



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Ивана Стошић

**ФРЕКВЕНЦА МИКРОНУКЛЕУСА И ПОЛИМОРФИЗАМ GSTT1 И
GSTM1 ГЕНА У ЛИМФОЦИТИМА ПЕРИФЕРНЕ КРВИ
ПАЦИЈЕНТКИЊА У ЗАВИСНОСТИ ОД СТАДИЈУМА
ИНТРАЦЕРВИКАЛНЕ ЛЕЗИЈЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015. година

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I Аутор
Име и презиме: Ивана Стошић
Датум и место рођења: 16. август 1983. године, Гњилане
Садашње запослење: ЈКР "Naissus", Ниш
II Докторска дисертација
Наслов: Фреквенца микронуклеуса и полиморфизам GSTT1 и GSTM1 гена у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од стадијума интрацервикалне лезије
Број страница: 125
Број слика: 10
Број библиографских података: 215
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): 575
Ментор: др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 12.12.2012. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none"> 1. Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Генетика (ментор); 2. Др Слободан Арсенијевић редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Гинекологија и акушерство; 3. Др Гордана Јоксић, научни саветник Института за нуклеарне науке Винча у Београду, ужа научна област: Генетичка токсикологија.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"> 1. Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Генетика (ментор); 2. Др Слободан Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Гинекологија и акушерство; 3. Др Дарко Грујичић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Генетика 4. Др Гордана Јоксић, научни саветник Института за нуклеарне науке Винча у Београду, ужа научна област: Генетичка токсикологија
Датум одбране докторске дисертације:

ЗАХВАЛНИЦА

Посебну захвалност дугујем ментору др Оливери Милошевић Ђорђевић, редовној професорки Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, која је на прави начин била посвећена мом научно-истраживачком раду.

Захваљујем се на пренесеном знању, корисним сугестијама и саветима.

Велика част и задовољство ми је била да сарађујем са доцентом др Дарком Грујичићем са Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, којем дугујем велику захвалност на помоћи током израде ове докторске дисертације.

Захваљујем се и др Гордани Јоксић, научном саветнику Института за нуклеарне науке “Винча”, на драгоценим саветима и сугестијама.

Велику захвалност дугујем др Слободану Арсенијевићу, редовном професору Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и професорки Стојанки Арсић, ванредној професорки Медицинског факултета Универзитета у Нишу.

Такође, захваљујем се медицинском особљу ГАК Крагујевац и ГАК Ниш на љубазности и посвећености током прикупљања узорака, као и свим женама које су учествовале у студији.

Захваљујем се свим својим драгим колегама и колегиницама са Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на великој подршци коју су ми пружили током израде дисертације.

Искрену захвалност изражавам колегиници Душици Миленковић на пријатељству и подршци.

На крају, највећу захвалност дугујем родитељима, сестри и Пеђи на безрезервној подршци и разумевању коју су ми пружили током студирања и изради докторске дисертације.

СПИСАК СЛИКА, ШЕМА, ТАБЕЛА И ГРАФИКА

Слике

- Слика 1 – Микрографије БН ћелија са нуклеоплазматским мостовима
- Слика 2 – Микрографије БН ћелија са нуклеусним пупољцима: а) БН ћелија са једним НП; б) БН ћелија са два НП
- Слика 3 – (а-в) микрографије некротичних ћелија; (г-ђ) микрографије апоптотичних ћелија
- Слика 4 – Бинуклеусна (БН) ћелија
- Слика 5 – Бинуклеусна (БН) ћелија (лево) и мононуклеусна ћелија (десно) са микронуклеусом (МН)
- Слика 6 – Бинуклеусна (БН) ћелија са једним микронуклеусом (МН)
- Слика 7 – Бинуклеусна (БН) ћелија са четири микронуклеуса (МН)
- Слика 8 – Бинуклеусна (БН) ћелија са једним микронуклеусом (МН) и нуклеусним пупољком (НП)
- Слика 9 – Формирање нуклеоплазматског моста (НПМ)
- Слика 10 – PCR продукти раздвојени на 2% агарозном гелу: линије 1, 2, 6 особе са GSTT1 позитивним и GSTM1 нултим генотипом; линија 3 особа са GSTT1 позитивним и GSTM1 позитивним генотипом; линија 4 особа са GSTT1 нултим и GSTM1 позитивним генотипом; линија 5 особа са GSTT1 нултим и GSTM1 нултим генотипом

Шеме

- Шема 1 – Молекуларни механизми који су повезани са настанком МН
- Шема 2 – Деоба ћелије и формирање МН са додавањем цитохалазина Б и без додавања цитохалазина Б у ћелијске културе
- Шема 3 – Употреба молекуларних техника за детекцију природе МН: а) МН који воде порекло од делова хромозома; б) МН који воде порекло од целих хромозома; в) нераздвајње специфичних хромозома који воде до анеуплоидије у једрима
- Шема 4 – Механизам настанка нуклеоплазматских мостова применом теломерних проба: а) дицентрични хромозом настао услед грешака у поправци ДНК прекида и ацентрични фрагмент који формира МН; б) дицентрични хромозом настао фузијом теломера
- Шема 5 – Механизам деловања ензима I и II фазе
- Шема 6 – Настанак глутатион коњугата посредством GST

Шема 7 – Класификација хуманих GST

Шема 8 – Организација гена Mu класе GST на хромозому 1p13.3

Шема 9 – Механизам настанка GSTM1*0 алела

Шема 10 – Организација гена Theta класе GST на хромозому 22q11.2

Шема 11 – Механизам настанка GSTT1*0 алела

Шема 12 – Анатомија грлића материце

Шема 13 – а) плочасто-слојевит епител; б) цилиндрични епител

Табеле

Табела 1 – Основне карактеристике испитиване популације жена

Табела 2 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова код пацијенткиња са дијагностикованим лезијама на грлићу материце – LSIL

Табела 3 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова код жена са дијагностикованим лезијама на грлићу материце – HSIL

Табела 4 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова код жена са дијагностикованим лезијама на грлићу материце – Ca in situ/Ca invasivum

Табела 5 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова у контролној групи жена

Табела 6 – Средње вредности фреквенце микронуклеуса (МН), нуклеусних пупољака (НП) и нуклеоплазматских мостова (НПМ) у лимфоцитима периферне крви у зависности од демографских, медицинских и животних карактеристика

Табела 7 – Заступљеност бинуклеусних (БН) ћелија са микронуклеусима (МН), нуклеусним пупољцима (НП) и нуклеоплазматским мостовима (НПМ) и дистрибуција МН у испитиваној популацији

Табела 8 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) у испитиваној популацији у зависности од демографских, медицинских и животних карактеристика

Табела 9 – Дистрибуција GSTT1 и GSTM1 генотипа код пацијенткиња са цервикалним лезијама и контрола са количником шансе (OR) и 95% интервалом поверења (CI)

Табела 10 – Дистрибуција GSTT1 и GSTM1 генотипа код пацијенткиња у зависности од степена интрацервикалне лезије са количником шансе (OR) и 95% интервалом поверења (CI)

Табела 11 – Дистрибуција GSTT1 и GSTM1 генотипа код пацијенткиња са дијагностикованим интрацервикалним лезијама и контроле у зависности од фактора ризика – година и пушења са количником шансе (OR) и 95% интервалом поверења (CI)

Табела 12 – Фреквенца микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви у испитиваној популацији у зависности од GSTT1 и GSTM1 статуса

Табела 13 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) у испитиваној популацији у зависности од GSTT1 и GSTM1 статуса

Табела 14 – Резултати мултипле линеарне регресионе анализе за МН фреквенцу у лимфоцитима периферне крви и NDI код пацијенткиња

Табела 15 – Резултати мултипле линеарне регресионе анализе за МН фреквенцу у лимфоцитима периферне крви и NDI код здравих контрола

Графици

График 1 – Број оболелих од интрацервикалних лезија грлића материце – LSIL према узрасту

График 2 – Број оболелих од интрацервикалних лезија грлића материце – HSIL према узрасту

График 3 – Број оболелих од интрацервикалних лезија грлића материце – Ca in situ/Ca invasivum према узрасту

График 4 – Фреквенца микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви контрола и пацијенткиња

