-aktivirajućih i detoksicirajućih enzima je presudan u određivanju sudbine ćelije koja je izložena štetnim uticajima. Polimorfne varijante gena za enzime koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika mogu biti odgovorne za poremećaj ovog dinamičkog ekvilibrijuma (Panieri E i Santoro MM, 2016). Postoji nekoliko genskih polimorfizama koji su verovatno povezani sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike, a posebno sa predispozicijom za nastanak u sadejstvu sa faktorima spoljne sredine (Leibovici D i sar, 2005; Erol B i sar, 2015). Mnogi mehanizmi, poput metabolizma karcinogenih, DNK reparacije, *checkpoint* kontrole ćelijskog ciklusa, apoptoze i drugih međusobno povezanih procesa predstavljaju složenu mrežu

koja reguliše odgovor urotelijuma na štetne uticaje. U reakcijama bioaktivacije i detoksikacije potencijalnih citotoksičnih i kancerogenih jedinjenja učestvuje više enzimskih sistema. Ovi enzimski sistemi se mogu podeliti na enzimske sisteme Faze I, u okviru kojih se odvijaju reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize, i enzimske sisteme Faze II koji katališu reakcije konjugacije. Centralnu ulogu u Fazi I metabolizma ksenobiotika ima sistem superfamilije citohroma *P450* u jetri. *CYP1A1* je dobro poznat po svom delovanju u metaboličkoj aktivaciji prokarcinogena iz duvanskog dima kao što su policiklični aromatični ugljovodnici i aromatični amini. Ovaj enzim ima visoku učestalost genskog polimorfizma, sa preko 11 alela koji utiču na promenu aktivnosti. Međutim, najveći broj studija nije uspeo da dokaže značaj polimorfizma ovog enzima u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (Lu Y i sar, 2014). Glavne enzimske komponente Faze II detoksikacije ksenobiotika su glutacion S-transferaze (*GST*), glukuronil-transferaza, sulfotransferaza i acetiltransferaza. Većina ovih enzima je polimorfna.

### **1.1.5 Oksidativni stres u nastanku karcinoma mokraćne bešike**

U toku procesa biotransformacije, u kojima se aktiviraju i detoksikuju uroepitelni kancerogeni, moguć je i nastanak reaktivnih slobodnih radikala. Slobodni radikal je atom ili molekul sa jednim nesparenim elektronom. Najčešće se govori o kiseoničnim slobodnim radikalima (KSR): superoksid anjon, vodonik peroksid i hidrosil radikal. Dugotrajna akumulacija KSR može dovesti do oksidativnog oštećenja svih važnih bioloških makromolekula, poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Pored toga, pretpostavlja se da povećana produkcija slobodnih radikala utiče na regulaciju signalnih puteva uključenih u proliferaciju, rast, preživljavanje i apoptozu. Veliki broj studija je pokazao da oksidativni stres, kao stanje u kome je ravnoteža između prooksidanasa i antioksidanasa pomeren na stranu prooksidanasa, može imati značajnu ulogu u kancerogenezi (Reuter S i sar, 2010; Schumacker PT, 2015; Sullivan LB i Chandel NS, 2014; Bazhin AV i sar, 2016; Liou G-Y i Storz P, 2010). Antioksidativni enzimi, superoksid dismutaza (*SOD*), glutacion peroksidaza (*GPX*) i katalaza predstavljaju primarni sistem

odbrane od slobodnih radikala. Kod ovih enzima opisan je genetski polimorfizam koji za posledicu ima izmenjenu ili odsutnu enzimsku aktivnost, a samim tim i mogućnost neutralizacije slobodnih kiseoničnih radikala (Yuzhalin AE i Kutikhin AG, 2012).

#### 1.1.5.1 Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (*GPX*) je seleno-zavisna glutaciona peroksidaza koja učestvuje u metabolizmu vodonik peroksida i fosfolipidnih hidroperoksida (Slika 1). Pokazano je da vodonik peroksid i fosfolipidni hidroperoksid mogu da direktno aktiviraju receptor faktora rasta (*EGFR*) (Prasad S i sar, 2017).

Do sada je kod sisara opisano osam *GPX* izoenzima. Među njima jedino su *GPX1* i *GPX4* pronađeni u mitohondrijama, ali postoje i u drugim organelama unutar ćelije. *GPX1* je glavni enzim koji je odgovoran za uklanjanje solubilnog vodonik peroksida, i ubikvitarno je prisutan u citosolu i u mitohondrijama svih ćelija. *GPX1* ima ulogu tumor supresornog gena i ovu ulogu ostvaruje preko nekoliko mehanizama. Povećana ekspresija *GPX1* regulacijom nivoa peroksida i smanjenjem intracelularne količine prooksidanasa, redukuje mitohondrijalni potencijal smanjujući produkciju *ATP-a* čime dovodi do atenuacije ćelijske proliferacije (Chen Y i sar, 2016). Na taj način povećana ekspresija *GPX1* ispoljava ključnu anti-tumorsku ulogu u karcinogenezi. Pokazano je da povećana ekspresija *GPX1* smanjuje oštećenje DNK *in vitro*, dok eksperimentalno utišavanje gena za *GPX1* povećava rizik za nastanak određenih tipova karcinoma (Sies H, 2017).

Veliki broj studija je do sada ispitivao vezu *GPX1* sa rizikom za nastanak karcinoma. Ulogom koju ima u regulaciji oksidativnih procesa u ćeliji, za očekivati je da *GPX1* može da limitira nastanak oksidativnim stresom indukovane mutageneze i inflamatornih procesa uključenih u nastanku karcinoma. Smanjena ekspresija ili aktivnost *GPX1* u ranom stadijumu karcinogeneze može da doprinese inicijaciji karcinoma, a u kasnijim stadijumima deficit *GPX1* promotivno deluje na proliferativne procese (Galadari S i sar, 2017). Suprotno tome, povećana ekspresija ili aktivnost *GPX1* osim što sprečava nastanak oksidativnih oštećenja i inflamacije, isto tako može da blokira mehanizam apoptoze i omogući preživljavanje

karcinomski transformisane ćelije (Shijun Li i sar, 2000). Zato, *GPX1* moduliranjem intracelularnog nivoa prooksidanasa ima veoma kompleksnu ulogu u nastanku i progresiji karcinoma. U eksperimentalnim istraživanjima je pokazana ova dvostuka uloga *GPX1* - odnosno, povezanost *GPX1* i u pro i u antikancerskim mehanizmima (Reczek CR i Chandel NS, 2017). Na osnovu svih ovih podataka, zaključeno je da ukupan redoks potencijal ćelije određuje da li će povećana ekspresija *GPX1* imati promotivnu ili inhibitornu ulogu u nastanku i progresiji karcinoma.

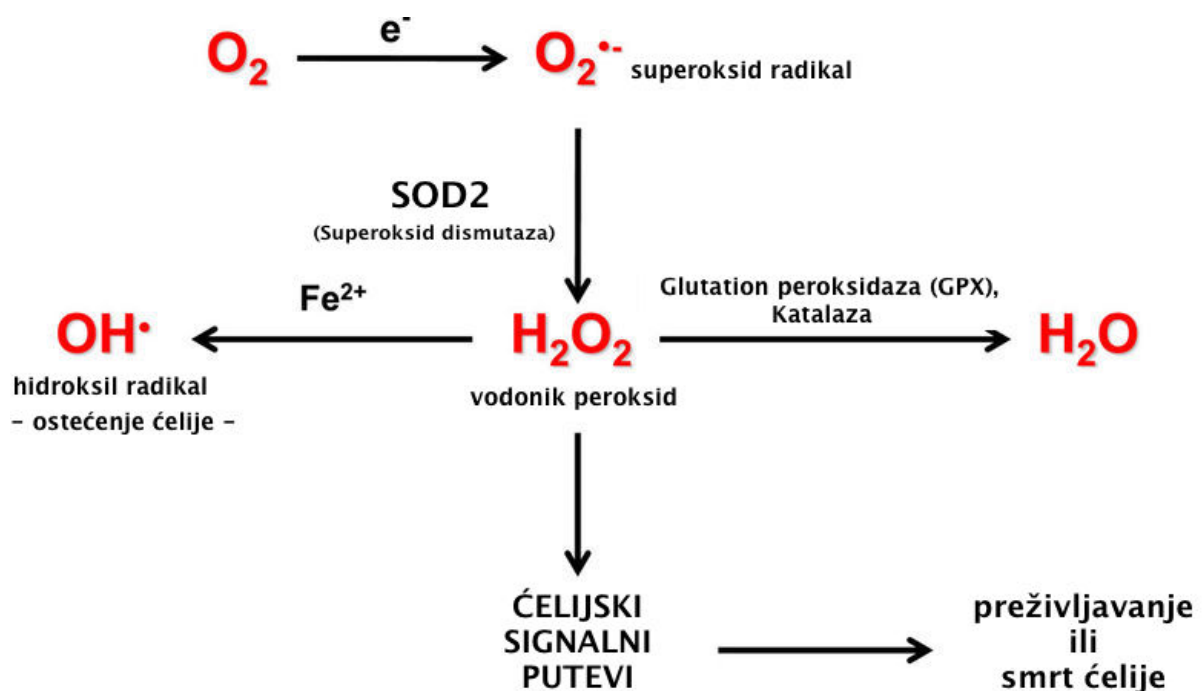
#### 1.1.5.2 Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (*SOD*) je metalo-enzim koji postoji u tri izoformna oblika u zavisnosti za koji se kofaktor vezuje. *SOD1* - vezuje bakar i cink (*Cu/ZnSOD1*) i predominantno se nalazi u citoplazmi ćelija. *SOD2* - vezuje mangan (*MnSOD2*), lokalizovana je u mitohondrijama, ima antioksidativnu ulogu i predstavlja glavni enzim u familiji *SOD*. Oblik *SOD2* koji je vezan za gvoždje (*FeSOD2*) ima takođe peroksidaznu aktivnost, ali za razliku od *MnSOD* koja ima antioksidativnu ulogu, *FeSOD2* je prooksidans koji koristi  $H_2O_2$  i pojačava oksidativni stres u ćeliji. *SOD3* - vezuje bakar i cink (*Cu/ZnSOD3*) i nalazi se ekstracelularno.

Najznačajniji od tri izoformna oblika *SOD*, je *MnSOD* ili *SOD2*. *MnSOD* je jedina *SOD* koja je neophodna za život u aerobnim uslovima (Case AJ, 2017) i glavni je antioksidant u mitohondrijama. Genetski je kodiran nuklearnim *SOD2* genom odakle se transportuje do mitohondrija gde ostvaruje svoju antioksidativnu aktivnost. Osim antioksidativne uloge, *SOD2* može da funkcioniše i kao signalni regulator u procesu protektivne adaptacije na stres preko anti-apoptotičnih signalnih puteva (Sullivan LB i Chandel NS, 2014). Takođe, otkriveno je da *SOD2* ima uticaj na aktivnost transkripcionih faktora kao što su nuklearni faktor -  $\kappa B$  (*NF- $\kappa B$* ), hipoksijom indukovani faktor - 1 (*HIF-1*), aktivator protein - 1 (*AP-1*), i *p53* koji učestvuju u procesima transformacije, proliferacije i angiogeneze. *SOD2* ima ključnu ulogu u regulaciji procesa ćelijske proliferacije (Kinnula VL i Crapo JD, 2004). Stoga, nije čudo da *SOD2* ekspresija

ima esencijalnu ulogu u preživljavanju ćelije, što je dokazano kod miševa koji su umrli posle 5 dana od rođenja posle delecije *SOD2* gena, sa teškim oštećenjima tkiva i organa usled mitohondrijalne disfunkcije (Lebovitz RM i sar, 1996).

*SOD2* ima kompleksnu ulogu u neutralizaciji kiseoničnih slobodnih radikala. Ovaj antioksidativni enzim deluje u prvoj liniji odbrane od slobodnih radikala katalizujući konverziju superoksida u vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) koji se dalje neutralizuje u netoksični molekul vode ( $H_2O$ ) i kiseonik preko enzima katalaze i glutation peroksidaze (*GPX*) (Slika 1). Sa druge strane, vodonik peroksid može takodje da bude konvertovan u Fentonovoj reakciji u izuzetno toksični hidroksi radikal što dovodi do sekundarnog oštećenja ćelije. Takodje, povećano stvaranje  $H_2O_2$  može da prekine *TNF-alfa* (engl. tumor necrosis factor - *TNF*) posredovanu apoptozu i omogući preživljavanje oštećene ćelije (Robbins D i Zhao Y, 2014). Stoga, *SOD2* ima dvostruko delovanje u oksidativnom metaboličkom putu.



Slika 1. Uloga *SOD* i *GPX* u neutralizaciji slobodnih radikala

Uloga *SOD2* kod karcinoma je i dalje kontroverzna. Veliki broj studija pokazao je kontradiktorne rezultate u vezi sa postojanjem promena aktivnosti i ekspresije *SOD2* kod pacijenata sa karcinomom. Pretpostavka je da, u

karcinomskoj ćeliji *SOD2* ima dvojaku ulogu u zavisnosti od koncentracije i specifičnog konteksta funkcije ovog enzima. Naime, smatra se da u ranom stadijumu bolesti, karcinomske ćelije imaju smanjenu *SOD2* aktivnost, a da se kasnije u toku progresije karcinoma aktivnost povećava. Povećana ekspresija *SOD2* aktivira adaptivne mehanizme prvenstveno usmerene u pravcu smanjenja ekcesivnog oksidativnog stresa, čime se gubi stimulus za apoptozu što omogućava preživljavanje ćelija karcinoma. Na taj način, *SOD2* može imati ulogu i tumor supresora i tumor promotera (Kim YS i sar, 2017).

Otkriće velikog broja gena koji kodiraju značajne enzime uključene u procese biotransformacije i ćelijske odbrane, dovelo je pretpostavke da polimorfne varijante ovih gena mogu da utiču na razlike u predispoziciji za nastanak bolesti među jedinkama iste vrste pod uticajem sredinskih faktora i oksidativnog stresa. Kod karcinoma, mehanizmi uključeni u održavanje redoks homeostaze su integralni deo ćelijskih signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji ćelijske transformacije, preživljavanja, proliferacije, invazije, angiogeneze i nastanka metastaza (Egea J i sar, 2017).

#### 1.1.5.3 Polimorfizam gena za *GPX1* i *SOD2*

Smatra se da funkcionalne varijacije gena za *GPX1*, koje za posledicu imaju sniženu aktivnost ovog enzima, mogu da moduliraju rizik za nastanak karcinoma (Yuzhalin AE i Kutikhin AG, 2012). Do sada je najviše izučavan polimorfizam *GPX1* (*rs1050450*) gena, gde dolazi do supstitucije nukleotida (*Citozin*→*Timin*), koja rezultuje zamenom aminokiseline prolin (*Pro*) u leucin (*Leu*) (Lubos E i sar, 2011). U literaturi se ovaj polimorfizam obeležava kao *Pro200Leu* (*GPX1* gen) ili *Pro198Leu* (*GPX1* enzim). Ovaj tip polimorfizma pripada grupi SNP-a (*engl. single nucleotide polymorphism, SNP*) i pokazuje interesantan gen-sredinski efekat, jer se njegove alelske forme razlikuju u ekspresiji u prisustvu selena. Prisustvo varijantog *GPX1-Leu* alela udruženo je sa smanjenom *GPX1* enzimskom aktivnošću, smanjenjem serumskog nivoa selena i smanjenjem uticaja nivoa serumskog selena na *GPX1* enzimsku aktivnost (Jablonska E i sar, 2009). Shodno tome, otkriće ovog funkcionalnog polimorfizma *GPX1* gena omogućilo je sprovođenje velikog broja



asocijativnih studija u cilju ispitivanja povezanosti sa rizikom za nastanak karcinoma, ali dobijeni su kontradiktorni rezultati. Nekoliko istraživačkih grupa se bavilo proučavanjem *GPX1* polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike sa takođe, kontradiktornim rezultatima (Chen J i sar, 2011; Wang C i sar, 2017; Men T i sar, 2014). Međutim, rezultati poslednje meta-analize iz 2014. godine pokazali su da *GPX1 Pro198Leu* polimorfizam značajno doprinosi povećanom riziku za nastanak karcinoma mokraćne bešike u poredjenju sa *GPX1 Pro/Pro* genotipom (Cao M i sar, 2014). *In vitro*, animalni modeli i humana genetika su takođe pokazali da smanjen nivo *GPX1* korelira sa povećanim rizikom za nastanak različitih vrsta karcinoma (Rayman MP, 2009). Uprkos činjenici da je *GPX1* uključen u neutralizaciji slobodnih radikala koji nastaju prilikom hemioterapije bolesnika sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike, u literaturi nema podataka o uticaju genskog polimorfizma ovog enzima kod ovih pacijenata.