График 5 – Фреквенца микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST гена

График 6 – Фреквенца микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви контролне групе у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST гена

График 7 – Дистрибуција МН у контролној групи

График 8 – Дистрибуција МН у LSIL групи

График 9 – Дистрибуција МН у HSIL групи

График 10 – Дистрибуција МН у Ca in situ/Ca invasivum групи

График 11 – Дистрибуција МН у контролној групи: а) непушачи; б) пушачи

График 12 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) непушачи; б) пушачи

- График 13 – Дистрибуција МН у контролној групи: а) без историје спонтаних побачаја; б) са историјом спонтаних побачаја
- График 14 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) без историје спонтаних побачаја; б) са историјом спонтаних побачаја
- График 15 – Дистрибуција МН у контролној групи: а) без историје намерних побачаја; б) са историјом намерних побачаја
- График 16 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) без историје намерних побачаја; б) са историјом намерних побачаја
- График 17 – Дистрибуција МН у контролној групи: а) ≤ 45 година старости; б) > 45 година старости
- График 18 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) ≤ 45 година старости; б) > 45 година старости
- График 19 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) код контрола и пацијенткиња
- График 20 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) код пацијенткиња у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST гена
- График 21 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) код контрола у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST гена
- График 22 – Резултати ROC (Receiver Operating Characteristic) анализе

ИЗВОД

Карцином грлића материце представља велики глобални проблем, који је са 528000 нових случајева у 2012. години представљао четврти облик малигнитета код жена у свету. У Централној Србији карцином грлића материце представља трећи облик малигнитета код жена. Инвазивна форма овог карцинома развија се постепено кроз итраепителијалне лезије ниског степена (low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) и лезије високог степена (high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL).

Нарушени хромозомски интегритет је карактеристика различитих патолошких стања. Повећана хромозомска оштећења, експримирана у виду микронуклеуса (МН), потврђена је у лимфоцитима периферне крви особа са дијагнозом канцера. МН представљају екстрануклеусна телашца унутар цитоплазме ћелија, а настају од ацентричних фрагмената или целих хромозома. Присуство МН у цитоплазми се повезује са хромозомским оштећењима и у директној је вези са нивоом хромозомских оштећења.

Канцер је мултифакторијална болест и у етиологији канцера наводе се различити фактори. Повећани ризик за развој канцера приписује се различитим животним навикама. Поред егзогених фактора, генетска основа може имати улогу у канцерогенези. Нулти полиморфизми два гена из GST (Glutathione-S-transferase) фамилије, GSTT1 и GSTM1 гена, често су анализирани као потенцијални фактори ризика.

Циљеви ове докторске дисертације били су да се утврди ниво базалног оштећења наследног материјала у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња са дијагнозом интрацервикалних лезија и здравих жена као и корелација између генетичке нестабилности и здравственог стања, демографских карактеристика, животних навика, репродуктивне историје; процена утицаја полиморфизма GSTT1 и GSTM1 гена у развоју интрацервикалних лезија, при чему је анализом обухваћен појединачни ефекат гена, ефекат интеракције анализираних гена и ефекат интеракције гена са животним и демографским карактеристикама. И на крају, циљ је био да се утврди постојање корелације између нивоа базалних оштећења генетичког оштећења у лимфоцитима периферне крви и генског профила код испитане популације.

Узорак су чиниле жене са дијагностикованим интрацервикалним лезијама грлића материце (32 LSIL, 33 HSIL и 39 CC – Ca in situ/Ca invasivum) и 50 здравих жена. За утврђивање нивоа генетичких оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња и здравих контрола коришћен је цитокинезис блок микронуклеус

(ЦБМН) тест. За анализу полиморфизма у GSTT1 и GSTM1 генима примењена мултиплекс PCR (Polymerase Chain Reaction) метода, производи PCR реакције су раздвојени на 2% агарозном гелу у присуству SYBR Safe DNA gel stain боје. Сви добијени подаци су статистички обрађени, а вредности $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$ су сматране статистички значајним.

Резултати докторске дисертације указују на то да жене са интрацервикалним лезијама грлића материце имају већи ниво хромозомских оштећења у лимфоцитима периферне крви у односу на здраве жене, што је регистровано значајно већом фреквенцом МН у лимфоцитима. Већа заступљеност бинуклеусних (БН) ћелија са МН забележена је у узорку пацијенткиња са дијагнозом Ca in situ/Ca invasivum, HSIL и LSIL у односу на контролу. Жене са дијагностикованим раним стадијумима лезија, LSIL и HSIL, имале су значајно веће фреквенце нуклеоплазматских мостова (НПМ) у односу на здраве жене. На основу резултата ROC (Receiver Operating Characteristic) анализе закључено је да је МН у лимфоцитима периферне крви добар биомаркер за дијагностиковање лезија, а оптимална cut off вредност износила је 10,5 МН/1000 БН са сензитивношћу 84,2% и специфичношћу 95,1%. Смањена кинетика лимфоцита периферне крви жена са дијагностикованим карциномом грлића материце регистрована је значајно мањим индексом нуклеусне деобе (NDI) у односу на контролну групу здравих жена. Узимајући у обзир степен лезије, године старости, пушење, спонтане и намерне побачаје, статус GSTT1 и GSTM1 гена као потенцијалне модулаторе МН фреквенце у лимфоцитима периферне крви, мултипла регресиона анализа на узорку пацијенткиња, показала је да су једино године старости утицале на фреквенцу МН. Резултати исте анализе показали су да степен лезије утиче на вредности NDI. У узорку здравих жена мултипла регресиона анализа показала је да ниједан од анализираних фактора није утицао на МН фреквенцу и NDI вредности. На основу добијених резултата може се закључити да GSTM1 нулти генотип представља фактор ризика за развој интрацервикалних лезија. Носиоци GSTM1 нултог генотипа имале су преко 2 пута већи ризик за развој лезија. Поделом пацијенткиња на основу степена интрацервикалне лезије, резултати су показали значајну улогу GSTM1 нултог генотипа само у развоју раних фаза лезија (LSIL). Носиоци нултог GSTT1 генотипа нису имали значајно већи ризик за развој интрацервикалних лезија, узимајући у обзир стадијум лезија, године старости и пушење цигарета.

SUMMARY

Cervical cancer is major global problem, and with 528000 new cases in 2012. it represented the fourth form of malignancy in women worldwide. In the region of central Serbia cervical cancer is the third form of malignancy in women. The invasive form of this cancer develops gradually ranging from low-grade squamous intraepithelial lesion - LSIL to high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL.

Disturbed chromosomal integrity is the characteristic of various pathological conditions. Increased chromosomal damages expressed in the form of micronuclei (MN) have been confirmed in peripheral blood lymphocytes in persons diagnosed with cancer. MN represents extanuclear small bodies within the cytoplasm of cells and arises from acentric fragments or whole chromosomes. The presence of MN in the cytoplasm is associated with chromosomal defects and is directly related to the level of chromosomal damage.

Cancer is a multifactorial disease with diverse factor etiology. Increased risk for cancer development is attributed to the different life style habits. In addition to exogenous factors, genetic background may play a role in carcinogenesis. Null polymorphisms of two genes from GST (Glutathione-S-transferase) family, GSTM1 and GSTT1 genes, are often analyzed as potential risk factors.

The aims of this doctoral dissertation were to determine the level of basal damage of the genetic material in peripheral blood lymphocytes of patients with a diagnosis of intracervical lesions and healthy women, as well as the correlation between genetic instability and health status, demographic characteristics, lifestyle habits, reproductive history; assessment of the impact of polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes in the development of intracervical lesions, whereby analysis included the individual effect of genes, the interaction of genes and the effect of the gene interaction with life and demographic characteristics. In addition, the aim was to determine correlation between the level of basal genetic damage in the peripheral blood lymphocytes and gene profiles in the sample population.

The study included women diagnosed with intracervical lesions (32 LSIL, HSIL 33 and 39 Ca in situ/Ca invasivum) and 50 healthy women. To determine the level of genetic damage in peripheral blood lymphocytes of patients and healthy controls cytokinesis block micronucleus (CBMN) test was used. For the analysis of polymorphism in GSTT1 and GSTM1 genes multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) method was used; PCR reaction

products were separated on 2% agarose gel in the presence of SYBR Safe DNA gel stain. All data were statistically analyzed and the values of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ were considered statistically significant.