Veliku pažnju istraživača privlači polimorfizam *SOD2* enzima, jer je pokazano da polimorfne genske varijante *SOD2* mogu da povećaju rizik u nastanku pojedinih tipova karcinoma (Yuzhalin AE i Kutikhin AG, 2012). Do sada, najčešće je ispitivan polimorfizam *SOD2 (rs4880)* gena sa supstitucijom nukleotida (*Timin*→*Citozin*), koja uzrokuje zamenu aminokiseline valina (*Val*) alaninom (*Ala*). U literaturi se obeležava kao *Val16Ala (SOD2 gen)* ili *Ala9Val (SOD2 enzim)*. Otkriveno je da prisustvo varijantog *SOD2-Val* alela redukuje efikasnost transporta *SOD2* u mitohondrije za 30-40%, i stoga osobe sa *SOD2 Ala16Ala* genotipom imaju veću *SOD2* enzimsku aktivnost u poređenju sa onima koji imaju *SOD2 Val16Ala* ili *SOD2 Val16Val* genotip (Sutton A i sar, 2005). Usled toga, funkcionalna posledica ove alteracije može biti nastanak poremećaja u intracelularnom oksidativnom balansu što može da poveća rizik u nastanku karcinoma. No, trenutno i dalje zbog postojanja kontradiktornih literaturnih rezultata, povezanost genetskog polimorfizma *SOD2* sa rizikom za nastanak karcinoma još uvek nije do kraja razjašnjena. Rezultati meta-analize iz 2015. pokazali su da *SOD2 Ala-9Val* polimorfizam ne utiče na povećan rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike (Kang SW, 2015). Nosioi jednog ili dva *SOD2-Ala* alela često se dovode u vezu sa povećanim rizikom za nastanak hepatocelularnog karcinoma, karcinoma želuca,

karcinoma prostate, i lošije prognoze kod karcinoma dojke (Yi JF i sar, 2010; Hempel N i sar, 2011; Li N i sar, 2014; Nahon P i sar, 2009; Wang S i sar, 2009). Kod pacijenata sa karcinomom dojke koji su primali adjuvantnu hemioterapiju, *SOD2-Ala* alel bio je udružen sa manjom učestalošću pojave neželjenih efekata hemioterapije, ali sa kraćim preživljavanjem u poredjenju sa *SOD2 Val/Val* genotipom (Yao S i sar, 2010). Kod pacijenata sa metastatskim karcinomom želuca koji su primali hemioterapiju, nije pokazano da genetski polimorfizam *SOD2* ima prognostički značaj u proceni nastanka progresije bolesti niti u proceni ukupnog preživljavanja (Geng R i sar, 2014). Uprkos činjenici da je *SOD2* uključena u neutralizaciji slobodnih radikala koji nastaju prilikom hemioterapije bolesnika sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike, u literaturi nema podataka o uticaju polimorfizma ovog enzima kod ovih pacijenata.

#### **1.1.6 Lečenje karcinoma mokraćne bešike - nemetastatska bolest**

U momentu dijagnoze, 70% slučajeva urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike ima NMIBC. Oko 15-20% ovih slučajeva progrediraće u MIBC. Preostalih 30% pacijenta u vreme inicijalne dijagnoze ima MIBC, lokalno uznapredovalu ili metastatsku bolest. Oko 4% pacijenata u vreme inicijalne dijagnoze ima klinički evidentnu metastatsku bolest urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Posle cistektomije, oko 50% pacijenata sa MIBC imaće progresiju bolesti pojavom lokalnog recidiva u 10-30% slučajeva, ili češće pojavom udaljenih metastaza (Kamat AM i sar, 2016).

Premda je termin nemišićno-invazivni zamenio tradicionalno upotrebljivan naziv superficijelni karcinom mokraćne bešike, niti jedan od ova termina nije optimalan u opisu nastanka i izuzetno heterogenog ponašanja Ta, T1 i CIS tumora svrstanih u istu grupu. Trenutno, jedino odrednica izbora terapije koja je zajednička, opravdava upotrebu naziva NMIBC za ovu grupu tumora.

Endoskopska transuretralna resekcija tumora mokraćne bešike (TURBT) je istovremeno dijagnostička i terapijska procedura. Dobijanje precizne patohistološke dijagnoze sa procenom stadijuma i gradusa tumora, kao i

kompletno uklanjanje svih vidljivih promena u mokraćnoj bešici su prvi korak u planiranju lečenja NMIBC. Kod oko 50% pacijenata posle kompletne TURP, unutar 12 meseci dolazi do pojave rekurencije, a progresija bolesti u MIBC nastaje u 5-25% slučajeva (Kamat AM i sar, 2016). EORTC kriterijumi (Sylvester RJ i sar, 2006) za stratifikaciju pacijenata u prognostičke grupe prema procenjenom riziku za pojavu rekurencije ili progresije bolesti prikazani su Tabeli broj 4. Posle TURP, indikovana je terapija intravezikalnom primenom BCG (*eng. Bacillus Calmette - Guerin, BCG*) kod svih pacijenata sa visokim rizikom i kod nekih sa srednjim rizikom. BCG je još uvek najefikasnija terapija koja smanjuje i rekurenciju i progresiju NMIBC, a terapijski efekat se postiže i kod papilarnih i CIS tumora (Ehdaie B i sar, 2013). Premda je cistektomija rezervisana za lečenje MIBC, indikacija za ovu hiruršku intervenciju postoji i kod pacijenata sa NMIBC. To su slučajevi kada veliku tumorsku masu nije moguće endoskopskom resekcijom kompletno ukloniti, ako postoji zahvaćenost prostatične uretre tumorom i/ili uprkos primenjenoj intravezikalnoj BCG terapiji perzistira CIS ili T1 tumor visokog gradusa (Martin-Doyle W i sar, 2015). CIS koji se ne leči ili je refrakteran na BCG terapiju, progredira u MIBC kod oko 80% slučajeva. T1 tumori visokog gradusa koji se ponavljaju uprkos BCG terapiji imaju 50% šansu da progrediraju u MIBC. Cistektomija uradjena pre progresije bolesti u MIBC ima stopu 5-godišnjeg preživljavanja 90%, a nastanak progresije u MIBC smanjuje 5-godišnje preživljavanje na 30-50% (van den Bosch S i sar, 2011). Stoga, kod svih pacijenata sa evidentnim ranim neuspehom BCG terapije savetuje se cistektomija. Kod pacijenata sa posebno visokim rizikom za progresiju bolesti, što je slučaj istovremenog postojanja T1 tumora visokog gradusa sa difuznim CIS, prema preporukama Evropske asocijacije urologa, može se savetovati neodložna cistektomija (Babjuk M i sar, 2015).

Tabela 4. EORTC kriterijumi za procenu rizika za rekurenciju i progresiju NMIBC (adaptirano iz Sylvester RJ et al, 2006)

prognostička grupa rizika	kriterijumi
<b>nizak rizik</b>	<u>ako su prisutni svi navedeni faktori :</u> primarni, solitarni, pTa niskog gradusa (G1), <3cm, odsutan je Carcinoma in situ (CIS)
<b>srednji rizik</b>	pacijenti koji ne spadaju u grupu niskog ili visokog rizika
<b>visok rizik</b>	<u>ako postoji bilo koji od sledećih faktora :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pT1</li> <li>• Carcinoma in situ (CIS)</li> <li>• visok gradus (G3)</li> <li>• pTa niskog gradusa (G1 ili G2) : &gt;3cm, multifokalan ili rekurentan</li> </ul>

Optimalno lečenje mišićno-invazivnog urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike ima za cilj da spreči nastanak progresije bolesti, odnosno pojave lokalnog recidiva ili/i udaljenih metastaza, kao i da produži preživljavanje ovih pacijenata. Izbor modaliteta lečenja i prognoza MIBC određeni su stadijumom i gradusom tumora. Radikalna cistektomija sa limfadenektomijom i derivacijom urina smatra se zlatnim standardom u lečenju MIBC. Kod muškaraca uklanja se cela mokraćna bešika, prostata, semene vezikule, proksimalni deo ductus deferensa i proksimalni deo uretre, a kod žena se osim cele mokraćne bešike uklanja i uterus, oba ovarijuma, jajovodi, uretra i deo vagine.

Radikalna cistektomija postiže odličnu lokalnu kontrolu bolesti. Uprkos unapređenju hirurške tehnike i smanjenju perioperativnih komplikacija, poređenje rezultata cistektomije pre i posle 1985 godine pokazalo je samo mali pomak u preživljavanju ovih pacijenata. Prema stadijumu tumorske bolesti, savremene serije u poređenju sa istorijskim, pokazale su da preživljavanje posle 5 godina iznosi 67% prema 60% za pT2, 35% prema 33% za pT3 i 27% prema 21% za pT4 tumore (Stein JP i sar, 2001). Premda hirurško lečenje ima kurativni cilj, značajan broj pacijenata će imati progresiju bolesti posle radikale cistektomije pojavom lokalnog recidiva i/ili udaljenih metastaza. Zbog toga, primena hemioterapije perioperativno ima klinički smisao sa ciljem smanjenja rizika za nastanak

progresije bolesti u svim kliničkim stadijumima bolesti, pa čak i kod onih kod kojih postoji najbolji prognostički profil (pT0-pT2) i pN0 (Mohamed NE i sar, 2012).

Neoadjuvantna hemioterapija podrazumeva primenu sistemske hemioterapije u periodu neposredno pre hirurgije. Racionala za ovaj terapijski pristup zasniva se na činjenici da će u oko 50% slučajeva unutar dve godine posle radikalne cistektomije nastati progresija bolesti zbog postojanja mikrometastaza perivezikalno i/ili u limfnim nodusima koje su postojale još u momentu kada je uradjena operacija. Preoperativna primena kombinovane cisplatin bazirane hemioterapije ima značajno bolji efekat na ukupno preživljavanje u odnosu na samo hirurgiju, i indikovana je kod cT2-T4a, cN0 M0 stadijuma karcinoma mokraćne bešike (Witjes JA i sar, 2017). Produženje ukupnog preživljavanja za 5% i smanjenje rizika od smrti zbog karcinoma mokraćne bešike za 14% smatra se značajnim, a odlaganje radikalne cistektomije za 3-4 meseca nema uticaja na ishod bolesti i ukupno preživljavanje (Wosnitzer MS i sar, 2012). U poređenju sa samo cistektomijom, kod značajno većeg broja pacijenata koji su primili neoadjuvantnu hemioterapiju postiže se pT0, negativne hirurške margine i negativni limfni nodusi, odnosno značajno smanjenje faktora rizika za progresiju bolesti (Yuh BE i sar, 2013).

Adjuvantna hemioterapija podrazumeva primenu sistemske hemioterapije u periodu neposredno posle hirurgije. Premda nema jasnih dokaza da rutinska primena adjuvantne hemioterapije ima uticaj na ukupno preživljavanje, smatra se da kod pacijenata koji imaju visok rizik za progresiju bolesti, tj. postojanje ekastravezikalne propagacije i/ili pozitivne limfne žlezde, i preoperativno nisu primili neoadjuvantnu terapiju, treba primeniti adjuvantnu hemioterapiju (Leow JJ i sar, 2014). Bolja podnošljivost i dokazan benefit na ukupno preživljavanje, u terapijskoj strategiji neoadjuvantnu hemioterapiju ističu kao bolji izbor u odnosu na adjuvantnu (Sternberg CN i sar, 2012). Standardni hemioterapijski protokoli koji se primenjuju u oba terapijska pristupa su kombinacija gemcitabina i cisplatina (GC) ili metoreksata, vinblastina, doksorubicina i cisplatina (MVAC), a ograničenja su jednaka onima koja važe za primenu cisplatin bazirane hemioterapije.

"Bladder-preserving" pristup može biti alternativna za radikalnu cistektomiju kod pacijenata koji nisu podobni za hirurgiju, kao i kod onih koji ne pristaju na kompletno uklanjanje mokraćne bešike. Klinički kriterijumi koji mogu da olakšaju selekciju pacijenata za ovakav terapijski pristup su - veličina tumora <5cm, odsustvo CIS, postignuta kompletna resekcija tumora posle TURBT, pT2-T3a stadijum, radiografski odsustvo hidronefroze i limfadenopatije (Lerner SP, 2016). Terapijske opcije mogu biti samo TURT, TURT sa postoperativnom radioterapijom, TURT sa postoperativnom hemioterapijom, ili TURT sa postoperativnom radioterapijom i hemioterapijom (trimodalna strategija). Jedino je trimodalna terapija evaluirana u randomizovanim studijama, dok se ostale opcije smatraju eksperimentalnim modelima u fazi ispitivanja. Rezultati nekoliko prospektivnih randomizovanih studija dokazali su efikasnost trimodalnog terapijskog pristupa, sa ukupnim preživljavanjem posle 5 godina 57% i posle 10 godina 37% (Ploussard G i sar, 2014). Neoadjuvantna hemioterapija u kombinaciji sa trimodalnim lečenjem nema značajan uticaj na ukupno preživljavanje. Zračna terapija izvan protokola multimodalnog lečenja nema definisano mesto u lečenju MBIC.

### **1.1.7 Lečenje karcinoma mokraćne bešike - metastatska bolest**

Sistemska hemioterapija i dalje predstavlja standardnu opciju lečenja kod pacijenata sa inoperabilnim lokalno uzparedovalim ili metastaskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike. Premda je inicijalni terapijski odgovor relativno visok, medijana ukupnog preživljavanja je oko 15 meseci. U poređenju sa preživljavanjem od 3-6 meseci pre uvođenja moderne sistemske hemioterapije, postignut je značajan pomak, ali dugoročno petogodišnje preživljavanje je i dalje suboptimalno i iznosi oko 15% (Chang JS i sar, 2012).

Urotelijalni karcinom mokraćne bešike spada u hemiosenzitivne tumore. Veliki broj citotoksičnih lekova ima potvrđenu aktivnost u lečenju, ali terapijski odgovor na pojedinačne lekove je kratkotrajan i bez značajnog uticaja na ukupno preživljavanje. Stoga, dokazana pojedinačna aktivnost ovih lekova uslovlila je nastanak kombinovane terapije od kojih su najznačajniji protokoli bazirani na

cisplatinu kao najaktivnijem leku. Od uvođenja u praksu 1980-ih godina, kombinovana sistemska hemioterapija na bazi cisplatina još uvek je standard lečenja u prvoj terapijskoj liniji za pacijente koji su podobni da prime cisplatin. Terapijski protokoli koji se primenjuju podrazumevaju kombinovanu primenu citotoksičnih lekova gemcitabina i cisplatina (GC), ili metoreksata, vinblastina, doksorubicina i cisplatina (MVAC). Ne postoji razlika u terapijskoj efikasnosti ova dva protokola, i objektivni odgovor se postiže kod 46% (MVAC) i 49% (GC) slučajeva (Von der Maase H i sar, 2000). U komparativnim randomizovanim studijama, medijana ukupnog preživljavanja i 5-godišnje preživljavanje iznosili su 14 meseci i 13% za GC, u poređenju sa 15.2 meseci i 15.3% za MVAC (von der Maase H i sar, 2005). Ono što ova dva terapijska protokola čini različitim je značajno manja toksičnost GC. Manja učestalost pojave značajnih neželjenih efekata poput febrilne neutropenije, mukozitisa i alopecije, učinila je da GC postane prvi izbor u odnosu na MVAC (Sonpavde G i sar, 2012).

Medjutim, preko 50% pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike nisu kandidati za cisplatin baziranu hemioterapiju na osnovu kriterijuma prikazanih u Tabeli 5 (Galsky MD i sar, 2011). Procena bubrežne funkcije je najznačajniji kriterijum sa procenu podobnosti za cisplatin baziranu hemioterapiju. Kod ovih pacijenata trenutno ne postoji standardna terapijska opcija. Najčešće, kao jedna od mogućnosti je da se u okviru kombinacije lekova cisplatin zamenjuje karboplatinom u cilju izbegavanja bubrežne toksičnosti. Ukupno preživljavanje kod kombinacije lekova karboplatin i gemcitabin (CaG) iznosilo je 9.3 meseca (Dogliotti L i sar, 2007). U poređenju sa cisplatinom, karboplatin ima manju terapijsku efikasnost i kod pacijenata koji su podobni za cisplatin ne predstavlja ekvivalentnu alternativu.

*Tabela 5.: Kriterijumi za selekciju pacijenata koji nisu kandidati za cisplatin baziranu hemioterapiju (adaptirano iz Galsky MD i sar, 2012)*

---

*najmanje jedan od navedenih faktora mora da bude prisutan :*

- ECOG performans status  $\geq 2$
- Klirens kreatinina (GFR)  $< 60 \text{ ml/min}$
- Audiometrijsko oštećenje sluha (Gradus  $\geq 2$ )
- Periferna neuropatija (Gradus  $\geq 2$ )
- NYHA klasa III srčane slabosti

---

ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group; NYHA - New York Heart Association  
GFR - jacinna glomerularne filtracije (engl. Glomerular Filtration Rate)

Premda se dobar objektivni terapijski odgovor na primenjenu prvu liniju terapije postiže kod značajnog broja pacijenata, većina njih ipak brzo progredira. Druga terapijska linija je dugo vremena predstavljala nerešiv problem. Napredak u razumevanju molekularnih mehanizama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike rezultovao je velikim brojem istraživanja novih terapijskih opcija u okviru ciljane terapije. Inhibicija *programmed cell death - 1* (PD-1) proteina i njegovih liganda PD-L1 i PD-L2 koji su deo imunološkog *checkpoint* puta u regulaciji T-ćelijske aktivacije kojom se izbegava antitumorski imuni odgovor, je mehanizam zaslužan za otvaranje novog poglavlja u lečenju metastatskog urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, i promocije imunoterapije kao značajne terapijske opcije (Donin NM i sar, 2017; Sonpavde G i sar, 2014). Od skoro su u kliničku praksu uvedeni imunoterapijski lekovi u drugoj terapijskoj liniji, i kao izbor u prvoj terapijskoj liniji kod pacijenata koji nisu kandidati za cisplatin baziranu hemioterapiju. Terapijski milje metastatskog urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike se ubrazano menja, a imunoterapija dokazuje značajnu efikasnost u lečenju i postaje nov standard.