The results of the doctoral dissertation indicate that women with intracervical lesions have a higher level of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes compared to healthy women, which is registered by significantly higher frequency of MN in lymphocytes. Higher distribution of binuclear (BN) cells with MN was observed in the sample of patients diagnosed with Ca in situ/Ca invasivum, HSIL and LSIL compared to the control. Women diagnosed with early stage lesions, LSIL and HSIL had significantly higher frequency of nucleoplasmatic bridges (NPBs) compared to healthy women. Based on the results of ROC (Receiver Operating Characteristic) analysis it was concluded that MN in peripheral blood lymphocytes was a good biomarker for the diagnosis of lesions, and the optimal cut-off value was 10.5 MN/1000 BN with a sensitivity of 84.2% and specificity of 95.1%. Reduced kinetics of peripheral blood lymphocytes of women diagnosed with cervical cancer was registered by significantly lower nuclear division index (NDI) compared to the control group of healthy women. Taking into account degree of lesion, age, smoking, miscarriages and abortions, GSTM1 and GSTT1 status of genes as potential modulators of MN frequency in peripheral blood lymphocytes, multiple regression analysis on a sample of patients showed that the only parameter that affected the MN frequency was age. The results of the same analysis showed that the degree of lesion affected the value of NDI. In a sample of healthy women multiple regression analysis showed that none of the analyzed factors influenced the frequency of MN and NDI values. Based on the obtained results it may be concluded that GSTM1 null genotype represents risk factor for the development of intracervical lesions. Carriers of GSTM1 null genotype had twofold higher risk of developing lesions. By dividing the patients on the basis of the degree of intracervical lesions, the results showed a significant role of GSTM1 null genotype only in the early stages of developing lesions (LSIL). Carriers of null GSTT1 genotype had no significantly higher risk of developing intracervical lesions, taking into account the stage of the lesion, age and cigarette smoking.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Промене у генетичком материјалу у канцерима	2
1.2. Тестови за детекцију промена у генетичком материјалу.....	3
1.3. МН тест.....	4
1.3.1. Остале предности ЦВМН теста.....	8
1.3.2. Базална фреквенца МН у хуманим лимфоцитима периферне крви	12
1.3.3. Демографски фактори – године и пол	13
1.3.4. Исхрана.....	14
1.3.5. Животне навике – пушење, алкохол.....	14
1.3.6. Генетички фактори	16
1.4. Остали тестови за детекцију промена у генетичком материјалу	17
1.5. GST (Glutathione-S-transferase) фамилија.....	18
1.5.1. Му класа GST (GSTM)	20
1.5.2. Theta класа GST (GSTT).....	22
1.6. Грлић материце (Cervix uteri)	23
1.7. Патолошке промене на грлићу материце	25
1.8. Фактори ризика за развој цервикалних лезија	26
1.8.1. Human papilloma virus (HPV) – најзначајнији фактор ризика	26
1.8.2. Остали фактори ризика	27
1.9. Епидемиологија рака грлића материце	29
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
3.1. Узорак	31
3.2. Процедура ЦВМН теста	31
3.3. Мултиплекс PCR (Polymerase Chain Reaction).....	32
3.4. Статистичка обрада података	33
4. РЕЗУЛТАТИ	34
5. ДИСКУСИЈА	91
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	102
7. РЕФЕРЕНЦЕ.....	104
8. ПРИЛОГ	122

1. УВОД

1.1. Промене у генетичком материјалу у канцерима

Очуван генетички материјал неопходан је за нормално функционисање ћелије. Промене које се могу десити у генетичком материјалу у герминативним или соматским ћелијама нарушавају ћелијску хомеостазу и повезују се са развојем различитих болести. Промене у генетичком материјалу које се дешавају у соматским ћелијама не преносе се на потомство. За разлику од њих, генетичке промене у герминативним ћелијама преносе се на потомство и повећавају ризик за развој болести у потомству.

Малигну ћелију карактерише комплексни кариотип са различитим хромозомским аберацијама. Развојем цитогенетичких метода омогућено је да се ове промене у малигним ћелијама детектују. Резултати анализа су од великог значаја и имају примену у дијагностици, процењивању исхода болести као и у одлучивању терапије.

У зависности од тога да ли је до промене дошло у структури или броју хромозома, ове аберације се деле у две групе:

- **структурне аберације** – представљају промене у структури хромозома,
- **нумеричке аберације** – односе се на промене у броју хромозома.

До данас, бројне студије су потврдиле постојање различитих структурних аберација у малигним ћелијама. Анализом 15 пацијената са транзицелуларним карциномом бешике, коришћењем G технике на туморским ћелијама, Panani и сарадници (2004) су показали да је већина пацијента имало комплексни кариотип са различитим аберацијама. Структурне хромозомске аберације у овој студији забележене су на хромозомима 3, 6, 8, 11, 14, 17, 19 (del(3)(p12), i(6p), i(8q), add(11)(p15), add(14)(q32), i(17q) и add(19)(q13)). Применом G технике, структурне хромозомске аберације забележене су и код пацијената са канцером желуца (**Panani u Roussos, 2005**). У студији у којој је анализирано 15 пацијената, код 12 су забележене структурне хромозомске аберације у хромозомима 1, 11, 14, 7, 17, 6, 8 и 13.

Поред структурних аберација у малигним ћелијама детектоване су и нумеричке аберације. Нумеричке аберације представљају промене у броју комплетних гарнитура хромозома или промене у броју појединачних хромозома. Hardisson и сарадници (2004) су у студију укључили 50 пацијената са дијагностикованим сквамозним карциномом фаринкса. Применом FISH-a (Fluorescence *in situ* hybridization) са специфичним

пробама за хромозоме 8, 9, 11 и 17 показали су да је чак 92% пацијената (46 од 50 пацијената) имало нумеричку аберацију. Анализирајући 15 пацијената са дијагностикованим канцером желуца Panani и Roussos (2005) су показали да су само 2 пацијента имала нормални кариотип.

1.2. Тестови за детекцију промена у генетичком материјалу

Велики број тестова је развијен за евалуацију промена у генетичком материјалу и процену генотоксичног потенцијала агенса. Они се могу применити на различитим тест моделима и на различитим типовима ћелија у *in vitro* и *in vivo* условима. На основу нивоа детекције генотоксичног ефекта могу се поделити у три основне групе:

- **тестови за детекцију генских мутација,**
- **тестови за детекцију хромозомских аберација,**
- **тестови за детекцију ефекта на нивоу ДНК.**

Ови тестови се рутински користе у генотоксикологији, међутим применом само једног теста не може се утврдити генотоксични потенцијал агенса, због чега се комбинују различити *in vivo* и *in vitro* тестови.

Један број ових тестова се користи у хуманим биомониторинг студијама за анализу промена у генетичком материјалу. Тестови су нашли примену у евалуацији геномске нестабилности код особа изложеним различитим мутагенима из радне и животне средине и за евалуацију геномске нестабилности код особа са дијагностикованим болестима.

У цитогенетичким студијама за анализу ових промена најчешће се користи један од следећих тестова: микронуклеус (МН) тест, тест хромозомских аберација (chromosomal aberrations – CA), тест размене сестринских хроматида (sister chromatid exchange – SCE), комет тест (Comet assay или Single Cell Gel Electrophoresis Assay – SCG/SCGE assay).

Због неинвазивности узорковања, лимфоцити периферне крви представљају ћелије које се најчешће користе у цитогенетичким студијама. Велики број ових студија је показао да особе које су изложене различитим мутагенима имају већу фреквенцу хромозомских аберација (*Antonucci u de Syllos Cólus, 2000; Prasad u cap., 2002; Santovito u cap., 2014*), SCE (*Gómez-Arroyo u cap., 2000; Santovito u cap., 2014; Mrdjanović u cap., 2014*) и МН (*Lewinska u cap., 2005; Lewinska u cap., 2007;*

Mrdjanović u cap., 2014). Такође, повећани ниво оштећења утврђена су и применом комет теста (*Garaj-Vrhovac u Kopjar 2003; Benedetti u cap., 2013*).

Повећана хромозомска нестабилност, приказана већом фреквенцом МН у лимфоцитима, уочена је и код особа са дијагностикованим болестима – канцер (*Milošević-Dorđević u cap., 2010*), инфертилитет (*Milošević-Dorđević u cap., 2012*), Паркинсонова и Алцхајмерова болест (*Petrozzi u cap., 2002*). Геномска нестабилност код особа са канцером показана је повећаном фреквенцом SCE (*Cefle u cap., 2006*), СА (*Vodicka u cap., 2010*) и применом комет теста (*Kopjar u cap., 2006*). Слично, већа фреквенца SCE уочена је и код пацијената са дијагностикованим атопијским дерматитисом (*Karaman u Aliagaoglu, 2006*) и дијагнозом *Diabetes mellitus 2* (*Binici u cap., 2013*).

Хипотеза да повећана фреквенца СА у лимфоцитима може да буде релевантни биомаркер ризика за канцер потврђена је у студијама (*Hagmar u cap. 1994; Hagmar u cap., 1998*). Ова хипотеза је потврђена и за фреквенцу МН у лимфоцитима (*Bonassi u cap., 2007*), док за SCE није потврђена (*Hagmar u cap. 1994; Hagmar u cap., 1998; Norppa u cap., 2006*).

1.3. МН тест

МН тест је због једноставности, брзине и сензитивности, један од стандардних и најкоришћенијих тестова у цитогенетичким лабораторијама широм света, који се успешно примењује у *in vitro* и *in vivo* условима, за анализу како спонтаних тако и индукованих хромозомских аберација индукованих биолошким, физичким или хемијским агенсима.

Применом овог теста може се добити велики број података:

- **генотоксични** – фреквенца микронуклеуса, нуклеоплазматских мостова (НПМ) и нуклеусних пупољака (НП) у бинуклеусним ћелијама,
- **цитотоксични** – пропорција некротичних и апоптотичних ћелија,
- **цитостатски** – пропорција и однос моноклеусних, бинуклеусних и мултинуклеусних ћелија, индекс нуклеусне деобе (NDI – Nuclear Division Index) (*Fenech, 2007*).

Због могућности анализе великог броја ћелија (неколико 1000 лимфоцита по узорку) резултати МН теста су статистички значајнији и прецизнији.

Сама метода се заснива на праћењу малих једара унутар цитоплазме ћелије који су јасно одвојени од главног једра. Они воде порекло од ацентричних фрагмената, насталих услед хромозомских/хроматидних прекида, или од целих хромозома/хроматида који су заостали у анафази деобе ћелије, а који по завршетку деобе не улазе у састав нуклеуса, већ обавијени засебном мембраном формирају појединачне или вишеструке МН (*Norrpa u Falck, 2003*).

На Шеми 1. приказани су молекуларни механизми који могу довести до формирања МН (*Fenech u cap., 2011*).



Шема 1 – Молекуларни механизми који су повезани са настанком МН (прилагођено, *Fenech u cap., 2011*)

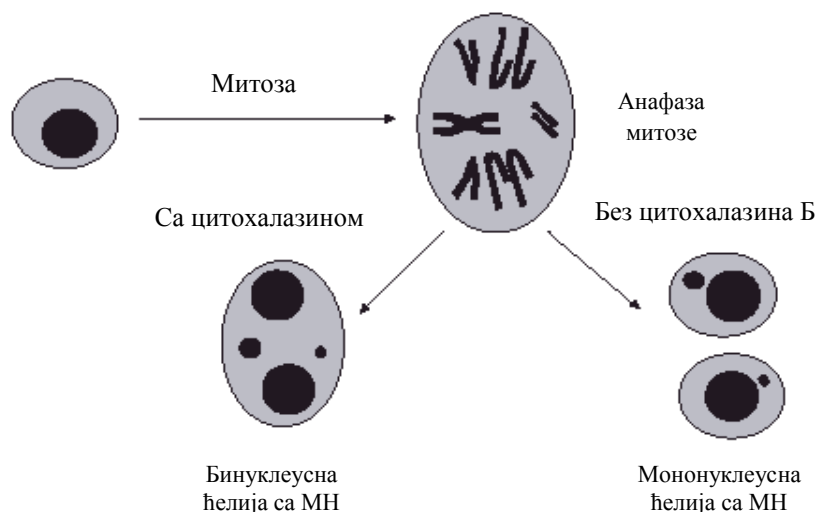
МН тест се може примењивати на различитим модел организмима: глодарима (*Krishnaa u Hayashi, 2000; Vinod u cap., 2011;*) и рибама (*Normann u cap., 2008*). Такође, овај тест се врло успешно примењује и у хуманој популацији на различитим типовима ћелија: фибробласти, кератиноцити (*Slonina u cap., 2003*), букалне ћелије (*Naderi u cap., 2012*) и лимфоцити периферне крви (*Milošević-Đorđević u cap., 2011*). Међутим, због својих карактеристика и неинвазивности самог узорковања ћелија, лимфоцити периферне крви представљају најчешћи избор ћелија за *in vivo* и *in vitro* анализе. Лимфоцити су ћелије које дуго живе и имају способност рецикулације – скоро 80% лимфоцита излази из циркулације, пролази кроз организам и поново се за 12 сати враћају у циркулацију, чиме ступају у непосредни контакт са различитим ткивима и органима. Тако, генетичка оштећења која се детектују у лимфоцитима могу бити

индукована у било ком делу организма, због чега су лимфоцити из периферне крви одраз стања целог организма (*Milošević-Dorđević u Grujičić, 2004*).

Микронуклеуси у цитоплазми указују на постојање хромозомских оштећења, а како би се ове аберације експримирале у виду МН у цитоплазми потребно је да ћелија прође кроз деобу. Модификацијом конвенционалног МН теста аустралијски истраживачи Fenech и Morley (*1985*) омогућили су анализу ових екстрануклеусних телашаца у цитоплазми ћелија које су прошле кроз само једну деобу једра, а које се уочавају као ћелије са два једра, бинуклеусна ћелија (БН). Њихов циљ био је да се ћелијска деоба заустави одмах након завршене кариокинезе, а пре саме цитокинезе. То је постигнуто додавањем цитохалазина Б у ћелијске културе чиме се механизам дејства огледа у инхибицији цитокинезе уз неометану деобу нуклеуса (Шема 2). Овако модификован тест добио је име цитокинезис блок МН (ЦБМН) тест. Цитохалазин Б је супстанца изолована из гљивице *Helminthosporium dematioideum* која инхибира полимеризацију актинских филамената чиме се онемогућава стварање контрактилног прстена изграђеног од актинских и миозинских филамената (*Zalacain u cap., 2005*).

Такође, додавањем цитохалазина Б и заустављањем ћелијске деобе омогућена је детекција нуклеоплазматских мостова у БН ћелијама који би током цитокинезе пукли (*Fenech, 2007*).

Овако модификован тест првенствено је био намењен за примену на лимфоцитима периферне крви (*Fenech, 2000*).