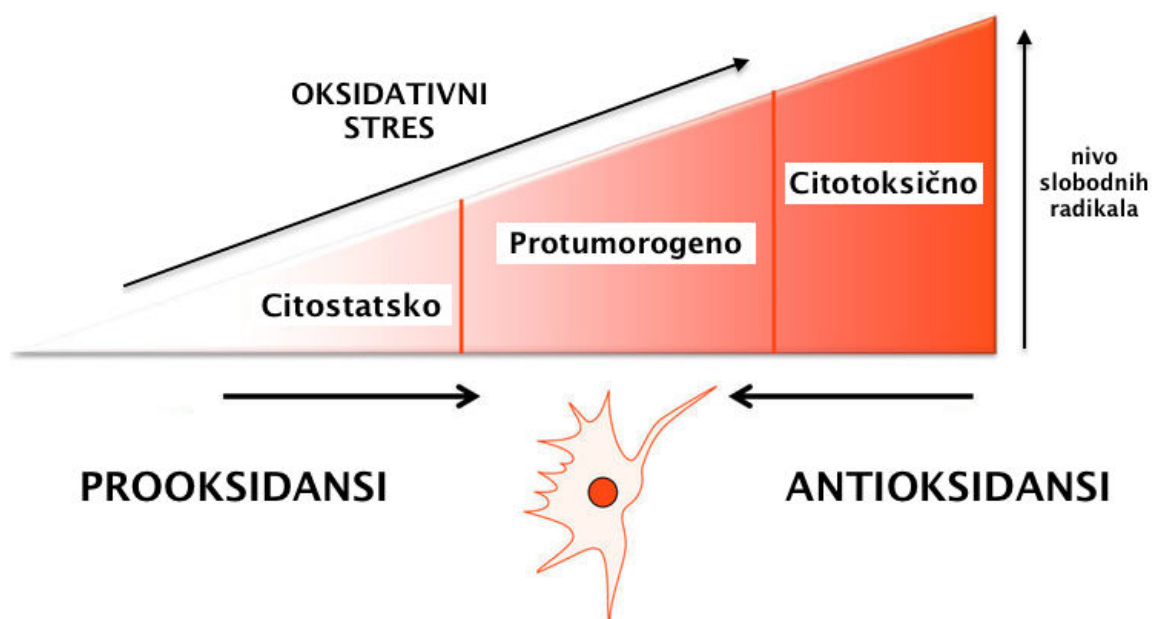
Trenutno još uvek ne postoje precizne metode kojima bi mogli da predvidimo kakav će biti odgovor na sistemsku hemioterapiju. Konvencionalna patohistološka evaluacija sa određivanjem patološkog stadijuma i gradusa karcinoma nije dovoljna, a molekularni biomarkeri koji bi mogli da služe u proceni prognoze i izbora najboljeg hemioterapijskog sredstva za lečenje, što je slučaj kod



drugih solidnih tumora (dojka, kolon, pluća), kod urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike trenutno ne postoje (Mbeutcha A i sar, 2016).

#### 1.1.7.1 Oksidativni stres u terapijskoj efikasnosti cisplatin bazirane hemioterapije

Oksidativni stres smatra se da ima značajnu ulogu u nastanku, progresiji i efektima terapije karcinoma. Indukujući mutacije u ranoj fazi, kiseonični slobodni radikali imaju ulogu promotera karcinogeneze. Ali, u odmaklom stadijumu bolesti, uloga oksidativnog stresa je dvojaka - sa jedne strane slobodni radikali deluju kao promotori progresije bolesti putem oštećenja DNK, a sa druge strane imaju funkciju da pojačavaju delovanje antikancerske hemio i/ili radioterapije (Slika 2) (Nogueira V i Hay N, 2013; Rixe O i Fojo T, 2007).



Slika 2: Ravnoteža izmedju prooksidanasa i antioksidanasa u regulaciji oksidativnog stresa i njihova različita uloga u progresiji karcinoma (*adaptirano iz Rixe O i Fojo T, 2007*)

Uprkos signifikantnom napretku u razvoju novih lekova, tradicionalna hemioterapija predstavlja i dalje značajan deo u lečenju malignih bolesti.

Hemioterapijski lekovi utiču na deobu ćelija ili na DNK funkciju i sintezu istovremeno u ćelijama karcinoma i u normalnim ćelijama. Nekoliko klasa hemioterapeutika svoje delovanje ostvaruju i produkcijom slobodnih radikala.

Cisplatin je slučajno otkriven od strane Dr Rosenberg-a 1965 godine dok je istraživao efekat elektromagnetnog polja na ćelijski rast bakterija. Dokazana antitumorska aktivnost ove supstance, omogućila je da sve do danas, cisplatin ostane jedan od najefikasnijih hemioterapijskih lekova koji se koriste u lečenju karcinoma. Međutim, terapijska efikasnost ovog leka vrlo često je kompromitovana pojavom dozno limitirajućih neželjenih efekata, kao i pojavom rezistencije na cisplatin. Antitumorska aktivnost cisplatina veruje se da nastaje kao rezultat interakcije leka sa hromozomalnom DNK. Ali, u stvari samo mala količina cisplatina deluje na taj način, tako da mehanizam inhibicije DNK replikacije ne može u celini da objasni ukupnu biološku aktivnost cisplatina (Dasari S i Tchounwou PB, 2014). Poznato je da efikasnost hemioterapeutika ne zavisi samo od njihove sposobnosti da indukuju oštećenje DNK, već isto tako i od mehanizama ćelijske odbrane da otkriju i reaguju na oštećenje DNK. Prepoznavši oštećenje DNK, ćelija može ili da repariše oštećenje i nastavi ćelijski ciklus, ili ako ne može da repariše oštećenje, završava smrću. Cisplatin kao i mnogi drugi hemioterapeutici, može da indukuje apoptozu. Signalni putevi koji regulišu apoptozu imaju značajnu ulogu u određivanju ćelijskog odgovora na cisplatin (Fong CW, 2016). Obzirom da različiti signalni putevi učestvuju u regulaciji osetljivosti ćelije na cisplatin, jedan od načina povećanja efikasnosti terapije je upotreba cisplatina u kombinaciji sa zračenjem i/ili lekovima koji ciljaju druge signalne puteve i doprinose boljoj efikasnosti cisplatin bazirane hemioterapije. Na isti način, kombinovana terapija može da smanji potrebnu dozu cisplatina za postizanje antitumorskog efekata, što rezultuje manjom učestalošću pojave neželjenih efekata. Pored oštećenja DNK, postoje dokazi da cisplatin takodje indukuje povećano stvaranje slobodnih radikala u ćeliji (Bazhin AV i sar, 2016). Cisplatinom indukovani oksidativni stres smatra se glavnim razlogom za pojavu toksičnih efekata hemioterapije (Deavall DG i sar, 2012). Međutim, doprinos cisplatinom indukovanih oksidativnog stresa u citotoksičnom efektu nevezano za DNK oštećenje još uvek nije razjašnjen (Rashid K i sar, 2013).

Dobro je poznato da postoji značajna individualna razlika u terapijskom odgovoru na isti lek. Različiti ne-genetski faktori mogu uticati na efikasnost određenog antikancerskog lečenja, kao što su starost, organ koji se tretira, konkomitantna terapija, interakcija sa drugim lekovima i priroda same bolesti. Dokazi da interindividualne razlike u terapijskom odgovoru na hemioterapiju mogu biti posledica genetskih varijacija u enzimima koji su uključeni u metabolizam lekova, uslovili su veliki broj studija sa nekonzistentnim rezultatima objavljenim u literaturi u vezi sa ispitivanjem veze između lekom indukovano oksidativnog stresa i efikasnosti lečenja kod pacijenata koji su primali cisplatin baziranu ili drugu vrstu hemioterapije (Traverso N i sar, 2013).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

U ovom istraživanju, ciljevi su bili :

1. Ispitati da li postoji povezanost genskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* sa rizikom za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike
2. Ispitati da li postoji povezanost između polimorfizma gena za *GPX1* i *SOD2* i fenotipskih karakteristika kao što su stadijum bolesti i gradus urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike
3. Odrediti prognostički značaj polimorfne genske ekspresije *GPX1* i *SOD2* kod bolesnika sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su lečeni sistemskom hemioterapijom

### **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. Selekcija ispitanika

Studija slučajeva i kontrola je obavljena u Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Ispitivanu grupu činilo je ukupno 330 pacijenata (230 muškaraca i 100 žena) prosečne starosti  $65 \pm 10,3$  godina sa patohistološki potvrđenom dijagnozom urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike koji su lečeni u Klinici za urologiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu u periodu od 2011. do 2015. U okviru celokupne ispitivane grupe, kod 190 pacijenata iskorišćeni su podaci i uzorci krvi iz biobanke uzoraka koji su prikupljeni na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu radi realizacije ciljeva projekta pod nazivom „Značaj glutation transferaza u podložnosti za nastanak oboljenja“ odobrenih od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta u Beogradu (broj dozvola: 470/XII-8 i 29/VI-7). Preostali ispitanici u ispitivanoj grupi (ukupno 140) predstavljali su novouključene pacijente u periodu od 1. oktobra 2014. do 1. novembra 2015. Substratifikacijom ispitanika uključenih u studiju u periodu od 1. oktobra 2014. do 1. novembra 2015., koji su imali metastatski urotelijalni karcinom mokraćne bešike i zbog toga su primali sistemsku hemioterapiju, kreirana je podgrupa pacijenata kod kojih je praćeno ukupno preživljavanje (*engl. overall survival, OS*) u periodu od dve godine. Ovu ispitivanu podgrupu je sačinjavalo 33 pacijenta (18 muškaraca i 15 žena), prosečne starosti  $65,45 \pm 9,07$  godina. Ukupna dužina praćenja trajala je do 1. novembra 2016. ili do momenta smrtnog ishoda zbog bilo kog razloga. Pre započinjanja sistemske hemioterapije, stadijum metastatske bolesti procenjen je radiografskim pregledom toraksa, abdomena i male karlice komjuterizovanom tomografijom (*engl. Multiple detector computed tomography, MDCT*) ili magnetnom rezonancom (*engl. magnetic resonance imaging, MRI*), i određen je broj metastatskih mesta prema organima. Primljeni protokoli sistemske hemioterapije bili su : *GC* - gemcitabin  $1000 \text{ mg/m}^2$  (dan 1, 8 i 15) plus cisplatin  $70 \text{ mg/m}^2$  (dan 1 ili 2) svakih 28 dana do maksimalno 6 ciklusa terapije, ili *MVAC* - metotreksat  $30 \text{ mg/m}^2$  (dan 1, 15 i 22) plus vinblastin  $3 \text{ mg/m}^2$  (dan 2, 15 i 22) plus doksorubicin  $30 \text{ mg/m}^2$  (dan

2) plus cisplatin 70 mg/m<sup>2</sup> (dan 2) svakih 28 dana do maksimalno 4 ciklusa terapije. Tokom perioda praćenja, obavljani su periodični kontrolni pregledi u Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije, kao i telefonskim putem.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u ispitivanu grupu bili su:

- urađena transuretralna resekcija tumora mokraćne bešike, radikalna cistektomija ili biopsija tumora mokraćne bešike, bez obzira na stadijum bolesti
- patohistološki potvrđena dijagnoza urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike sa procenom gradusa tumora i patoanatomskog stadijuma bolesti (pTNM)
- muškarci i žene starosti  $\geq 18$  godina
- potpisan informisani pristanak za učestvovanje u studiji

Podatak o aktuelnom ili anamnestički podatak o ranijem postojanju druge maligne bolesti je bio kriterijum za isključivanje iz ispitivane grupe.

Kontrolna grupa sačinjena je od ukupno 227 ispitanika uparenih po uzrastu  $\pm 2$  godine ( $63,4 \pm 7,9$  godina) i polu (154 muškaraca i 73 žene), koji su u istom vremenskom periodu lečeni u istoj ustanovi zbog nefrolitijaze, bez verifikovanog malignog oboljenja.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u kontrolnu grupu bili su:

- muškarci i žene starosti  $\geq 18$  godina
- potpisan informisani pristanak za učestvovanje u studiji

Podatak o aktuelnom ili anamnestički podatak o ranijem postojanju maligne bolesti je bio kriterijum za isključivanje iz kontrolne grupe.

Svi ispitanici iz ispitivane i kontrolne grupe popunjavali su strukturisan epidemiološki upitnik napravljen i validiran u Institutu za Epidemiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, u cilju ispitivanja faktora rizika za nastanak malignih bolesti. Upitnik je sadržavao pitanja o starosti, polu, mestu rođenja i stanovanja, profesiji, pušenju, dužini pušačkog staža i profesionalnoj izloženosti hemijskim karcinogenima. Na osnovu pušačkog statusa osobe su svrstane u nepušače i pušače. Podaci o profesionalnoj izloženosti su dihotominizovani kao izloženi ili neizloženi. Na osnovu dostupnih podataka iz popunjenih anketa, u celokupnom ispitivanom uzorku podaci u vezi sa pušenjem nedostajali su kod 4% ispitanika, a podaci u vezi sa profesionalnom izloženošću nisu bili navedeni kod



45% pacijanata i 25% kontrola. Zbog nekompletnog ili nedostupnog izveštaja patologa posle operacije/biopsije, podaci u vezi sa stadijumom bolesti nedostajali su kod 13 (3.9%), a u vezi sa gradusom tumora kod 35 (11%) pacijenata.

Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta u Beogradu (No. 29/XII-14) i sprovedena je u skladu sa etičkim standardima navedenim u Helsinskoj deklaraciji iz 2013. godine. Na početku studije, sve osobe od kojih je uziman biološki materijal koji je korišćen u studiji, kao i njihovi lični podaci, potpisale su informisani pristanak da su obaveštene o ciljevima i očekivanim ishodima studije.

### **3.2. Uzimanje uzoraka krvi**

Uzorci pune krvi (3 ml) za analizu polimorfizama gena za *GPX1* i *SOD2* uzimani su od svih ispitanika u vakutajneru sa citratom na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i odmah nakon uzimanja transportovani do Laboratorije za biohemiju Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Uzorci pune krvi su do izolacije DNK čuvani na -20°C.

### **3.3 Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi**

DNK je izolovana iz leukocita periferne krvi pomoću *Qiagen DNA mini kit-a* (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Ovom metodom su ćelijske membrane leukocita lizirane u rastvoru deterdženta, a histoni i ostali proteini vezani za DNK su uklonjeni enzimskom digestijom u prisustvu proteinaze K. Tako dobijeni lizat je prenošen u mini-spin kolone u kojima se nalazi silika-gel membrana koja selektivno vezuje DNK. Ostatak lizata je ispiran serijom pufera koji sadrže soli i etanol. U poslednjem koraku, DNK je ispirana sa kolone, alikvotirana i čuvana na -20°C do izvođenja reakcije lančanog umnožavanja (PCR). Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi za genotipizaciju nije bila uspešna kod 10% ispitanika.

### 3.4 Određivanje *GPX1* polimorfizma

Polimorfizam *GPX1* (*rs1050450*) gena je određivan analizom proizvoda restrikcione digestije DNK fragmenata nastalih reakcijom lančanog umnožavanja (*engl. PCR - Restriction fragment length polymorphism (RFLP)*). PCR reakciona smeša se sastojala iz: 2µl DNK, 10µl PCR master miksa, 7µl vode i po 0,5µl prajmera (*forward: 5'-GCCGCCGCTTCCAGACCAT-3'*; *reverse: 5'-CCCCCGAGACAGCAGCACT-3'*). Reakciju lančanog umnožavanja DNK segmenta činila je inicijalna denaturacija na 95°C 5 minuta, koju je pratilo 30 ponovljenih ciklusa od tri koraka: : denaturacija (20 sekundi na 95°C), hibridizacija prajmera (na 66°C tokom 40 sekundi) i elongacija (40 sekundi na 72°C). Poslednji ciklus pratila je finalna ekstenzija na 72°C tokom 5 minuta. Za digestiju PCR produkata korišćen je enzim Apal. Digestija je trajala 15-16 časova u vodenom kupatilu na 30°C. Vizuelizacija fragmenata digestije izvršena je uz pomoć *ChemiDoc imaging system (BioRad)* aparata nakon elektroforeze na 4% agaroznom gelu uz bojenje etidijum bromidom. Prisustvo traka od 67 i 61 bp ukazuje na *C/C* genotip (*wild type*). Prisustvo jedne trake od 128 bp označava *T/T* genotip. Prisustvo sve tri trake (128, 67 i 61 bp) predstavlja heterozigotni *C/T* genotip. U celokupnom ispitivanom uzorku, genotipizacija *GPX1* polimorfizma nije bila uspešna kod 15% ispitanika.