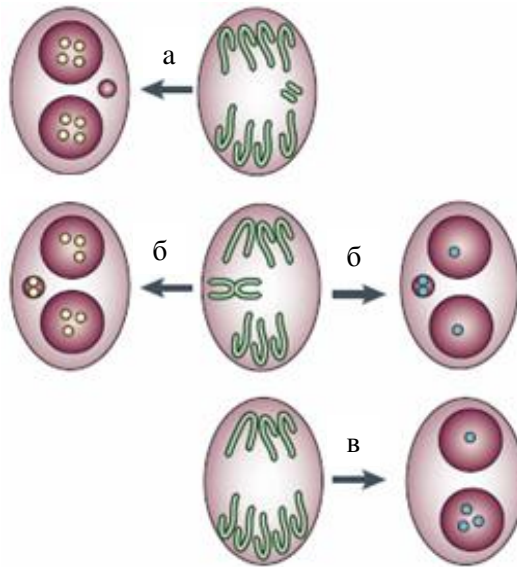


Шема 2 – Деоба ћелије и формирање МН са додавањем цитохалазина Б и без додавања цитохалазина Б у ћелијске културе (преузето и прилагођено *Zalacain u cap., 2005*)

Имајући у виду порекло МН, овим тестом могуће је детектовати анеугени (губитак целих хромозома) и кластогени ефекат (прекиди на хромозомима) агенса. У прилог претпоставке да мањи МН воде порекло од фрагмената ДНК, а већи од целих хромозома говоре резултати недавне студије која је, између осталог, утврдила корелацију између величине и састава МН (*Cavallo u cap., 2007*). Међутим, оваква анализа може довести до грешке и она се не препоручује за хумане ћелије или друге ћелије где постоји хетерогеност у величини хромозома (*Fenech, 2007*). Микронуклеус малог промера може имати у саставу мали фрагмент великог хромозома или цео мали хромозом, или се у већем МН може наћи већи број ацентричних фрагмената. Тачан механизам настанка МН применом само овог теста се не може детектовати. Прецизна детекција омогућена је увођењем додатних молекуларних метода. Молекуларне методе се могу поделити у две групе:

- *методе које користе антикинетохорна антитела,*
- *методе које користе ДНК пробе: FISH (Tucker u Preston, 1996).*

На основу добијених резултата може се закључити да ли је у саставу МН фрагмент или цео хромозом. Тако, МН са позитивним сигналимa указују на присуство центромере, односно такви МН садрже целе хромозоме који су заостали у току анафазе. Супротно, МН без сигнала су без центромере и у њиховом саставу се налазе фрагменти хромозома (Шема 3). Коришћењем специфичних проба поред дистрибуције специфичних хромозома у формираним МН може се пратити и прерасподела хромозома и у једрима БН ћелије, иако није дошло до формирања МН (*Fenech, 2007*).

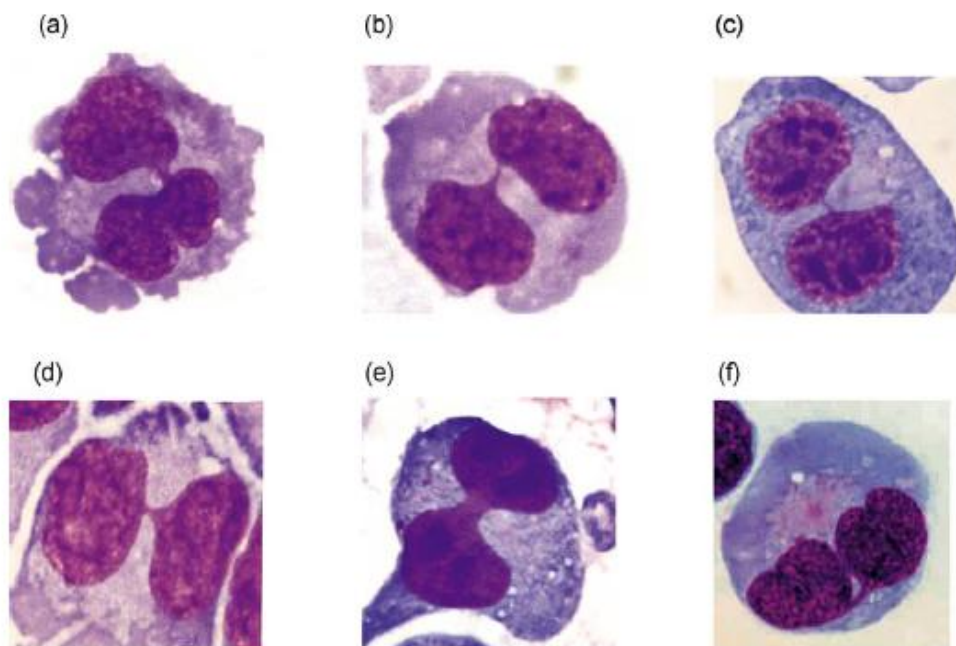


Шема 3 – Употреба молекуларне технике за детекцију природе МН: а) МН који воде порекло од делова хромозома; б) МН који воде порекло од целих хромозома; в) нераздвајање специфичних хромозома који воде до анеуплоидије у једрима (преузето и прилагођено, *Fenech, 2007*)

1.3.1. Остале предности ЦВМН теста

Иако је ЦВМН тест пре свега био развијен за анализу хромозомских оштећења која се експримирају у виду МН, данас се овим тестом могу пратити и други директни биомаркери генетичких оштећења као што су *нуклеоплазматски мостови и нуклеусни пупољци (Fenech, 2007)*.

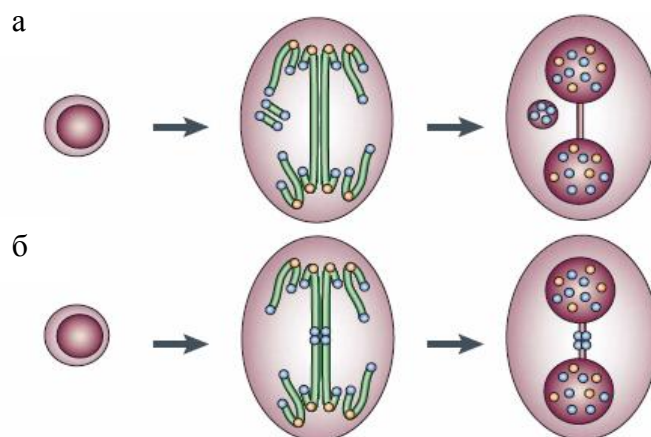
Нуклеоплазматски мостови представљају биомаркере хромозомских реаранжмана, а потичу од дицентричних хромозома чије се центромере у току анафазе крећу ка различитим половима (Слика 1). Настају услед грешака у поправкама прекида ДНК или настају фузијом теломерних крајева услед скраћивања теломера. Могу се уочити и услед неправилног раздвајања сестринских хроматида у анафазу (*Fenech и сар., 2011*).



Слика 1 – Микрографије БН ћелија са нуклеоплазматским мостовима (преузето, *Fenech u cap., 2003*)

У оквиру HUMN (HUman MicronNucleus) пројекта описани су критеријуми за бројање НПМ у БН ћелијама. Они представљају непрекидну нуклеоплазматску везу између два једра; дебљина може да варира, али обично не прелази 1/4 пречника једра и боји се слично као једро. У ретким ситуацијама у оквиру једне БН ћелије могуће је детектовати више од једног нуклеоплазматског моста. БН ћелија са нуклеоплазматским мостом може, али и не мора да има и један или више микронуклеуса. Такође, препоручује се да се нуклеоплазматски мостови анализирају у ћелијама код којих постоји јасна граница између једара, која се не преклапају или додирују (*Fenech u cap., 2003*).

Порекло НПМ могуће је детектовати употребом теломерних проба. Очекује се да НПМ који настају фузијом теломерних крајева имају позитиван сигнал, док они који настају услед грешака у поправци ДНК прекида неће имати позитиван сигнал. Осим тога НПМ настали услед грешака у поправци ДНК прекида ће највероватније бити удружени са МН, који води порекло од ацентричног фрагмента. Ацентрични фрагменти не морају бити удружени са НПМ који су настали фузијом теломерних крајева – Шема 4 (*Fenech, 2006; Fenech u cap., 2011*).

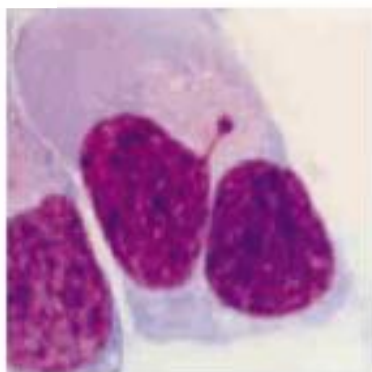


Шема 4 - Механизам настанка нуклеоплазматских мостова применом теломерних проба: а) дицентрични хромозом настао услед грешака у поправци ДНК прекида и ацентрични фрагмент који формира МН; б) дицентрични хромозом настао фузијом теломера (преузето и прилагођено, *Fenech, 2007*)

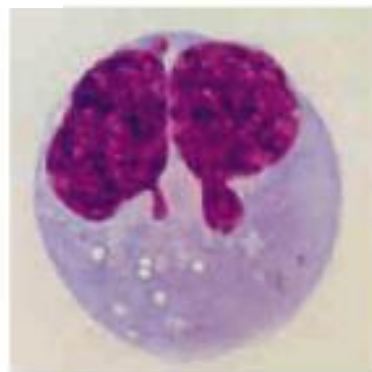
Хромозомска оштећења експримирана у виду пупољака указују на амплификовану ДНК, ослобођене ДНК репарирне комплексе или вишак хромозома из анеуплоидне ћелије (*Fenech u cap., 2011*). *In vitro* експериментима на ћелијама сисара Shimizu и сарадници (*1998, 2000*) показали су да се амплификована ДНК селективно локализује на специфичним местима која се налазе на периферији нуклеуса и да се пупљењем у С интерфазе ћелијског циклуса елиминише из једра.