### 3.5 Određivanje *SOD2* polimorfizma

Polimorfizam *SOD2* (*rs4880*) gena određen je kvantitativnom PCR metodom (*engl. quantitative PCR, (qPCR)*). Po 5µl svakog uzorka naliveno je na ploču od 96 bunarića. Nakon uparavanja na 65 °C 30min, u svaki bunarić je dodato po 5µl PCR reakcione smeše (0,125µl *TaqMan* probe, 2,5µl PCR master mix-a, 2,375µl vode). Reakciju lančanog umnožavanja DNK segmenta je činilo 30 ponovljenih ciklusa, od kojih se svaki sastojao iz tri koraka: 1. Denaturacije DNK sekvence tokom 4 min na 94°C; 2. Vezivanja prajmera tokom 30s na 60°C; 3. Ekstenzije prajmera tokom 45s na 72°C. Finalna elongacija se odvijala na 72°C u trajanju od pet minuta. Rezultati su očitani korišćenjem *Mastercycler® ep realplex* softvera. U celokupnom

ispitivanom uzorku, genotipizacija SOD2 polimorfizma nije bila uspešna kod 20% ispitanika.

### 3.6 Statistička analiza

Normalnost raspodele podataka proverena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Distribucije frekvencija demografskih karakteristika, ispitivanih faktora rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike kao što su starost, pol, pušenje i profesionalna izloženost, kao i gena za *GPX1* i *SOD2*, su određivane kod svih ispitanika u ispitivanoj i kontrolnoj grupi. Hardy Weinberg ravnoteža je ispitivana posebno za slučajeve i kontrole za *GPX1* i *SOD2* genske polimorfizme. Statistička analiza se sastojala iz primene  $\chi^2$  testa za procenu značajnosti razlike u frekvenciji dobijenih rezultata između ispitivanih pacijenata i kontrolne grupe. Studentov t-test je korišćen u analizi razlika u godinama starosti između ispitivane i kontrolne grupe. Efekti genetskog polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike su procenjivani pomoću principa logističke regresije koji su korišćeni za računanje odnosa šansi (*eng. odds ratio - OR*) sa intervalom poverenja od 95% (*eng. confidence interval - CI 95%*). Statistička analiza dobijenih rezultata je izvedena korišćenjem kompjuterskog programa IBM SPSS ver. 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA). *p* vrednost  $\leq 0.05$  smatrana je statistički značajnom. Na osnovu distribucije dobijenih podataka, kao i prethodnog znanja o faktorima rizika za karcinom mokraćne bešike, rezultati su korigovani u odnosu na pol i starost zbog potencijalnog efekta u multivarijantnom logističkom regresionom modelu. U odnosu na *GPX1* genotip, pacijenti su dihotomisani na homozigote koji su nosioci oba referentna *GPX1-Pro* alela, tj. *GPX1 Pro200Pro* genotip, i one pacijente koji su nosioci barem jednog varijantnog *GPX1-Leu* alela, tj. *GPX1 Pro200Leu* i *GPX1 Leu200Leu* genotip. U slučaju *SOD2* genotipa, pacijenti su podeljeni na one koji su nosioci oba referentna *SOD2-Ala* alela, tj. *SOD2 Ala16Ala* genotip, i one koji su nosioci barem jednog varijantog *SOD2-Val* alela, tj. *SOD2 Val16Ala* i *SOD2 Val16Val* genotip. U analizi preživljavanja pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike lečenih hemioterapijom u odnosu na *GPX1* i *SOD2* polimorfizam, korišćena je Kaplan-Meier-ova analiza i log-rank test.

## **4.    REZULTATI**

#### 4.1 Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

Demografske karakteristike 330 bolesnika i 227 kontrola prikazane su u Tabeli 6. Grupi bolesnika činilo je 230 muškarca i 100 žena, a kontrolnu grupu 154 muškaraca i 73 žena. Prosečna starost u grupi bolesnika iznosila je  $65 \pm 10,3$  godina, a u kontrolnoj grupi  $63,4 \pm 7,9$  godina. Nije bilo značajne razlike između kontrolne grupe i bolesnika sa karcinomom mokraćne bešike u pogledu polne distribucije i godina starosti ( $p > 0,05$ ). U istoj tabeli prikazan je efekat različitih faktora na rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike. Svi ispitanici su podeljeni na osnovu izloženosti faktorima rizika. U grupi bolesnika bilo je značajno više pušača (75%) u odnosu na kontrolnu grupu (49%). Naši rezultati su pokazali da je rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike 3,9 puta veći kod pušača u odnosu na nepušače ( $OR=3,9$ ,  $95\%CI=2,6-6$ ,  $p < 0,001$ ). Na osnovu podataka dobijenih iz upitnika o profesionalnoj izloženosti hemijskim karcinogenima, svi ispitanici su u daljoj analizi, podeljeni na izložene i neizložene. U Tabeli 6 prikazano je da je procenat profesionalno izloženih u grupi bolesnika značajno veći (32%) nego procenat izloženih u grupi kontrola (23%). Pored toga, naši rezultati su pokazali da je rizik od nastanka karcinoma mokraćne bešike 1,9 puta veći kod osoba koje su bile profesionalno izložene u poredjenju sa neizloženim bolesnicima ( $OR=1,9$ ,  $95\%CI=1,1-3,2$ ,  $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Demografske karakteristike pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike i kontrolne grupe

	Kontrole	Pacijenti	OR (95% CI)	p
Starost (godine)	63,4 ± 7,9	65 ± 10,3		0,051
Pol, n (%)				
Ženski	73 (32)	100 (30)	1,0	
Muški	154 (68)	230 (70)	0,8 (0,54-1,21)	0,3
Pušenje, n (%)				
Nepušač	112 (51)	80 (25)	1,0	
Pušač	108 (49)	247 (75)	3,9 (2,6 – 6)	<0,001**
Profesionalna izloženost, n (%)				
Neizložen	130 (77)	119 (68)	1,0	
Izložen	38 (23)	57 (32)	1,9 (1,1 – 3,2)	0,013*

OR (engl. *odds ratio*) - odnos šansi; CI (engl. *confidence interval*) - interval poverenja; \*označava p<0,05; \*\* označava p<0,001

Svi pacijenti u ispitivanoj grupi su imali patohistološki potvrđenu dijagnozu urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Kako je prikazano u Tabeli 7 najveći broj pacijenata dijagnostikovani su u nemetastatskom stadijumu bolesti (284). U cilju dalje analize, pacijenti u nemetastatskom stadijumu bolesti podijeljeni su u dve grupe prema stadijumu tumorske bolesti (pT stadijum). U grupi sa nemišićno-invazivnim karcinomom mokraćne bešike (NMBIC) nalazilo se 144 (50,7%) pacijenata, sa stadijumom pTa kod 6,9% i stadijumom pT1 kod 93,1% slučajeva. Grupu sa mišićno-invazivnim karcinomom mokraćne bešike (MIBC) sačinjavalo je 140 (49,3%) pacijenata, sa stadijumom pT2 kod 65%, stadijumom pT3 kod 18,6% i stadijumom pT4 kod 16,4% slučajeva. Metastatski stadijum bolesti dijagnostikovani su kod 33 pacijenta. Prema patohistološkom gradusu, urotelijalni karcinom mokraćne bešike visokog gradusa (engl. *High Grade, HG*) registrovan je kod 44,7%, a niskog gradusa (engl. *Low Grade, LG*) kod 39% slučajeva. Papilarna neoplazma niskog stepena maligniteta (PUNLMP) nadjena je u 16,3% slučajeva.

Tabela 7. Stadijum bolesti i patohistološki gradus tumora kod pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike

	pacijenti n (%)
<b>stadijum bolesti</b>	
<i>nemetastatski</i>	284
<i>NMIBC</i>	144 (50,7)
pTa	10 (6,9)
pT1	134 (93,1)
<i>MIBC</i>	140 (49,3)
pT2	91 (65)
pT3	26 (18,6)
pT4	23 (16,4)
<i>metastatski</i>	33
<b>patohistološki gradus (WHO 2004)</b>	
PUNLMP	48 (16,3)
Low Grade (LG)	115 (39)
High Grade (HG)	132 (44,7)

NMIBC - ne-mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike; MIBC - mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike; WHO - Svetska zdravstvena organizacija; PUNLMP - papilarna neoplazma niskog stepena maligniteta; Low Grade (LG) - urotelijalni karcinom visokog gradusa; High Grade (HG) - urotelijalni karcinom visokog gradusa

#### 4.2 Polimorfizam *GPX1* i *SOD2* gena kod pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike i kontrolne grupe

U ovom istraživanju određivan je genetski polimorfizam glutation peroksidaze (*GPX1*) i superoksid dismutaze (*SOD2*). Tabela 8 prikazuje povezanost *GPX1* i *SOD2* genotipa sa rizikom za nastanak karcinoma mokraćne bešike.

Tabela 8. Povezanost *GPX1* i *SOD2* genotipa sa rizikom za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

genotipovi	pacijenti n (%)	kontrole n (%)	OR (95% CI)	p
<i>GPX1 rs1050450</i>				
<i>Pro200Pro</i>	104 (33.0)	67 (38.5)	1,0**	
<i>Pro200Leu</i>	159 (50.5)	89 (51.1)	1,07 (0,7-1,6)	0,75
<i>Leu200Leu</i>	52 (16.5)	18 (10.3)	1,5 (0,8-2,8)	0,216
<i>Pro200Leu + Leu200Leu</i>	211 (67.0)	107 (61.5)	1,15 (0,8-1,7)	0,5
<i>SOD2 rs4880</i>				
<i>Ala16Ala</i>	65 (23)	66 (32)	1,0**	
<i>Val16Ala</i>	155 (56)	99 (46)	1,65 (1,07-2,53)	0,02*
<i>Val16Val</i>	60 (21)	47 (22)	1,33 (0,79-2,23)	0,29
<i>Val16Ala + Val16Val</i>	215 (77)	146 (69)	1,55 (1,03-2,3)	0,03*

OR (engl. *odds ratio*) - odnos šansi; CI (engl. *confidence interval*) - interval poverenja; korigovano u odnosu na pol i godine; \*označava  $p < 0,05$ ; \*\*označava referentni genotip

Uočeno je da među bolesnicima sa karcinomom mokraćne bešike postoji značajno veća učestalost *SOD2 Val16Ala* genotipa (56%), u poređenju sa kontrolama ( $p < 0,05$ ). U distribuciji *SOD2 Val16Val* genotipa kod bolesnika sa karcinomom mokraćne bešike i kontrola nema razlike, ali je uočeno da među bolesnicima značajno više ima nosioca varijantog *SOD2-Val* alela u poređenju sa kontrolama. Naime, učestalost *SOD2 Val16Ala + SOD2 Val16Val* genotipa je značajno bila češća u grupi bolesnika sa karcinomom mokraćne bešike (77%) u poređenju sa kontrolama (69%). Pored toga, pokazano je da je *SOD2 Val16Ala* genotip bio udružen sa značajno većim rizikom za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (OR=1,65, 95%CI=1,07-2,53,  $p=0,02$ ) u poređenju sa nosiocima *SOD2 Ala16Ala* genotipa. Šta više, kod osoba koje su nosioci bar jednog *SOD2-Val* alela, odnosno imaju *SOD2 Val16Ala* ili *SOD2 Val16Val* genotip, rizik je bio i dalje značajno povišen u poređenju sa nosiocima *SOD2 Ala16Ala* genotipa (OR=1,55; 95%CI=1,03-2,3,  $p=0,03$ ).



Posmatrajući distribuciju *GPX1* genotipova, nije uočeno postojanje značajne razlike u učestalosti *GPX1Pro200Leu* niti *GPX Leu200Leu* između pacijenata i kontrola. Premda je u grupi pacijenata postojalo više nosioca *GPX1-Leu* alela (67%) u poređenju sa kontrolnom grupom (61,5%), razlika u distribuciji *GPX1 Pro200Leu + Leu200Leu* nije statistički značajna. Prema prikazanim rezultatima u istoj tabeli, nije uočeno da *GPX1 Pro200Leu* i *GPX Leu200Leu* genotipovi značajno utiču na rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (OR=1,07, 95%CI=0,7-1,62, p=0,75 i OR=1,5, 95%CI=0,8-2,84, p=0,216, prema redu navodjenja) u poredjenju sa osobama nosiocima *GPX1 Pro200Pro* genotipa.

U daljoj analizi, ispitivali smo kombinovani efekat gensko-genske interakcije *GPX1* i *SOD2* genotipova na rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike i ovi rezultati su prikazani u Tabeli 9. Nije postojala statistički značajna razlika u riziku za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike kod osoba koje su istovremeno imale referentni *SOD2 Ala16Ala* genotip i najmanje jedan varijanti *GPX1-Leu* alel. Nasuprot tome, kod osoba koje su nosioci najmanje jednog varijantnog *SOD2-Val* alela, i istovremno imaju referentni *GPX1 Pro200Pro* genotip, uočeno je značajno povećanje rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (OR=2,16; 95%CI=1,05-4,42, p=0,036). Takođe, značajno povećanje rizika uočeno je i kod osoba koje su istovremeno imale najmanje jedan varijanti *SOD2-Val* alel i najmanje jedan varijanti *GPX1-Leu* alel u odnosu na nosioce *GPX1 Pro200Pro/SOD2 Ala16Ala* genotipova (OR=1,96, 95%CI=1,01-3,78, p=0,047).

Tabela 9. Kombinovani efekat *GPX1* i *SOD2* genotipova na rizik u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

genotipovi	pacijenti n (%)	kontrole n (%)	OR (95% CI)	p
<i>GPX1/SOD2</i>				
<i>Pro200Pro / Ala16Ala</i>	22 (8)	24 (15)	1,0**	
<i>Pro200Leu+ Leu200Leu / Ala16Ala</i>	43 (16)	29 (17)	1,55 (0,72-3,33)	0,260
<i>Pro200Pro / Val16Ala + Val16Val</i>	73 (26)	40 (24)	2,16 (1,05-4,42)	0,036*
<i>Pro200Leu + Leu200Leu / Val16Ala + Val16Val</i>	139 (50)	73 (44)	1,96 (1,01-3,78)	0,047*

OR (engl. *odds ratio*) - odnos šansi; CI (engl. *confidence interval*) - interval poverenja; korigovano u odnosu na pol i godine; \*označava  $p < 0,05$ ; \*\* označava referentni genotip

S obzirom da je pušenje dobro poznati faktor rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike u daljoj analizi je ispitivana interakcija između pušenja, i *GPX1* i *SOD2* genotipa u riziku za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike i rezultati su prikazani u Tabeli 10. Dobijeni rezultati pokazuju da pušenje značajno modifikuje rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike udruženo sa *SOD2* genotipom.

Uočeno je da kod osoba koje su nosioci barem jednog varijantnog *SOD2-Val* alela (*SOD2 Val16Ala + Val16Val* genotip), rizik u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike je bio 7,5 puta veći kod pušača u poređenju sa osobama nepušačima nosiocima referentnog *SOD2 Ala16Ala* genotipa (OR=7,5, 95%CI=3,4-163,  $p < 0,001$ ). Premda je u rezultatima kod pušača u poređenju sa nepušačima, isto tako registrovan povišen rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike i kod osoba koje su nosioci referentnog *SOD2 Ala16Ala* genotipa (OR=4.14, 95%CI=1,8-9,5,  $p < 0,001$ ), postojanje barem jednog varijantog *SOD2-Val* alela je značajno povećavalo rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike kod pušača u poređenju sa nepušačima (OR=7,5, 95%CI=3,4-163,  $p < 0,001$ ). Takođe, uočeno je da kod pušača u poređenju sa nepušačima, postoji povišen rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike kod osoba koje su nosioci

referentnog *GPX1 Pro200Pro* genotipa (OR=3.33, 95%CI=1,6-6,0, p<0,001), i da se ovaj rizik samo neznatno povećao kod osoba nosioca barem jednog varijantnog *GPX1-Leu* alela (*GPX1 Pro200Leu + Leu200Leu* genotip), (OR=3.67, 95%CI=1,85-7,26, p<0,001) u odnosu na nepušače nosioce istih genotipova. S obzirom da pušenje nezavisno povećava rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike oko 4 puta, dobijeni rezultati u slučaju osoba nosioca bar jednog *SOD2-Val* alela koji su pušači govore u prilog postojanja kombinovanog efekta pušenja i genotipa.

Tabela 10. Kombinovani efekat pušenja i *GPX1* i *SOD2* genotipova na rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

Genotip/pušenje	Pacijenti n (%)	Kontrole n (%)	OR (95% CI)	p
<i>SOD2 rs4880</i>				
<i>Ala16Ala</i> / nepušač	11 (4)	28 (13)	1,0***	
<i>Ala16Ala</i> / pušač	53 (19)	38 (18)	4,14 (1,8-9,5)	<0.001**
<i>Val16Ala + Val16Val</i> / nepušač	58 (21)	78 (38)	1,9 (0,9-4,2)	0,1
<i>Val16Ala + Val16Val</i> / pušač	155 (56)	63 (30)	7,5 (3,4-16,3)	<0.001**
<i>GPX1 rs1050450</i>				
<i>Pro200Pro</i> / nepušač	23 (7)	28 (16)	1,0***	
<i>Pro200Pro</i> / pušač	80 (25)	37 (21)	3,33 (1,6-6,0)	<0.001**
<i>Pro200Leu + Leu200Leu</i> / nepušač	55 (18)	49 (28)	1,32 (0,6-2,7)	0,441
<i>Pro200Leu + Leu200Leu</i> / pušač	159 (50)	62 (35)	3,67 (1,8-7,2)	<0.001**

OR (engl. *odds ratio*) - odnos šansi; CI (engl. *confidence interval*) - interval poverenja; korigovano u odnosu na pol i godine; \*označava p<0,05; \*\* označava p<0,001; \*\*\*označava referentni genotip

#### 4.3 Povezanost genetskog polimorfizma *GPX1* sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

Distribucija *GPX1* genotipova prema stadijumu bolesti i patohistološkom gradusu tumora prikazana je u Tabeli 11. Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika u distribuciji *GPX1* genotipova kod pacijenata sa NMIBC

i MIBC u nemetastatskom stadijumu bolesti ( $p=0,049$ ). Naime, varijantni *GPX1*-Leu alelni genotipovi (*GPX1 Pro200Leu* i *GPX1 Leu200Leu*) su značajno češće bili registrovani u poređenju sa referentnim *GPX1 Pro200Pro* genotipom i kod pacijenata sa NMIBC i sa MIBC. U odnosu na patohistološki gradus tumora, takođe je pokazano da postoji statistički značajna razlika u distribuciji učestalosti *GPX1* genotipova. Varijantni *GPX1*-Leu alelni genotipovi (*GPX1 Pro200Leu* i *GPX1 Leu200Leu*) su značajno češće bili registrovani u poređenju sa referentnim *GPX1 Pro200Pro* genotipom kod sva tri gradusa tumora. *GPX1 Pro200Pro* genotip je češće registrovan kod pacijenata sa MBIC u poređenju sa NMIBC (udruženo sa višim stadijumom bolesti) i značajno češće kod urotelijalnih karcinoma mokraćne bešike visokog gradusa - High Grade (udruženo sa višim gradusom tumora). *GPX1 Pro200Leu* i *GPX1 Leu200Leu* značajno su češće bili registrovani kod pacijenata sa NMBIC u poređenju sa MIBC (udruženo sa nižim stadijumom bolesti) i značajno češće kod PUNLMP i urotelijalnih karcinoma mokraćne bešike niskog gradusa - Low Grade (udruženo sa nižim gradusom)

Tabela 11. Distribucija *GPX1* genotipa prema stadijumu bolesti i patohistološkom gradusu tumora

Tumor	genotip <i>GPX1</i> rs1050450				p
	Pacijenti, n	<i>Pro200Pro</i> n (%)	<i>Pro200Leu</i> n (%)	<i>Leu200Leu</i> n (%)	
<b>Stadijum bolesti</b>					
<i>nemetastatski</i>					
NMIBC	138	38 (27)	73 (53)	27 (20)	
MIBC	137	57 (42)	58 (42)	22 (16)	0,049*
<i>metastatski</i>					
mUBC	33	16 (49)	13 (39)	4 (12)	
<b>Gradus tumora</b>					
PUNLMP	44	7 (16)	29 (66)	8 (18)	
Low Grade (LG)	112	39 (35)	49 (44)	24 (21)	
High Grade (HG)	129	53 (41)	59 (46)	17 (13)	0,018*

\*označava  $p < 0,05$ ; NMIBC - ne-mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike; MIBC - mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike; WHO - Svetska zdravstvena organizacija; mUBC - metastatski urotelijalni karcinom mokraćne bešike; PUNLMP - papilarna urotelijalna neoplazma niskog stepena maligniteta; Low Grade (LG) - urotelijalni karcinom visokog gradusa; High Grade (HG) - urotelijalni karcinom visokog gradusa

#### 4.4 Povezanost genetskog polimorfizma *SOD2* sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

Distribucija *SOD2* genotipova prema stadijumu bolesti i patohistološkom gradusu tumora prikazana je u Tabeli 12. Analiza rezultata je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji *SOD2* genotipova niti prema stadijumu tumorske bolesti, niti prema patohistološkom gradusu tumora.

Tabela 12. Distribucija *SOD2* genotipa prema stadijumu bolesti i patohistološkom gradusu tumora

Tumor	genotip <i>SOD2 rs4880</i>				p
	Pacijenti, n	<i>Val16Val</i> n (%)	<i>Val16Ala</i> n (%)	<i>Ala16Ala</i> n (%)	
<b>Stadijum bolesti</b>					
<i>nemetastatski</i>					
NMIBC	120	23 (19)	65 (54)	32 (27)	
MIBC	126	30 (24)	70 (56)	26 (20)	0,453
<i>metastatski</i>					
mUBC	33	9 (27)	17 (52)	7 (21)	
<b>Gradus tumora</b>					
PUNLMP	30	6 (20)	16 (53)	8 (27)	
Low Grade (LG)	102	21 (21)	58 (57)	24 (22)	
High Grade (HG)	122	29 (24)	65 (53)	28 (23)	0,96

\*označava  $p < 0,05$ ; NMIBC - ne-mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike; MIBC - mišićno invazivni karcinom mokraćne bešike; WHO - Svetska zdravstvena organizacija; mUBC - metastatski urotelijalni karcinom mokraćne bešike; PUNLMP - papilarna neoplazma niskog stepena maligniteta; Low Grade (LG) - urotelijalni karcinom visokog gradusa; High Grade (HG) - urotelijalni karcinom visokog gradusa

#### 4.5 Demografske karakteristike pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju i kontrola

Demografske karakteristike pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike i kontrola prikazane su u Tabeli 13. Ispitivanu grupu sačinjavalo je 33 pacijenata prosečne starosti  $65,45 \pm 9,07$  godina (18 muškaraca i 15 žena) u metastatskom stadijumu urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju. Kontrolna grupa je bila sačinjena od 227 ispitanika prosečne starosti  $63,42 \pm 7,97$  godina (154 muškaraca i 73 žena). Nije bilo značajne razlike između kontrolne grupe i pacijenata u pogledu polne distribucije i godina starosti ( $p > 0,05$ ). Uzimajući u

obzir prethodno dobijene rezultate u vezi sa značajem pušenja kao faktora rizika u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, ispitali smo pušačke navike kod ispitanika u obe grupe. Analiza podataka koji su prikazani u Tabeli 13, pokazala je da pušenje nije bilo značajno povezano sa rizikom za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike u ispitivanoj populaciji (pacijenti : 61% pušači, 39% nepušači, i kontrolna grupa: 49% pušači i 51% nepušači)

Tabela 13. Demografske karakteristike pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju i kontrola

demografske karakteristike	pacijenti n (%)	kontrole n (%)	p
pol			
muški	18 (54)	154 (68)	
ženski	15 (46)	73 (32)	0,131
prosečna starost ± SD	65,45 ± 9.07	63,42± 7.97	0,75
pušenje			
nepušači	13 (39)	112 (51)	
pušači	20 (61)	108 (49)	0,217

#### **4.6 Ukupno preživljavanje pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju prema statusu prethodno urađene cistektomije**

Povezanost statusa prethodno urađene cistektomije i ukupnog preživljavanja pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju prikazana je u Tabeli 14. Prosečna dužina ukupnog preživljavanja kod pacijenata kod kojih je prethodno urađena cistektomija bilo je 12,7 meseci (95%CI=7.2-18.3), a kod pacijenata kod kojih prethodno nije urađena cistektomija iznosilo je 11,1 meseci (95%CI=7.0-15.2). Kaplan-Meier-ova analiza preživljavanja nije pokazala da postoji značajan uticaj

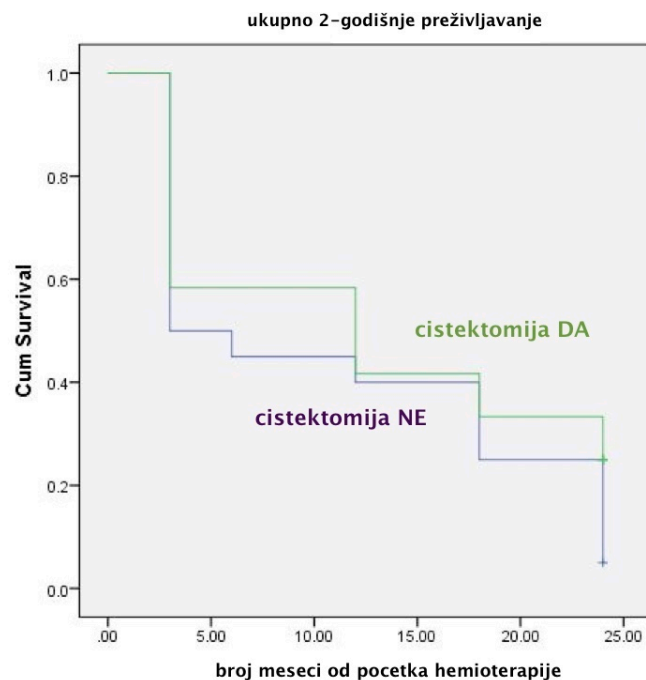
prethodno uradjene cistektomije na ukupno preživljavanje kod pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju (Grafikon 6). Prosečna vrednost ukupnog preživljavanja kod pacijenata sa metastatskim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju u našem istraživanju iznosila je 11,7 meseci (95%CI=8.4-15.1).

Tabela 14. Prosečna dužina ukupnog preživljavanja pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju prema statusu prethodno urađene cistektomije

	pacijenti (n)	prosečan broj meseci	95% CI
ukupno preživljavanje od početka hemioterapije	svi pacijenti (33)	11,7	8,4 - 15,1
	kod kojih nije uradjena cistektomija (20)	11,1	7,0 - 15,2
	kod kojih je uradjena cistektomija (13)	12,7	7,2 - 18,3

CI (engl. *confidence interval*) - interval poverenja





Grafikon 6. Kaplan–Meier-ova kriva ukupnog preživljavanja pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatinu baziranu hemioterapiju prema statusu prethodno urađene cistektomije

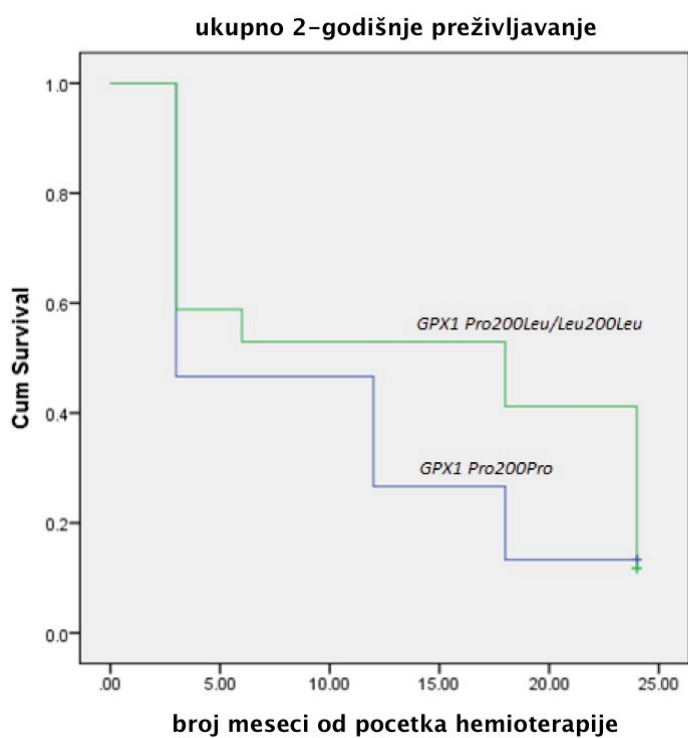
#### 4.7 Prognošička uloga polimorfizma *GPX1* i *SOD2* kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su lečeni hemioterapijom na bazi cisplatina.

Distribucija *GPX1* i *SOD2* genotipova kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike i kontrola prikazana je u Tabeli 15. Učestalost *GPX1* genotipova kod pacijenata je bila 49% za *Pro200Pro*, 39% za *Pro200Leu* i 12% za *Leu200Leu* genotip. U poređenju sa distribucijom *GPX1* genotipova u kontrolnoj grupi, nije uočena značajna razlika kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike. Takođe, nije postojala značajna razlika u distribuciji *SOD2* genotipova kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike (27% *Val16Val*, 52% *Val16Ala* i 21% *Val16Val*) i kontrola.

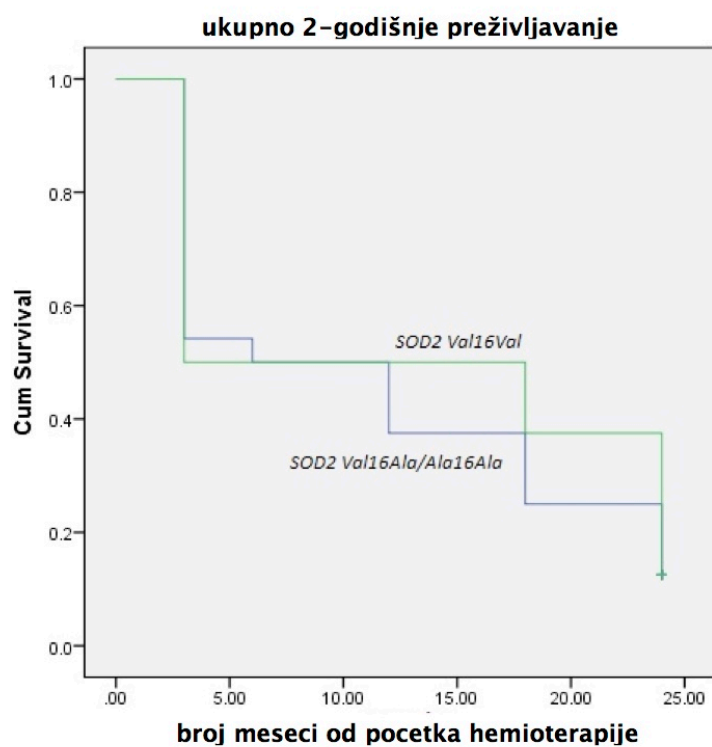
Tabela 15. Distribucija genotipova *GPX1* i *SOD2* kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju i kontrola

genotip	pacijenti n (%)	kontrole n (%)	p
<i>GPX1 rs1050450</i>			
<i>Pro200Pro</i>	16 (49)	67 (39)	
<i>Pro200Leu</i>	13 (39)	89 (51)	
<i>Leu200Leu</i>	4 (12)	18 (10)	0.461
<i>SOD2 rs4880</i>			
<i>Ala16Ala</i>	7 (21)	47 (22)	
<i>Val16Ala</i>	17 (52)	99 (47)	
<i>Val16Val</i>	9 (27)	66 (31)	0.865

U cilju procene uticaja *GPX1* and *SOD2* genotipova na ukupno preživljavanje (*engl. overall survival, OS*), pratili smo 33 pacijenta sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike u toku perioda od dve godine. U odnosu na *GPX1* genotip, pacijenti su dihotomisani na homozigote koji su nosioci oba referentna *GPX1-Pro* alela, tj. *GPX1 Pro200Pro* genotip (16 pacijenata) i one pacijente koji su nosioci barem jednog varijantnog *GPX1-Leu* alela, tj. *GPX1 Pro200Leu* i *GPX1 Leu200Leu* genotip (17 pacijenata). Kaplan-Meier-ova analiza preživljavanja nije pokazala da postoji značajan uticaj genetskog polimorfizma *GPX1* na ukupno preživljavanje pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koju su primali cisplatin baziranu hemioterapiju (Grafikon 7). Na isti način, ispitivan je uticaj *SOD2* genetskog polimorfizma sa ukupnim preživljavanjem. Prema *SOD2* genotipu, pacijenti su podeljeni na one koji su nosioci oba referentna *SOD2-Ala* alela, tj. *SOD2 Ala16Ala* genotip (7 pacijenata), i one koji su nosioci barem jednog varijantnog *SOD2-Val* alela, tj. *SOD2 Val16Ala* i *SOD2 Val16Val* genotip (24 pacijenata). Kao i u prethodnom slučaju, Kaplan-Meier-ova analiza preživljavanja nije pokazala da postoji značajan uticaj genetskog polimorfizma *SOD2* na ukupno preživljavanje pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koju su primali cisplatin baziranu hemioterapiju (Grafikon 8).