Ове структуре имају исту морфологију као и МН само што нису одвојени од главног једра већ су увек тањом или дебљом дршком повезани са њим. Према обојености слични су главном једру; а може се десити да се пупољак нађе у вакуоли непосредно до једра (Слика 2). Пупољци се као и остала два биомаркера генетичких оштећења анализирају у најмање 1000 БН ћелија, а спонтана фреквенца на 1000 БН ћелија је у опсегу 0 – 5 (*Fenech, 2007*).

а)



б)

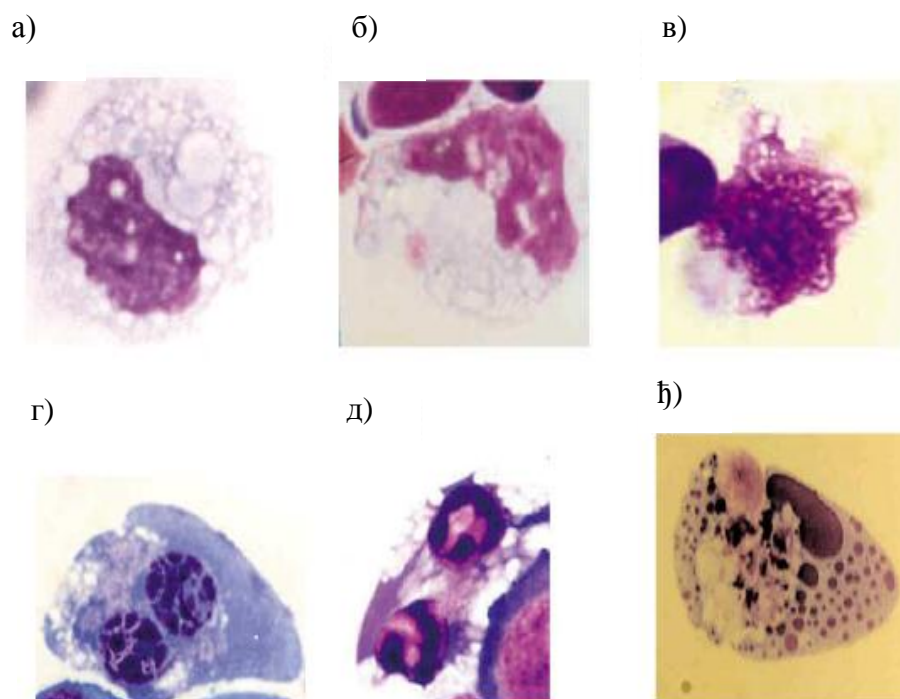


Слика 2 - Микрографије БН ћелија са нуклеусним пупољцима: а) БН ћелија са једним НП; б) БН ћелија са два НП (преузето и прилагођено, *Fenech u cap., 2003*)

Порекло пупољака може се утврдити применом теломерних и центромерних проба. Lindberg и сарадници (2007) су применом ових проба описали порекло пупољака у нормалним лимфоцитима и лимфоцитима који су култивисани у одсуству фолне киселине. Закључили су да већина пупољака у БН лимфобластима потиче од интерстицијалних или терминалних ацентричних фрагмената.

Поред симултаног праћења различитих биомаркера генетичких оштећења, бројањем и утврђивањем пропорције некротичних и апоптотичних ћелија (Слика 3) могуће је добити податак о цитотоксичном догађају.

Апоптоза представља програмирану ћелијску смрт, док је некроза алтернативна форма ћелијске смрти која је условљена оштећењима на ћелијској мембрани, органелама или у неком кључном метаболичком путу. Очекивана спонтана фреквенца апоптотичних и некротичних ћелија на 500 анализираних ћелија креће се у опсегу 0-7% и 0-9%, ретроспективно (*Fenech, 2007*). Критеријуми за бројање ових ћелија предложени су оквиру HUMN пројекта (*Fenech u cap., 2003*).



Слика 3 – (а-в) микрографије некротичних ћелија; (г-ђ) микрографије апоптотичних ћелија (преузето и прилагођено, *Fenech и сар., 2003*)

Такође, анализом ћелија са једним, два, три и четири једра могуће је одредити индекс пролиферативног статуса вијабилне ћелијске фракције. Индекс се израчунава по формули: $NDI = ((1 \times M_1 + (2 \times M_2) + (3 \times M_3) + (4 \times M_4))/N)$, при чему је $M_1 - M_4$ број ћелија са 1 – 4 једра, N укупан број анализираних вијабилних ћелија. Одређивањем вредности овог индекса добија се увид у цитотоксични ефекат као и митогени одговор лимфоцита, а нормалне вредности крећу се у опсегу 1,3 – 2,2. (*Fenech, 2007*).

Прецизнија слика о пролиферативном статусу и ћелијској кинетици може се добити модификацијом формуле и укључивањем апоптотичних и некротичних ћелија. Овај индекс се рачуна по формули $NDCI$ (Nuclear division cytotoxicity index) = $(Ap+Nek+M_1+2M_2+3M_3+4M_4)/N$, где је Ap број апоптотичних ћелија, Nek број некротичних ћелија, M_1-M_4 број ћелија са 1-4 једара и N број анализираних ћелија (*Fenech, 2000*).

1.3.2. Базална фреквенца МН у хуманим лимфоцитима периферне крви

ЦБМН тест има велику примену у цитогенетичким истраживањима у *in vitro* и *in vivo* условима, за анализу спонтаних и индукованих хромозомских аберација. Базална или спонтана фреквенца МН указује на оштећења у лимфоцитима која настају

акумулацијом хромозомских оштећења у току живота лимфоцита, док је индукована фреквенца резултат излагања агенсима природног или вештачког порекла. За детекцију генотоксичног потенцијала агенаса и исправног тумачења резултата неопходно је да се утврди базална фреквенца МН.

HUMN пројекат је интернационални пројекат који укључује преко 50 светских лабораторија, међу којима је и једна из наше земље, лабораторија у оквиру Института за нуклеарна истраживања Винча. Пројекат је основан са циљем побољшања, разумевања и стандардизације ЦБМН теста, као и утврђивања базалне МН фреквенце у популацији здравих особа. У оквиру пројекта описани су критеријуми за бројање МН у БН ћелијама. МН морају да буду округли или овални, јасно одвојени од главног једра или могу да се додирују, али не и преклапају. Морају да буду одговарајуће величине (између 1/16 и 1/3 дијаметра главног једра), истог или некада јачег интензитета бојења од једра (*Fenech u cap., 2003*).

На основу података прикупљених HUMN пројектом и анализом фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви приближно 5000 здравих људи, утврђено је да просечна фреквенца МН износи 6,5/1000 анализираних БН ћелија (*Bonassi u cap., 2001*).

Поред утврђивања базалне фреквенце МН, циљ овог пројекта је био и утврђивање потенцијалних фактора који могу да модификују фреквенцу МН, као што су демографски фактори, исхрана и животне навике.

1.3.3. Демографски фактори – године и пол

Недавне биомониторинг студије показале су да упоредо са годинама старости расте хромозомска нестабилност, што је показано постојањем позитивне корелације између година и МН фреквенце и између година и НП (*Coskun u cap., 2013; Nefic u Handzic, 2013*).

Резултати студије која је рађена у Србији на здравој популацији у распону од 0 до 62 године старости, показали су да до 40-те године старости МН фреквенца расте упоредо са годинама, а да након 40-те године МН фреквенца упоредо са годинама старости опада. Аутори су то објаснили смањењем пролиферационог капацитета код старијих особа (*Milošević-Dorđević u cap., 2002*).

Пол је демографски фактор који је такође анализиран у популацијама као потенцијални модулирајући фактор МН фреквенце. Утврђено је да жене имају вишу

фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви у поређењу са мушкарцима, и да се тај однос креће у рангу од 1,2 до 1,6 у зависности од старости (*Fenech u cap., 1999*). Претпоставља се да је узрок више фреквенце МН у женској популацији повећана дистрибуција X хромозома у МН упоредо са годинама старости. Анализом новорођенчади Milošević-Đorđević и сарадници (*2007*) показали су да у овом узрасту не постоји разлика у МН фреквенци између полова.

1.3.4. Исхрана

Микронутријенти (витамини и минерали) су као кофактори активности ензима и структурни делови протеина, који учествују у синтези и репарацији ДНК, у спречавању оксидативног оштећења ДНК, врло важни за одржавање геномске стабилности (*Fenech, 2005*).

Прегледом радова *in vivo* анализа Fenech и Bonassi (*2011*) показују да је фреквенца МН у лимфоцитима повезана са исхраном и концентрацијом фолата у плазми, витамина Б12, рибофлавина, биотина, пантотената, бета-каротена, витамина Е, ретинола и калцијума.

Студија у којој су биле укључене три групе људи са различитим начином исхране, лактоово и лакто вегетаријанци као и невегетаријанци, показала је да не постоји разлика у МН фреквенци у лимфоцитима између вегетаријанаца и невегетаријанаца као и између лактоово и лакто вегетаријанаца (*Kazimirova u cap., 2004*). Мада је у оквиру појединих група вегетаријанаца и невегетаријанаца постојала разлика у МН фреквенци, није потврђена хипотеза да вегетаријанци имају нижу МН фреквенцу у лимфоцитима (*Fenech u Rinaldi, 1995*).

Huang и сарадници (*2009*) су на популацији здравих радника показали да особе које воде рачуна о својој дневној исхрани (више поврћа и воћа, конзумирају рибе и месо) имају нижу МН фреквенцу у односу на остале испитанике. Аутори сматрају да нутритивно избалансирана исхрана и редовна физичка активност могу да побољшају ендегену антиоксидативну заштиту и рипер систем, што резултира смањењем хромозомских оштећења.

1.3.5. Животне навике – пушење, алкохол

Иако је утицај пушења на фреквенцу МН анализиран у великом броју студија, резултати студија су контрадикторни. Један број студија показао је да постоји

корелација између пушачких навика и фреквенце МН у лимфоцитима (*De Boeck u cap., 2000; Tomanin u cap., 1991; Haverić u cap., 2010*), док су друге студије показале да не постоји корелација (*Barale u cap., 1998; Milošević-Đorđević u cap., 2012; Coskun u cap., 2013*).

У циљу утврђивања стварне везе између пушења и хромозомске нестабилности, приказане као МН у периферним лимфоцитима, Bonassi и сарадници (*2003*) су реанализирали податке HUMN базе и на основу укупно 5710 испитаника, од којих су 3501 непушачи, 1409 активни и 800 повремени пушачи и дошли су до два закључка: 1) пушачи немају повећану МН фреквенцу у односу на непушаче; 2) значајно повећање МН фреквенце постоји у групи тешких пушача (>30 цигарета дневно), а који нису били професионално изложени генотоксичним агенсима.

Мања фреквенца МН у лимфоцитима пушача у односу на непушаче у истој студији је објашњена на два начина. Једна од могућности је да због оштећења у лимфоцитима која су узрокована пушењем ћелије не преживљавају период култивације или се у култури не деле, па не могу да формирају БН ћелије на којима се врши анализа МН. Са друге стране, нижа фреквенца МН код слабих пушача у односу на непушаче је објашњена постојањем адаптивног одговора. Претпоставља се да конзумирање неколико цигарета дневно може да стимулише адаптивни одговор у смислу укључивања репаративних механизма ћелије, што резултира смањењем МН фреквенце.

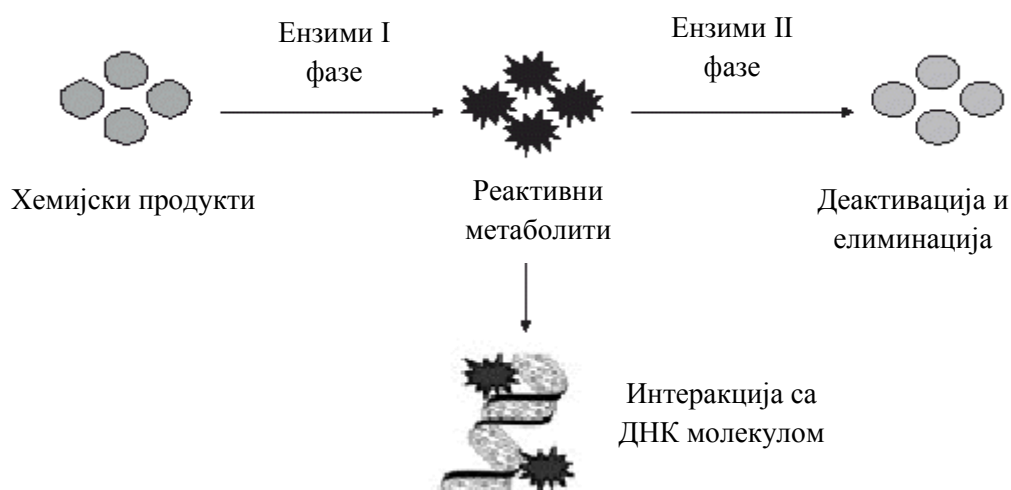
Алкохол, као фактор који може да утиче на МН фреквенцу, анализиран је у бројним студијама. Поједине од њих показале су да особе које конзумирају алкохол имају вишу фреквенцу МН у лимфоцитима у односу на контролну групу (*Maffei u cap., 2000*) и групу апстинената (*Maffei u cap., 2002*). Резултати студије Maffei и сарадника (*2000*) применом FISH-а са централним пробама, указују на вероватни анеугени ефекат алкохола. Супротно, на узорку турске популације Coskun и сарадници (*2013*) су показали да алкохол нема ефекта на МН фреквенцу, као и на појаву НПМ и НМ. Сличне резултате за МН фреквенцу добила је и група аутора на популацији здравих радника професионално изложених токсинима (*Huang u cap., 2009*).

Поред исхране, Huang и сарадници (*2009*) закључили су да недостатак физичке активности (<2 пута недељно), недовољно сна (≤6 сати дневно) као и рад више од 9 сати доводи до повећања геномске нестабилности, коју је могуће евидентирати као повећање МН фреквенце.

1.3.6. Генетички фактори

Последњих деценија велика се пажња посвећује анализи утицаја генетичке конституције на ниво хромозомских оштећења у лимфоцитима код популације професионално изложених различитим агенсима као и контролама (*Schroder u cap., 1995; Falck u cap., 1999; Ishikawa u cap., 2004; Teixeira u cap., 2004; Zijno u cap., 2006; Kumar u cap., 2011; Singh u cap., 2012*). Норпра (2004) и Dhillon и сарадници (2011) су приказали објављене резултате о утицају генског полиморфизма на цитогенетичке маркере узимајући у обзир различите факторе као што су животне навике, здравствено стање, изложеност различитим агенсима, као и утицај на базалну фреквенцу цитогенетичких маркера (CA, SCE, MN).

Бројне студије су укључиле анализу полиморфизма гена друге фазе детоксификације, и то пре свега GST фамилију гена. Ензими који учествују у метаболизму и детоксификацији припадају ензимима I и II друге фазе. Метаболизмом и активностима ензима I фазе или ендогеним процесима (дисање) могу настати високо реактивна електрофилна једињења која могу да оштете протеине или нуклеинске киселине. Један од система заштите су и ензими II фазе који катализују коњугацију глутатиона (GSH) са различитим врстама електрофилних једињења, чиме их деактивирају и елиминишу (Шема 5) (*Zalacain u cap., 2005*)



Шема 5 – Механизам деловања ензима I и II фазе (преузето и прилагођено *Zalacain u cap., 2005*)

Kirsch-Volders са сарадницима (2006) показали су да особе са GSTT1 нултим генотипом имају мању фреквенцу MN у лимфоцитима у односу на GSTT1 позитивне

особе. Слично, Ishikawa и сарадници (2004) су показали да не постоји ефекат полиморфизма GSTT1 и GSTM1 на базалну фреквенцу МН у лимфоцитима 90 здравих Јапанаца. Поред T1 и M1 фамилије до сада је рађена и анализа полиморфизма других гена из ове суперфамилије на МН фреквенцу. Тако је у узорку контролних особа анализом GSTP варијанти показано да није постојао ефекат на МН фреквенцу (*Teixeira u cap., 2004; da Silva u cap., 2008*).