Grafikon 7. Kaplan–Meier-ova kriva ukupnog preživljavanja pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju u odnosu na polimorfizam *GPX1*



Grafikon 8. Kaplan–Meier-ova kriva ukupnog preživljavanja pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju u odnosu na polimorfizam *SOD2*

## **5. DISKUSIJA**

Smatra se da oksidativni stres ima značajnu ulogu kako u nastanku i progresiji, tako i u efektima terapije različitih tipova karcinoma. Stoga, opravdano je mišljenje da prisustvo genetskih varijanti antioksidativnih enzima *GPX1* i *SOD2*, koje funkcionalno za posledicu imaju izmenjenu enzimsku aktivnost, u interakciji sa faktorima spoljne sredine, može uticati na rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Na isti način, nameće se pitanje da li polimorfizam gena za *GPX1* i *SOD2* može da utiče i na fenotipske karakteristike tumora, prognozu bolesnika sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike, kao i odgovor na sistemsku hemioterapiju. Pregledom literature, do sada najviše je ispitivan polimorfizam *GPX1* (*rs1050450*) gena. Otkriće ovog funkcionalnog genetskog polimorfizma *GPX1* omogućilo je sprovođenje velikog broja asocijativnih studija u cilju ispitivanja povezanosti sa rizikom za nastanak karcinoma, ali dobijeni rezultati su i dalje kontradiktorni. Slični rezultati mogu se uočiti i u istraživanjima sprovedenim u cilju ispitivanja uloge drugog značajnog antioksidativnog enzima *SOD2* u riziku za nastanak karcinoma. Najviše pažnje istraživača je privukao polimorfizam *SOD2* (*rs4880*) gena. Međutim, trenutno i dalje zbog postojanja kontradiktornih rezultata, povezanost polimorfizma *SOD2* sa rizikom za nastanak različitih tipova karcinoma još uvek nije do kraja razjašnjena.

U našem istraživanju ispitivali smo povezanost genetskog polimorfizma *GPX1* (*rs1050450*) i *SOD2* (*rs4880*) sa nastankom, fenotipskim karakteristikama i prognozom urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Analizom dobijenih rezultata, uočili smo da polimorfizam gena za *SOD2* predstavlja nazavisan faktor rizika u nastanku urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, i da osobe koje imaju barem jedan varijanti *SOD2-Val* alel (*SOD2 Val16Ala* ili *SOD2 Val16Val* genotip) imaju oko 1,5 puta veću šansu da dobiju urotelijalni karcinom mokraćne bešike u poređenju sa osobama koje imaju referentni *SOD2 Ala16Ala* genotip. S druge strane, nije uočeno da polimorfizam gena za *GPX1* predstavlja značajan nezavisan faktor rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Pored toga, pokazano je da genetski polimorfizam *SOD2* i *GPX1* nema uticaj na ukupno preživljavanje pacijenata sa metatstatskim karcinomom mokraćne bešike.

Dosadašnja istraživanja genetskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* kod pacijenata sa karcinomima različitih lokalizacija pokazala su kontradiktorne

rezultate saopštene u literaturi. U studijama sprovedenim na pacijentima sa hormonski zavisnim karcinomima poput karcinoma dojke, ovarijuma i prostate, uočeno je postojanje povećanog rizika za nastanak karcinoma kod osoba koje su imale *SOD2-Ala* alel (Kang SW, 2015; Kang D i sar, 2007). Suprotno tome, kod karcinoma mokraćne bešike, pluća, kolorektalnog i skvamocelularnog karcinoma usne duplje povećan rizik je registrovan kod osoba nosioca varijantnog *SOD2-Val* alela (Hung RJ i sar, 2004; Kang D i sar, 2007; Liu Y i sar, 2014). Naši rezultati su u skladu sa nalazima Hung-a i sar, koji su u studiji sprovedenoj kod 201 pacijenata i 214 kontrola iz severne Italije, pokazali da prisustvo *SOD2-Val* alela povećava 1,9 puta rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike (Hung R i sar, 2004). Međutim, poslednjih godina, povezanost *GPX1* i *SOD2* polimorfizma i karcinoma mokraćne bešike ispitivana je u nekoliko studija, a dobijeni rezultati su u suprotnosti sa našim. Naime, u studiji Kucukgergin-a i sar, ispitivani su polimorfizmi *SOD2 Ala-9Val* i *GPX1 Pro198Leu* kod 157 pacijenata sa karcinomom mokraćne besike i pokazano je da postoji povezanost između *GPX1 Leu/Leu* genotipa i povećanog rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike u odnosu na *GPX1 Pro/Pro* genotip (Kucukgergin C i sar, 2012). Pored toga, rezultati meta-analize iz 2014. godine (Cao M i sar, 2014) su pokazali da su nosioci jednog ili oba *GPX1-Leu* alela imali oko 2 puta veći rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike, u poredjenju sa *GPX1 Pro/Pro* genotipom, dok nije uočena značajna povezanost *SOD2* polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike. Slični rezultati dobijeni su u studiji koja je sprovedena u etničkoj populaciji Ekvadora, gde je pokazano da postoji 3,8 puta veći rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike kod osoba koje imaju *GPX1 Pro198Leu* genotip (Paz-y-Miño C i sar, 2010). I u istraživanju autora iz Japana, pokazano je postojanje 2,6 puta većeg rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike kod osoba sa *GPX1 Pro/Leu* u poređenju sa *GPX1 Pro/Pro* genotipom (Ichimura Y i sar, 2004). Nasuprot tome, studija sprovedena na Marokanskoj populaciji, nije pokazala značajnu povezanosti između genetskog polimorfizma *GPX1 Pro198Leu* i rizika za nastanak karcinoma mokraćne bešike (Hadami K i sar, 2016), što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Odstupanje naših, od rezultata dobijenih u prethodnim studijama, može se objasniti postojanjem značajne razlike u geografskoj distribuciji *GPX1* i *SOD2*

genotipova. Poznato je da se *GPX1-Leu* alel detektuje kod 36% belaca, 33% crnaca, 5% Japanaca i do sada nije otkriven kod Kineza, što može da bude značajno u poređenju rezultata studija različitih etničkih populacija (Habyarimana T i sar, 2018). Premda se svi slažu da postoje, trenutno u literaturi nema podataka u vezi sa geografskim razlikama u distribuciji učestalosti *SOD2-Val* alela. Upadljiva heterogenost koja postoji u saopštenim rezultatima genetskih ispitivanja polimorfizama kod pacijenata sa istim tipom karcinoma, značajno otežava adekvatno poređenje rezultata. Heterogenost rezultata je još veća ako se u komparativnu analizu uključe i studije kod pacijenata sa karcinomima drugih lokalizacija. Na isti način, različite metode genotipizacije primenjene u asocijativnim studijama mogu da doprinesu diskrepanci u dobijenim rezultatima istraživanja. Razlike koje postoje u selekciji pacijenata, godinama starosti, polu, rasi, uticaju spoljnjih faktora sredine i veličini ispitivanog uzorka su takođe faktori koji verovatno u značajnoj meri doprinose kontradiktornim rezultatima genetskih studija.

Poznato je da je pušenje jedan od najvažnijih faktora rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. I u našem istraživanju je pokazana značajna povezanost između pušenja i nastanka urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Naime, u našoj studiji pušači imaju oko 4 puta veći rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača koji su pokazali postojanje 2-4 puta većeg rizika kod pušača (Rink M i sar, 2015; Frits HM van Osch i sar, 2016; Freedman ND i sar, 2011).

Obzirom da je pušenje značajan izvor slobodnih radikala, analizirali smo kombinovani efekat pušenja i polimorfni varijanti *GPX1* i *SOD2*. Naši rezultati su pokazali da pušači nosioci barem jednog varijantnog *SOD2-Val* alela (*SOD2 Val16Ala + Val16Val* genotip) imaju 7,5 puta veći rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Do sada samo jedna istraživačka grupa ispitala je uticaj polimorfizma gena *SOD2* sa rizikom za nastanak karcinoma mokraćne bešike kod pušača (Hung R i sar, 2004). Njihovi rezultati su pokazali značajno povećanje rizika na oko 7 puta kod osoba nosioca varijantnog *SOD2-Val* alela udruženo sa pušenjem, što je u skladu sa našim rezultatima. Slični rezultati su dobijeni i u prethodno objavljenim studijama kod pacijenata sa karcinomima drugih



lokalizacija. Naime, Aynali i sar, su pokazali postojanje povećanog rizika u nastanku karcinoma larinksa u populaciji pušača koji su imali *SOD2 Val16Val* genotip, ali ne i kod pušača sa polimorfnim varijantama *GPX1* (Aynali G i sar, 2013). Postojanje značajno većeg rizika kod pušača nosioca jednog ili oba varijantna *SOD2-Val* alela potvrđeno je i u studiji kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom usne duplje (Liu Y i sar, 2014).

Dobijeni rezultati u našoj studiji potvrđuju značaj *SOD2* u enzimskoj neutralizaciji kiseoničnih slobodnih radikala i smanjenju oksidativnog stresa uzrokovanog pušenjem. Smanjena aktivnost enzima koja nastaje kao posledica funkcionalnog polimorfizma *SOD2* dovodi do povećanja količine kiseoničnih slobodnih radikala usled ograničenog kapaciteta enzimske konverzije u vodonik peroksid, čime je oksidativni balans ćelije značajno narušen. Povišena količina kiseoničnih slobodnih radikala ima protumorogeno dejstvo i može da dovode do nastanka genetske nestabilnosti u ćeliji, koja usled relativnog smanjenja količine vodonik peroksida zbog smanjene aktivnosti *SOD2* gubi stimulus za apoptozu, može da preživi i nastavi sa kaskadnim putem transformacije u karcinomsku ćeliju. Tumačenje naših rezultata je skladu sa dokazima o postojanju dvojake uloge *SOD2* u nastanku i razvoju karcinoma (Kim YS i sar, 2017; Hempel N i sar, 2011).

Profesionalna izloženost hemijskim agensima takođe ima važnu ulogu u nastanku karcinoma mokraćne bešike. Rezultati naše studije pokazuju da su profesionalno izložene osobe u 2 puta većem riziku za nastanak karcinoma mokraćne bešike, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Kiriluk KJ i sar, 2012; Cumberbatch MGK i sar, 2015). Zbog malog broja pacijenata u ispitivanom uzorku koji su profesionalno bili izloženi hemijskim agensima, nismo analizirali efekat polimorfizma gena za *GPX1* i *SOD2* udruženo sa ekspozicijom profesionalnim karcinogenima.

Jedan segment našeg istraživanja sastojao se u ispitivanju povezanosti genetskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Dobijeni rezultati su pokazali da je genetski polimorfizam *GPX1* bio značajno povezan sa stadijumom bolesti i patohistološkim gradusom tumora. Naime, genetski polimorfne varijante *GPX1 Pro198Leu* i *GPX1 Leu198Leu*, koje u funkcionalnom smislu imaju manju aktivnost

u poređenju sa *GPX1 Pro198Pro* genotipom, bile su značajno češće detektovane kod pacijenata sa nižim stadijumom bolesti i nižim gradusom tumora. Koliko nam je poznato, u našem istraživanju po prvi put u literaturi, ispitivana je povezanost genetskog polimorfizma *SOD2* sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike. Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali da postoji značajna povezanost genetskog polimorfizma *SOD2* sa stadijumom bolesti i gradusom tumora. Samo dva istraživanja su do sada sprovedena kod pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike u cilju ispitivanja povezanosti genetskog polimorfizma *GPX1* sa stadijumom bolesti i patohistološkim gradusom tumora, a rezultati odstupaju od onih dobijenih našoj studiji. Naime, etnička studija sprovedena na Marokanskoj populaciji (Hadami K i sar, 2016) pokazala je da polimorfizam *GPX1 Pro198Leu* nije bio povezan niti sa stadijumom bolesti, niti sa gradusom tumora. Nasuprot tome, studija sprovedena u Turskoj, pokazala je da *GPX1 Leu/Leu* genotip je značajno češće bio udružen sa višim stadijumom bolesti (Kucukgergin C i sar, 2012). Međutim, naši rezultati su saglasni sa rezultatima dobijenim u istraživanju sprovedenom kod pacijentkinja sa karcinomom dojke, koji su pokazali postojanje protektivnog efekta *GPX1-Leu* alela, odnosno povezanost *GPX1-Leu* alela sa nižim stadijumom bolesti i nižim gradusom tumora (Habyarimana T i sar, 2018).

Tumačenje naših rezultata je u skladu sa dokazima o protumorogenom delovanju *GPX1* u procesima diferencijacije, proliferacije i angiogeneze (Sullivan LB i Chandel NS, 2014). Naime, pokazano je da povećana aktivnost *GPX1* u karcinomskoj ćeliji dovodi do smanjenja intracelularnog nivoa vodonik peroksida čime se gubi stimulus u regulacionim putevima za apoptozu. Subletalna koncentracija vodonik peroksida na taj način omogućava preživljavanje transformisane ćelije. Uz istovremeno aktiviranje molekularnih signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji diferencijacije, omogućeno je dovoljno dugo vreme da ćelija pretrpi kaskadu promena koje vode ka progresiji stadijuma bolesti i progresiji gradusa tumora. Povezanost genetskog polimorfizma *GPX1* sa stadijumom bolesti i patohistološkim gradusom tumora u našem istraživanju ukazuje da bi *GPX1* mogao biti povezan sa progresijom bolesti. Sa druge strane, pri tumačenju rezultata bi trebalo imati u vidu i druge molekularno genetske faktore i

mehanizme koji su uključeni u kontekst fenotipske ekspresije urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike.

Pregledom literature, do sada nema objavljenih podataka u vezi sa ispitivanjem povezanosti genetskog polimorfizma *SOD2* sa stadijumom bolesti i patohistološkim gradusom urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike.

Trenutno, još uvek ne postoje validirani dijagnostički testovi kojima se precizno može predvideti terapijski odgovor na primenjenu hemioterapiju kod pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike. Uprkos dobrom poznavanju molekularnih mehanizama na koji način platinum–DNK adukti deluju na ćelijske procese, razlozi za postojanje značajnih varijacija u individualnom terapijskom odgovoru i neželjenim efektima hemioterapije još uvek nisu do kraja razjašnjeni (Wang D i Lippard SJ, 2005; Deavall DG i sar, 2012). Poznato je da se oksidativni status karcinomske ćelije značajno razlikuje u poređenju sa normalnom ćelijom. Zbog mnogobrojnih metaboličkih promena i aberacija u signalnim putevima, ćelije karcinoma imaju povišene vrednosti slobodnih radikala u odnosu na normalne. Istovremeno, u cilju održavanja oksidativnog balansa, potvrđeno je da postoji i povećana ekspresija antioksidativnih enzima u ćelijama karcinoma u poređenju sa normalnim ćelijama (Marullo R i sar, 2013).

Premda slobodni radikali mogu da deluju u visokim koncentracijama kao važni intracelularni karcinogeni, formiranje slobodnih radikala je neophodno u pojačanju citotoksičnog delovanja mnogih hemioterapijskih lekova i zračne terapije (D'Andrea G, 2005; Prasad S i sar, 2017; Fong CW, 2016). Povišena vrednost slobodnih radikala u ćelijama karcinoma može imati samoograničavajući efekat dovodeći do pojave ireverzibilnih oštećenja i posledične ćelijske smrti, ali jedino ako istovremeno u ćeliji ne postoji i povišena antioksidativna aktivnost. Marullo i sar. pokazali su da povišena razgradnja slobodnih radikala u mitohondrijama smanjuje senzitivnost ćelija karcinoma na cisplatin, tako da je potrebna tri puta veća doza cisplatina da ubije isti procenat ćelija koje imaju povećanu ekspresiju antioksidativnih enzima u odnosu na kontrole (Marullo R i sar, 2013). Ovo je razlog zbog čega istraživači i dalje nastavljaju da ispituju genetsku pozadinu u glavnim antioksidativnim enzimima kod pacijenata sa karcinomom. Međutim, rezultati studija koje su ispitivale nivo ekspresije

antioksidativnih enzima *GPX1* i *SOD2* u ćelijama karcinoma su kontradiktorni (Rayman MP, 2009; Schumacker PT, 2015; Liou GY i Storz P, 2010).

Cisplatin je antineoplastični lek koji se koristi u hemioterapijskim protokolima lečenja uznapredovalog karcinoma mokraćne bešike. Pored citotoksičnog efekta koji je rezultat ireparabilnih oštećenja DNK, cisplatin intracelularno povećava oksidativni stres koji se smatra najčešćim razlogom nastanka neželjenih efekata terapije, odnosno pojave toksičnosti leka. Međutim, doprinos oksidativnog stresa indukovano cisplatinom u citotoksičnom efektu na ćelije karcinoma još uvek nije potpuno razjašnjen (Dasari S i Tchounwou PB, 2014; Prasad S i sar, 2017). Pretpostavka je da interindividualne razlike u terapijskom odgovoru na hemioterapiju mogu biti posledica genetskih varijacija u enzimima koji su uključeni u puteve antioksidativne zaštite. Rezultat toga je veliki broj studija sa kontradiktornim rezultatima dobijenim ispitivanjem veze između lekom indukovano oksidativno stresa i efikasnosti lečenja kod pacijenata koji su primali cisplatin baziranu ili drugu vrstu hemioterapije.

Koliko nam je poznato, po prvi put u literaturi, u našoj studiji smo sproveli istraživanje efekta genetskog polimorfizma *GPX1* (*rs1050450*) i *SOD2* (*rs4880*) kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju. Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali da postoji značajan uticaj genetskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* na ukupno preživljavane kod ovih pacijenata. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka, do sada ni jedna studija nije ispitivala potencijalnu vezu između genetskog polimorfizma *GPX1* i *SOD2* kod pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju. Međutim, rezultati slični našim su dobijeni u prethodno objavljenim studijama kod pacijenata sa karcinomima drugih lokalizacija lečenih hemioterapijom. Naime, istraživačka grupa iz Danske pokazala je da *SOD2* polimorfizam nije bio povezan sa rekurencijom karcinoma dojke kod pacijentkinja koje su primale adjuvantnu ciklofosamid baziranu hemioterapiju (Cronin-Fenton DP i sar, 2014). Slične rezultate su dobili Geng i sar., koji su istovremeno ispitivali genetski polimorfizam za devet različitih antioksidativnih enzima kod pacijenata sa metastatskim karcinomom želuca koji su primali hemioterapiju. Njihovi rezultati su pokazali da

genetski polimorfizam *SOD2* nema prognostički značaj u proceni nastanka progresije bolesti, niti u proceni ukupnog preživljavanja (Geng R i sar, 2014). Sa druge strane, Yao i sar. su u svom istraživanju pokazali da postojanje *SOD2-Ala* alela u genotipu, koje funkcionalno za posledicu ima povećanu enzimsku aktivnost *SOD2*, je bilo udruženo sa manjom učestalošću pojave neželjenih efekata u toku terapije, ali istovremeno i sa bržom progresijom bolesti posle primenjene adjuvantne hemioterapije kod pacijentkinja sa karcinomom dojke (Yao S i sar, 2010). Pregledom literature, postoji samo mali broj studija u kojima je ispitivan prognostički značaj genetskog polimorfizma *GPX1* kod pacijenata koji su primali hemioterapiju. U istraživanju sprovedenom kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom glave i vrata koji su lečeni hemio-radioterapijom, nije pokazano da postoji značajan uticaj genetskog polimorfizma *GPX1* na terapijski odgovor, niti na ukupno preživljavanje (Dequanter D i sar, 2017). Sa druge strane, u studijama koje su ispitivale potencijalnu ulogu različitih glutation-povezanih enzima kod pacijenata sa ne-sitnoćelijskim karcinomom pluća, karcinomom ovarijuma, kolorektalnim, endometrijalnim i urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike saopšteni su izuzetno kontraditorni rezultati (Xiao HL i sar, 2016; Pereira D i sar, 2016; Funke S i sar, 2010; Schneider J i sar, 1994; Djukic T i sar, 2013).

Urotelijalni karcinom mokraćne bešike je multifaktorijalna bolest. Kompleksne interakcije između genetskih i faktora spoljne sredine, smatra se da imaju uticaj u nastanku i progresiji bolesti, kao i odgovoru na primenjenu terapiju. Stoga, mala je verovatnoća da jedan molekularni marker može u potpunosti sam za sebe da objasni u potpunosti kompleksan mehanizam povezan sa individualnim rizikom za nastanak i progresiju bolesti. Istraživanja usmerena u pravcu ispitivanja međusobnih interakcija između većeg broja različitih genetskih polimorfizama, gensko-genskih i interakcija gena sa faktorima spoljašnje sredine će nam u budućnosti pojasniti zamršenu sliku kompleksnih molekularnih dešavanja koja postoje kod pacijenata sa urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na osnovu prikazanih rezultata i diskusije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Pušenje predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

- pušači imaju oko 4 veći rizik da dobiju urotelijalni karcinom mokraćne bešike u poređenju sa nepušačima

2. Profesionalna izloženost predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

- profesionalno izložene osobe imaju oko 2 puta veći rizik da dobiju urotelijalni karcinom mokraćne bešike u poređenju sa neizloženim osobama

3. Polimorfizam gena za *GPX1* ne predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

4. Polimorfizam gena za *SOD2* predstavlja nezavisan faktor rizika za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

- osobe koje imaju jedan ili oba varijantna *SOD2-Val* alela imaju oko 1,5 puta veću šansu da dobiju urotelijalni karcinom mokraćne bešike u poređenju sa osobama koje imaju referentni *SOD2 Ala16Ala* genotip

5. Postoji udruženi efekat pušenja i genotipa *SOD2* na rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike

- pušači sa jednim ili oba varijantna *SOD2-Val* alela imaju 7,5 veću šansu da dobiju urotelijalni karcinom mokraćne bešike u poređenju sa osobama koje su nepušači i nosioci referentnog *SOD2 Ala16Ala* genotipa

6. Polimorfizam gena za *GPX1* je povezan sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike
  - postojanje jednog ili oba varijantna *GPX1-Leu* alela udruženo je sa nižim stadijumom bolesti i nižim gradusom tumora, u poređenju sa referentnim *GPX1 Pro200Pro* genotipom
7. Polimorfizam gena za *SOD2* nije povezan sa fenotipskim karakteristikama urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike
8. Polimorfizam gena za *GPX1* i *SOD2* ne utiče na ukupno preživljavanje pacijenata sa metastatskim urotelijalnim karcinomom mokraćne bešike koji su primali cisplatin baziranu hemioterapiju
9. Polimorfizam antioksidantnih enzima *SOD2* i *GPX1* modulira rizik za nastanak urotelijalnog karcinoma mokraćne bešike i utiče na fenotipske osobine ovog tumora



## 7. REFERENCE

Agudo A, Bonet C, Travier N, et al. Impact of cigarette smoking on cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *J Clin Oncol* 2012;30:4550-7

Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017;71(1):96-108

Aynali G, Doğan M, Sütcü R, Yüksel O, Yarıktaş M, Unal F, Yasan H, Ceyhan B, Tüz M. Polymorphic variants of MnSODVal16Ala, CAT262C < T and GPx1Pro198Leu genotypes and the risk of laryngeal cancer in a smoking population. *J Laryngol Otol* 2013;127(10):997-1000

Babjuk M, Burger M, Compérat E, Kaasinen E, Palou J, Rouprêt M, van Rhijn BWG, Shariat S, Sylvester R, Zigeuner R. EAU Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS) 2015. <https://uroweb.org/guideline/non-muscle-invasive-bladder-cancer/>

Bazhin AV, Philippov PP, Karakhanova S. Reactive Oxygen Species in Cancer Biology and Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:4197815

Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013;63(2):234-41

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507(7492):315-22

Cao M, Mu X, Jiang C, Yang G, Chen H, Xue W. Single-nucleotide polymorphisms of GPX1 and MnSOD and susceptibility to bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2014;35(1):759-64

Case AJ. On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. *Antioxidants* 2017;6(4):82

Casey RG, Catto JW, Cheng L, Cookson MS, Herr H, Shariat S, Witjes JA, Black PC. Diagnosis and management of urothelial carcinoma in situ of the lower urinary tract: a systematic review. *Eur Urol* 2015;67(5):876-88

Chang JS, Lara PN, Pan C-X. Progress in Personalizing Chemotherapy for Bladder Cancer. *Adv Urol* 2012;2012:364919

- Chen CH, Shun CT, Huang KH, Huang CY, Tsai YC, Yu HJ, Pu YS. Stopping smoking might reduce tumour recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *BJU Int* 2007;100:281
- Chen J, Cao Q, Qin C, Shao P, Wu Y, Wang M, Zhang Z, Yin C. GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: evidence from meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(10):1553-61
- Chen Y, Zhang H, Zhou HJ, Ji W, Min W. Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression. Minelli A, ed. *Cancers (Basel)*. 2016; 8(4):40
- Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CP, McConkey DJ. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25(2):152-65
- Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Wild CP. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1827-39
- Cronin-Fenton DP, Christensen M, Lash TL, Ahern TP, Pedersen L, Garne JP, Ewertz M, Autrup H, Sørensen HT, Hamilton-Dutoit S. Manganese superoxide dismutase and breast cancer recurrence: a Danish clinical registry-based case-control study, and a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(1):e87450
- Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La VC. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: A comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks. *Eur Urol* 2016;70:458-466
- Cumberbatch MGK, Cox A, Teare D, Catto JWF. Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2015;1(9):1282-90
- Czene K, Tiikkaja S, Hemminki K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. *Int J Cancer* 2003;105:108
- D'Andrea G. Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided. *CA Cancer J Clin* 2005;55:319-21
- Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, Kim WY. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(8):3110-5

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* 2014;740(5):364-78

Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *J Toxicol* 2012;(2012):645460

Dequanter D, Dok R, Koolen L, Vander Poorten V, Nuyts S. Prognostic Significance of Glutathione Peroxidase Levels (GPx1) in Head and Neck Cancers. *Front Oncol* 2017;7

Djukic TI, Savic-Radojevic AR, Pekmezovic TD, Matic MG, Pljesa-Ercegovac MS, Coric VM, Radic TM, Suvakov SR, Krivic BN, Dragicevic DP, Simic TP. Glutathione S-Transferase T1, O1 and O2 Polymorphisms Are Associated with Survival in Muscle Invasive Bladder Cancer Patients. *PLoS One* 2013;8(9):e74724

Dogliotti L, Cartenì G, Siena S, Bertetto O, Martoni A, Bono A, Amadori D, Onat H, Marini L. Gemcitabine plus cisplatin versus gemcitabine plus carboplatin as first-line chemotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the urothelium: results of a randomized phase 2 trial. *Eur Urol* 2007;52(1):134-41

Donin NM, Lenis AT, Holden S, Drakaki A, Pantuck A, Belldegrün A, Chamie K. Immunotherapy in the treatment of urothelial carcinoma. *J Urol* 2017;197(1):14-22

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IAE (2004) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France: IARC Press. p.89–158.

Edge, S.B., American Joint Committee on Cancer (Eds.), 2010. AJCC cancer staging manual, 7th ed. Springer, New York.

Egea J, Fabregat I, Frapart YM, et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology* 2017;13:94-162

Ehdaie B, Sylvester R, Herr HW. Maintenance bacillus Calmette-Guerin treatment of non-muscle-invasive bladder cancer: A critical evaluation of the evidence. *Eur Urol* 2013;64(4):579–85

Erol B, Ulus I, Danacıoğlu YO, Çaşkurlu T. Bladder Cancer and Genetic Polymorphisms : A Review. *EMJ Urol* 2015;3(1):20-5

Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, Breinl E, Merseburger AS, Shariat SF. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J Urol* 2011;29: 457–63

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-86
- Fong CW. Platinum based radiochemotherapies: Free radical mechanisms and radiotherapy sensitizers. *Free Radical Biology and Medicine* 2016;99:99-109
- Fortuny J, Kogevinas M, Zens MS, Schned A, Andrew AS, Heaney J, Kelsey KT and Karagas MR. Analgesic and anti-inflammatory drug use and risk of bladder cancer: a population based case control study. *BMC Urol* 2007;7:13
- Freedman ND, Abnet CC, Caporaso NE, Fraumeni JF Jr, Murphy G, Hartge P, Hollenbeck AR, Park Y, Shiels MS, Silverman DT. Impact of changing US cigarette smoking patterns on incident cancer: risks of 20 smoking-related cancers among the women and men of the NIH-AARP cohort. *Int J Epidemiol* 2016;45:846
- Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011;306:737-45
- Frits HM van Osch, Sylvia HJ Jochems, Frederik-Jan van Schooten, Richard T Bryan, Maurice P Zeegers; Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies, *Int J Epidemiol* 2016; 45(3):857-70
- Funke S, Timofeeva M, Risch A, Hoffmeister M, Stegmaier C, Seiler CM, Brenner H, Chang-Claude J. Genetic polymorphisms in GST genes and survival of colorectal cancer patients treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2010;11(1):33-41
- Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med* 2017;104:144-164
- Galsky MD, Hahn NM, Rosenberg J, Sonpavde G, Hutson T, Oh WK, Dreicer R, Vogelzang N, Sternberg C, Bajorin DF, Bellmunt J. A consensus definition of patients with metastatic urothelial carcinoma who are unfit for cisplatin-based chemotherapy. *Lancet Oncol* 2011;12(3):211-4
- Garg T, Pinheiro LC, Atoria CL, Donat SM, Weissman JS, Herr HW, Elkin EB. Gender disparities in hematuria evaluation and bladder cancer diagnosis: a population based analysis. *J Urol* 2014;192:1072-7

Geng R, Chen Z, Zhao X, Qiu L, Liu X, Liu R, Guo W, He G, Li J and Zhu X. Oxidative stress-related genetic polymorphisms are associated with the prognosis of metastatic gastric cancer patients treated with epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil combination chemotherapy. *PLoS One* 2014;9(12):e116027

Genkinger JM, De Vivo I, Stampfer MJ, Giovannucci E, Michaud DS. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and risk of bladder cancer in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 2007; 120:2221

Grosse Y, Loomis D, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Baan R, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of some drugs and herbal products. *Lancet Oncol* 2013;14: 807–8

Habyarimana T, Bakri Y, Mugenzi P, Mazarati JB, Attaleb M, El Mzibri M. Association between glutathione peroxidase 1 codon 198 variant and the occurrence of breast cancer in Rwanda. *Mol Genet Genomic Med* 2018; 1-8

Hadami K, Ameziane El Hassani R, Ameer A, Dakka N, Abbar M, Al Bouzidi A, Attaleb M, El Mzibri M. Association between GPX1 Pro189Leu polymorphism and the occurrence of bladder cancer in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016;62(14):38-43

Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A. Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int J Cancer* 2002;101:1

Hecht SS. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Arch Surg* 2006;391:603

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

Horstmann M, Witthuhn R, Falk M, Stenzl A. Gender-specific differences in bladder cancer: a retrospective analysis. *Gend Med* 2008; 5:385–94

Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, Porru S. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 2004;25(6):973-8

Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C, Sato K, Nishiyama H, Ogawa O, Kato T. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol* 2004;172(2):728-32

Jablonska E, Gromadzinska J, Reszka E, Wasowicz W, Sobala W, Szeszenia-Dabrowska N, Boffetta P. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism,

GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. *European journal of nutrition*. 2009;48(6):383-6

Jons TD, Wang M, Eble JN, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Zhang S, Amy Cocco A and Cheng L. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2005;11:6512

Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström PU, Choi W, Guo CC, Lotan Y, Kassouf W. Bladder cancer. *Lancet* 2016;388(10061):2796-810

Kamat AM, Sylvester RJ, Böhle A, Palou J, Lamm DL, Brausi M, Soloway M, Persad R, Buckley R, Colombel M, Witjes JA. Definitions, end points, and clinical trial designs for non-muscle-invasive bladder cancer: recommendations from the International Bladder Cancer Group. *J Clin Oncol* 2016;34(16):1935-44

Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Peters U, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(8):1581-6

Kang SW. Superoxide dismutase 2 gene and cancer risk: evidence from an updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(9):14647-55

Kausch I, Sommerauer M, Montorsi F, Stenzl A, Jacqmin D, Jichlinski P, Jocham D, Ziegler A, Vonthein R. Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: A systematic review and cumulative analysis of prospective studies. *Eur Urol* 2010;57(4):595-606

Kim J, Akbani R, Creighton CJ, Lerner SP, Weinstein JN, Getz G, Kwiatkowski DJ. Invasive bladder cancer: genomic insights and therapeutic promise. *Clin Cancer Res* 2015;21(20):4514-24

Kim YS, Gupta Vallur P, Phaëton R, Mythreye K, Hempel N. Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer. *Antioxidants* 2017;6(4):86

Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med* 2004;36(6):718-44

Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol Oncol* 2012;30:199-211

Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015;15(1):25-41

- Kucukgergin C, Sanli O, Amasyalı AS, Tefik T, Seckin S. Genetic variants of MnSOD and GPX1 and susceptibility to bladder cancer in a Turkish population. *Med Oncol* 2012;29(3):1928-34
- Lai MN, Wang SM, Chen PC, Chen YY, Wang JD. Population-based case-control study of Chinese herbal products containing aristolochic acid and urinary tract cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:179
- Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, Witjes JA. Economic burden of bladder cancer across the European Union. *Eur Urol* 2016; 69: 438-447
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, J Cartwright, Jr, L Dionne, N Lu, S Huang, and M M Matzuk. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(18):9782-7
- Leibovici D, Grossman HB, Dinney CP, Millikan RE, Lerner S, Wang Y, Gu J, Dong Q, Wu X. Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol* 2005;23:5746
- Leow JJ, Martin-Doyle W, Rajagopal PS, Patel CG, Anderson EM, Rothman AT, Cote RJ, Urun Y, Chang SL, Choueiri TK, Bellmunt J. Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur Urol* 2014;66(1):42-54
- Lerner SP. Bladder cancer: ASCO endorses EAU muscle-invasive bladder cancer guidelines. *Nat Rev Urol* 2016;13(8):440-1
- Li N, Huang HQ, Zhang GS. Association between SOD2 C47T polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumor Biol* 2014;35(2):955-9
- Li R, Choi W, Ferguson 3rd JE, Metcalfe MJ, Kamat AM. New discoveries in the molecular landscape of bladder cancer. *F1000Research* 2016;5:2875
- Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research* 2010;44(5):479-96
- Liu Y, Zha L, Li B, Zhang L, Yu T, Li L. Correlation between superoxide dismutase 1 and 2 polymorphisms and susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2014;7(1):171-8
- Loo, R. K. Lieberman SF, Slezak JM, Landa HM, Mariani AJ, Nicolaisen G, Aspera AM, Jacobsen SJ. Stratifying risk of urinary tract malignant tumors in patients with asymptomatic microscopic hematuria. *Mayo Clin Proc* 2013;88:129-38

Lu Y, Zhang XL, Xie L, Li TJ, He Y, Peng QL, Deng Y, Wang J, Qin X, Li S. Lack of association between CYP1A1 polymorphisms and risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(9):4071-7

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

Marcos-Gragera R, Mallone S, Kiemeny LA, Vilardell L, Malats N, Allory Y, Sant M; EURO CARE-5 Working Group. Urinary tract cancer survival in Europe 1999-2007: Results of the population-based study EURO CARE-5. *Eur J Cancer* 2015

Martin-Doyle W, Leow JJ, Orsola A, Chang SL, Bellmunt J. Improving selection criteria for early cystectomy in high-grade T1 bladder cancer: a meta-analysis of 15,215 patients. *J Clin Oncol* 2015;33:643-50

Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, Doetsch PW. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* 2013;8(11):e81162

Mbeutcha A, Lucca I, Mathieu R, Lotan Y, Shariat, SF. Current status of urinary biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2016;43(1):47-62

Men T, Zhang X, Yang J, Shen B, Li X, Chen D, Wang J. The rs1050450 polymorphism of GPX1 is associated with the risk of bladder but not prostate cancer: evidence from a meta-analysis. *Tumour Biol* 2014;35(1):269-75

Messer JC, Shariat SF, Dinney CP, et al. Female gender is associated with a worse survival after radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder: a competing risk analysis. *Urology* 2014;83:863-7

Mohamed NE, Diefenbach MA, Goltz HH, Lee CT, Latini D, Kowalkowski M, Philips C, Hassan W, Hall SJ. Muscle invasive bladder cancer: from diagnosis to survivorship. *Adv Urol* 2012;2012:142135

Mohan M, Jagannathan N. Oral Field Cancerization: An Update on Current Concepts. *Oncology Reviews* 2014;8(1):244

Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1973.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41533/1/9241760109\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41533/1/9241760109_eng.pdf)

Nahon P, Sutton A, Rufat P, Ziol M, Akouche H, Laguillier C, Charnaux N, Ganne-Carrié N, Grando-Lemaire V, N'Kontchou G, Trinchet JC, Gattegno L, Pessayre D, Beaugrand M. Myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 polymorphisms



- comodulate the risk of hepatocellular carcinoma and death in alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 2009;50(5):1484-93
- Nogueira V, Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2013;19(16):4309-14
- Palazzolo DL. Electronic Cigarettes and Vaping: A New Challenge in Clinical Medicine and Public Health. A Literature Review. *Frontiers in Public Health* 2013;1:56
- Pan CC, Chang YH, Chen KK, Yu HJ, Sun CH, Ho DM. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urothelial tumors of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 1515 cases. *Am J Clin Pathol* 2010;133:788-95
- Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis* 2016;7(6):e2253
- Paz-y-Miño C, Muñoz MJ, López-Cortés A, Cabrera A, Palacios A, Castro B, Paz-y-Miño N, Sánchez ME. Frequency of polymorphisms pro198leu in GPX-1 gene and ile58thr in MnSOD gene in the altitude Ecuadorian population with bladder cancer. *Oncol Res* 2010;18(8):395-400
- Pelucchi C, La Vecchia C. Alcohol, coffee, and bladder cancer risk: a review of epidemiological studies. *Eur J Cancer Prev* 2009;18(1):62-8
- Pereira D, Assis J, Gomes M, Nogueira A, Medeiros R. Improvement of a predictive model in ovarian cancer patients submitted to platinum-based chemotherapy: implications of a GST activity profile. *Eur J Clin Pharmacol* 2016;72(5):545-53
- Ploussard G, Daneshmand S, Efstathiou JA, Herr HW, James ND, Rödel CM, Shariat SF, Shipley WU, Sternberg CN, Thalmann GN, Kassouf W. Critical analysis of bladder sparing with trimodal therapy in muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. *Eur Urol* 2014;66(1):120-37
- Power NE, Izawa J. Comparison of guidelines on non-muscle invasive bladder cancer (EAU, CUA, AUA, NCCN, NICE). *Bl Cancer* 2016; 2(1):27-36
- Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer : Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* 2017;387:95-105
- Purdue MP, Hutchings SJ, Rushton L, Silverman DT. The proportion of cancer attributable to occupational exposures. *Ann Epidemiol* 2015;25: 188-92

- Rashid K, Sinha K, Sil PC. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem Toxicol* 2013;62:584-600
- Rayman MP. Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790(11):1533-40
- Reczek CR, and Chandel NS. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology* 2017;1(1):79-98
- 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
- Rink M, Crivelli JJ, Shariat SF, Chun FK, Messing EM, Soloway MS. Smoking and Bladder Cancer: A Systematic Review of Risk and Outcomes. *Eur Urol Focus* 2015;1(1):17-27
- Rixe O, Fojo T. Is Cell Death a Critical End Point for Anticancer Therapies or Is Cytostasis Sufficient? *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7280-7
- Robbins D, Zhao Y. Manganese Superoxide Dismutase in Cancer Prevention. *Antioxidants & Redox Signaling* 2014;20(10):1628-1645
- Ros MM, HB Bas Bueno-de-Mesquita, Buchner FL, Aben KK, Kampman E, Egevad L, Overvad K, Tjonneland A, Roswall N, Clavel-Chapelon F, Kaaks R, Chang-Claude J, et al. Fluid intake and the risk of urothelial cell carcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2011;128:2695-708
- Schneider J, Efferth T, Rodriguez-Escudero FJ, Volm M. Intrinsic overexpression of two different mechanisms of resistance to chemotherapy (P-glycoprotein and GST-pi) in human endometrial carcinoma. *Chemotherapy* 1994;40(4):265-71
- Schumacker PT. Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. *Cancer Cell* 2015;27(2):156-7
- Shah SK, Lui PD, Baldwin DD, Ruckle HC. Urothelial carcinoma after external beam radiation therapy for prostate cancer. *J Urol* 2006;175:2063
- Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002;47(11):561-6
- Shijun Li, Tao Yan, Ji-Qin Yang, Terry D. Oberley, and Larry W. Oberley. The Role of Cellular Glutathione Peroxidase Redox Regulation in the Suppression of Tumor Cell Growth by Manganese Superoxide Dismutase. *Cancer Res* 2000;60:3927-39

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66(1):7-30

Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* 2017;11:613-19

Silverman DT, Alguacil J, Rothman N, Real FX, Garcia-Closas M, Cantor KP, Malats N, Tardon A, Serra C, Garcia-Closas R, Carrato A, Lloreta J, Samanic C, Dosemeci M, Kogevinas M. Does increased urination frequency protect against bladder cancer? *Int J Cancer* 2008;123:1644

Soloway MS. It is time to abandon the “superficial” in bladder cancer. *Eur Urol* 2007;52 (6):1564-5

Sonpavde G, Galsky MD, Latini D, Chen GJ. Cisplatin-ineligible and chemotherapy-ineligible patients should be the focus of new drug development in patients with advanced bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2014;12(2):71-3

Sonpavde G, Watson D, Tourtellott M, Cowey CL, Hellerstedt B, Hutson TE, Zhan F, Vogelzang NJ. Administration of cisplatin-based chemotherapy for advanced urothelial carcinoma in the community. *Clin Genitourin Cancer* 2012;10(1):1-5

Stein, J. P, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin. Oncol* 2001;19;666-75

Steinmaus CM, Ferreccio C, Romo JA, Yuan Y, Cortes S, Marshall G, Moore LE, Balmes JR, Liaw J, Golden T, Smith AH. Drinking water arsenic in northern Chile: high cancer risks 40 years after exposure cessation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22:623-30

Sternberg CN, Bellmunt J, Sonpavde G, Siefker-Radtke AO, Stadler WM, Bajorin DF, Dreicer R, George DJ, Milowsky MI, Theodorescu D, Vaughn DJ, Galsky MD, Soloway MS, Quinn DI; International Consultation on Urologic Disease-European Association of Urology Consultation on Bladder Cancer 2012. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: chemotherapy for urothelial carcinoma – neoadjuvant and adjuvant settings. *Eur Urol* 2013;63: 58-66

Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism* 2014;2:17

Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, Descatoire V, Cazanave S, Pessayre D, Degoul F. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both

mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(5):311-9

Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmäng S, Lee R, Kim SP, Stenzl A, Lotan Y. The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol* 2014;66:253-62

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49(3):466-77

Tanaka T, Miyazawa K, Tsukamoto T, Kuno T, Suzuki K. Pathobiology and chemoprevention of bladder cancer. *J Oncol* 2011;2011:528353.

Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:972913

Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, Holowaty EJ, Van Leeuwen FE, Lynch CF, Hagenbeek A, Stovall M, Banks PM, Adami J, et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:524

Tsuji JS, Alexander DD, Perez V, Mink PJ. Arsenic exposure and bladder cancer: quantitative assessment of studies in human populations to detect risks at low doses. *Toxicology* 2014;317:17-30

van den Bosch S, Witjes JA. Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: A systematic review. *Eur Urol* 2011;60(3):493-500

Villanueva CM, Fernández F, Malats N, Grimalt JO, Kogevinas M.. Meta-analysis of studies on individual consumption of chlorinated drinking water and bladder cancer. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:166

Vineis P, Pirastu R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* 1997; 8:346

Von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM, Conte PF. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 2000;18(17):3068-77

von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(21):4602-8

Wang C, Zhang R, Chen N, Yang L, Wang Y, Sun Y, Huang L, Zhu M, Ji Y, Li W. Association between glutathione peroxidase-1 (GPX1) Rs1050450 polymorphisms and cancer risk. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(9):9527-40

Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(4):307-20

Wang S-C, Sung W-W, Kao Y-L, Wang SC, Sung WW, Kao YL, Hsieh TY, Chen WJ, Chen SL and Chang HR. The gender difference and mortality-to-incidence ratio relate to health care disparities in bladder cancer: National estimates from 33 countries. *Scientific Reports* 2017;7:4360

Wang S, Wang F, Shi X, Dai J, Peng Y, Guo X, Wang X, Shen H, Hu Z. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009;45(16):2874-81

Witjes JA, Lebrecht T, Compérat EM, Cowan NC, De Santis M, Bruins HM, Hernández V, Espinós EL, Dunn J, Rouanne M, Neuzillet Y, Veskimäe E, van der Heijden AG, Gakis G, Ribal MJ. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur Urol* 2017;71(3):462-75

Wolff I, Brookman-May S, May M. Sex difference in presentation and outcomes of bladder cancer: biological reality or statistical fluke? *Curr Opin Urol* 2015;25:418-26

Wosnitzer, M. S., Hruby, G. W., Murphy, A. M., Barlow, L. J., Cordon-Cardo, C., Mansukhani, M., Petrylak, D. P., Benson, M. C. and McKiernan, J. M. A comparison of the outcomes of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for clinical T2-T4aN0-N2M0 bladder cancer. *Cancer* 2012;118:358-64

Xiao HL, Yang ZT, Han F, Wei HX. Association of glutathione S-transferase (GST) genetic polymorphisms with treatment outcome of cisplatin-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Genet Mol Res* 2016;15(2)

Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol* 2015;33(2):66.e25-31

Yao S, Barlow WE, Albain KS, Choi JY, Zhao H, Livingston RB, Davis W, Rae JM, Yeh IT, Hutchins LF, Ravdin PM, Martino S, Lyss AP, Osborne CK, Abeloff

MD, Hortobagyi GN, Hayes DF, Ambrosone CB. Manganese superoxide dismutase polymorphism, treatment-related toxicity and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2010;124(2):433-9

Yi JF, Li YM, Liu T, He WT, Li X, Zhou WC, Kang SL, ZengXT, Zhang JQ. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2010;16(37):4738-46

Yuh BE, Ruel N, WilsonTG, Vogelzang N, Pal SK. Pooled analysis of clinical outcomes with neoadjuvant cisplatin and gemcitabine chemotherapy for muscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2013;189(5):1682-6

Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Inherited variations in the SOD and GPX gene families and cancer risk. *Free Radic Res* 2012;46(5):581-99

Zaghloul MS. Bladder cancer and schistosomiasis. *J Egypt Natl Canc Inst* 2012;24(4):151-9

## Spisak skraćenica

Ala: Alanin

AP-1: Activator protein 1

ATP: Adenozin trifosfat

BCG: Bacillus Calmette - Guerin

CaG: karboplatin i gemcitabin

CI: Confidence interval

CIS: Carcinoma in situ

cTNM: Klinicka Tumor Nodus Metastaze klasifikacija

CYP1A1: Cytochrome P450 1A1

EAU: European Association of Urology

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR: Epidermal growth factor receptor

EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer

GC: gemcitabin i cisplatin

GFR: Glomerular Filtration Rate

GPX: Glutation peroksidaza

GST: Glutation S-transferaza

HG: High grade

HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1

IARC: International Agency for Research on Cancer

KSR: Kiseonični slobodni radikali

Leu: Leucin

LG: Low grade

MDCT: Multiple detector computed tomography

MIBC: Muscle-invasive bladder cancer

MIR: Mortality-to-incidence ratio

MRI: Magnetic resonance imaging

mRNA: Messenger ribonukleinska kiselina

MVAC: metoreksat, vinblastin, doksorubicin i cisplatin

NF-κB: Nuclear factor NF-κB  
NMIBC: Non-muscle-invasive bladder cancer  
NYHA: New York Heart Association  
OR: Odds ratio  
p53: Tumor protein 53  
PAH: Policiklični aromatični ugljovodonici  
PCR: Polymerase chain reaction  
PD-1: Programmed cell death - 1  
PD-L1: Programmed cell death - ligand 1  
Pro: Prolin  
pTNM: Patoloska Tumor Nodus Metastaze klasifikacija  
PUNLMP: Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential  
RFLP: Restriction fragment length polymorphism  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism  
SOD: Superoksid dismutaza  
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences  
TCC: Transitional cell carcinoma  
TNF: Tumor necrosis factor  
TNM: Tumor Nodus Metastaze klasifikacija  
TURBT: Transurethral resection of Bladder Tumor  
UBC: Urothelial bladder cancer  
UC: Urothelial carcinoma  
UICC: Union International Contre le Cancer  
Val: Valin  
WHO: World Health Organization  
 $\chi^2$ : Hi-kvadrat test



## **BIOGRAFIJA**

Predrag Nikić je rođen 2. Jula 1969 godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 1989 godine i diplomirao 1996 godine sa prosečnom ocenom 9.67 (devet, šezdeset sedam).

Specijalistički ispit iz urologije je položio 2003 godine sa odličnim uspehom. Iste godine dobio je i nagradu iz fonda Dr Miloš Smiljković za najbolji specijalistički ispit te godine iz urologije.

Magistarsku tezu pod nazivom "Učestalost simptoma oboljenja donjeg urinarnog trakta (LUTS) kod muškaraca starih između 50 i 80 godina", odbranio je 2009 godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Zaposlen je kao lekar specijalista urolog u Klinici za Urologiju Kliničkog centra Srbije, u Beogradu od 2000 godine.

U zvanje kliničkog asistenta iz oblasti hirurgija-urologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabran je Jula 2014. U isto zvanje ponovo je izabran u Julu 2017 godine.

U okviru svog stručnog i istraživačkog rada najviše se bavio oblašću urološke onkologije, gde je tri meseca proveo na stručnom usavršavanju u Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, Sjedinjene Američke Države u toku 2010-2011 godine. Kao rezultat kontinuiranog stručnog usavršavanja u oblastima kojima se bavi, u saradnji sa kolegama iz zemlje i inostranstva, značajno je doprineo unapredjenju savremenih algoritama lečenja uroloških karcinoma.

Dr Predrag Nikić je autor i koautor 45 stručno-naučnih radova, od kojih je 5 objavljeno u časopisima sa JCR liste.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani: Predrag Nikić

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

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**"POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION PEROKSIDAZU I  
SUPEROKSID DISMUTAZU SA NASTANKOM I PROGRESIJOM KARCINOMA  
PRELAZNOG EPITELA MOKRAĆNE BEŠIKE"**

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.04.2018

Mirjana Nikić

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Predrag Nikić

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

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

Naslov rada: "**POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION  
PEROKSIDAZU I SUPEROKSID DISMUTAZU SA NASTANKOM I PROGRESIJOM  
KARCINOMA PRELAZNOG EPITELA MOKRAĆNE BEŠIKE**"

Mentor: Prof. dr Dejan Dragičević

Komentor: Doc. dr Marija Matić

Potpisani: Predrag Nikić

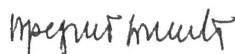
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 27.04.2018



**Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

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

**"POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION PEROKSIDAZU I  
SUPEROKSID DISMUTAZU SA NASTANKOM I PROGRESIJOM KARCINOMA  
PRELAZNOG EPITELA MOKRAĆNE BEŠIKE"**

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

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

U Beogradu, 27. 04. 2018

**Potpis doktoranda**