Поред појединачног ефекта генетске конституције на МН фреквенцу, у доступној литератури постоје и студије које су укључиле утицај комбинације гена (GSTT1 и GSTM1) и других фактора као што су године старости и пушење цигарета.

Недавна студија (*Kirsch-Volders u cap., 2006*) показала је да GSTT1 нулти генотип утиче на МН фреквенцу у односу на године старости. Поделом у три старосне групе (20, 40 и 60 година) ова студија је показала да су особе 20 година старости са GSTT1 нултим генотипом имале мању МН фреквенцу, док су особе 60 година старости и са GSTT1 нултим генотипом имале већу МН фреквенцу у поређењу са носиоцима позитивног генотипа исте старосне групе. GSTT1 нулти генотип није имао значајан ефекат на МН фреквенцу у групи испитаника старости 40 година.

Ензими GST фамилије учествују у метаболизму многих једињења који се налазе у цигаретама: полициклични ароматични угљоводоници, 1,3-бутадиен, етилен оксид и халогени алкани (*Alexandrie u cap., 2004*). Један део претходних студија које су анализирале комбиновани ефекат генотипа и пушења, показале су да особе које су носиоци GSTM1 нултог генотипа имају већу фреквенцу СА (*Scarpato u cap., 1997*) и МН (*Palma u cap., 2007*). Сличан закључак о већој осетљивости особа са нултим GSTM1 генотипом на канцерогене из цигарета, публикован је у студији Норрпа (2004). Међутим, варијације у оштећењима наследног материјала нису примећене код пушача са GSTT1 као и GSTM1 нултим генотипом у обе испитиване групе, контроле и професионално изложени мутагенима (*Singh u cap., 2012*).

1.4. Остали тестови за детекцију промена у генетичком материјалу

У цитогенетичким студијама велику примену нашли су и следећи тестови:

1. **Тест хромозомских абериација** – погодан за анализу структурних абериација, док се не препоручује за анализу нумеричких абериација. Структурне абериације се на основу морфологије могу поделити у две основне групе: абериације хромозомског и абериације хроматидног типа. Абериације хроматидног типа укључују промене у само

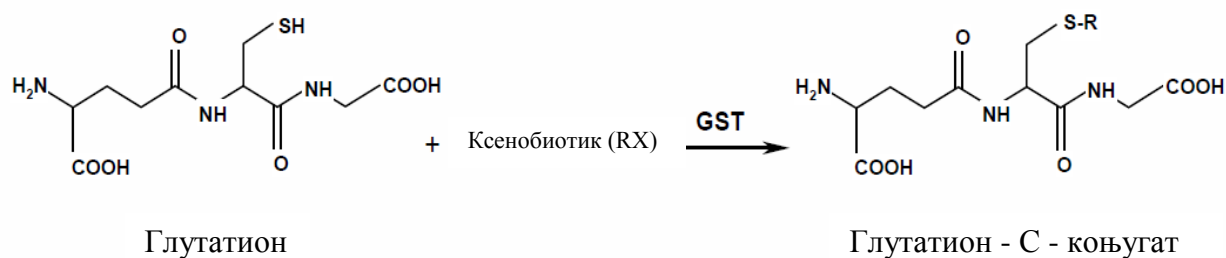
једној хроматиди хромозома, док аберације хромозомског типа укључују промене у обе хроматиде хромозома. Промене овог типа могу да се детектују у ћелијама које се налазе у метафази ћелијске деобе (*Mateuca u cap., 2006; Милошевић-Ђорђевић, 2010*),

2. **Тест размене сестринских хроматида** – тестом се прати реципрочна размена сегмената ДНК између сестринских хроматида (*Милошевић-Ђорђевић, 2010*). Детекција SCE је могућа у ћелијама које су култивисане у присуству Brdu (5-бромо-деоксиуридин) током два репликациона циклуса и које су након препарације третиране Ноеchst 33258 бојом и Гимзом (*Stults u cap., 2014*). SCE је индикатор поремећаја репликације или грешака у сегрегацији хроматида (*Galas u Cebulska-Wasilewska, 2014*),
3. **Комет тест** – тестом се детектују ДНК оштећења у појединачним ћелијама. Применом комет теста у неутралној средини могу се детектовати дволанчани прекиди у ДНК молекулу. Верзија комет теста који се одвија у алкалној средини (рН>13) може се користити за детекцију великог броја оштећења – једноланчани прекиди у ДНК молекулу, алкално лабилна места, ДНК-ДНК/ДНК-протеин укрштене везе, једноланчани прекиди повезани са некомплетним местима поправке. Теоретски, тест је погодан за све врсте ћелија (*Tice u cap., 2000*).

1.5. GST (Glutathione-S-transferase) фамилија

GST су мултифункционални ензими који припадају другој фази детоксификације. Ова фамилија је широко распрострањена у природи и детектована је код бактерија, гљива, инсеката, биљака, птица, риба и сисара (*Hayes u Pulford, 1995*).

Ензими катализују коњугацију GSH са различитим врстама ендогених и егзогених електрофилних једињења (Шема 6), чиме се у већини случајева стварају мање реактивни производи који се лако излучују. Главна улога GST је метаболизам и детоксификација електрофилних једињења, укључујући лекове, срединске канцерогене и продукте оксидационог стреса (*Wu u Dong, 2012*). Познате су и друге улоге GST, као што су улога у биосинтези леукотриена, простагландина, тестостерона и прогестерона, деградација тирозина, Michael-ова адиција, деградација пероксида, редукција дехидроаскорбинске киселине и многе друге (*Hayes u cap., 2005; Oakley, 2011; Wu u Dong, 2012*).



Шема 6 – Настанак глутатион коњугата посредством GST (преузето и прилагођено, *Jancova u cap., 2010*).

Поред своје ензимске функције, GST имају и неензимску функцију, која се између осталог огледа у интеракцији са ћелијским протеинима (*Townsend, 2003; Lo u Ali-Osman, 2007*). GST могу ковалентно да везују неке канцерогене метаболите као и етакринску киселину или нековалентно да везују велики број једињења као што су стероидни и тироидни хормони, жучне киселине, билирубини и масне киселине (*Hayes u Pulford, 1995*).

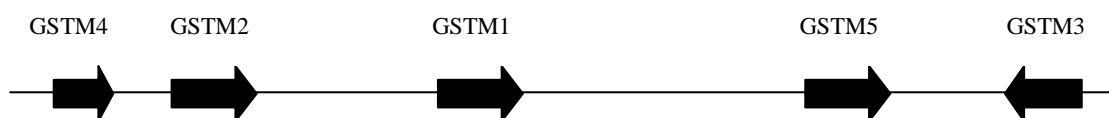
Хумани GST се деле у три главне фамилије (Шема 7): цитосолни, митохондријални и мембрански микрозомални – MAPEGs (eng. membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) (*Wu u Dong, 2012*). На основу сличности у секвенци, специфичности према супстрату и имунореактивности, цитосолни GST-и се деле у седам класа: Alpha (пет чланова), Mu (пет чланова), Pi (један члан), Theta (два члана), Zeta (један члан), Omega (два члана) и Sigma (један члан) (*Lo u Ali-Osman, 2007; Wu u Dong, 2012*). Карра ензим је једини потврђени хумани митохондријални GST, а његово присуство је потврђено и у пероксизомима (*Morel u cap., 2004*). Протеини у оквиру исте класе имају >40% аминокиселинске сличности, док протеини између класа имају <25% сличности (*Wu u Dong, 2012*).



Шема 7 - Класификација хуманих GST (преузето и прилагођено, *Wu u Dong, 2012*)

1.5.1. Му класа GST (GSTM)

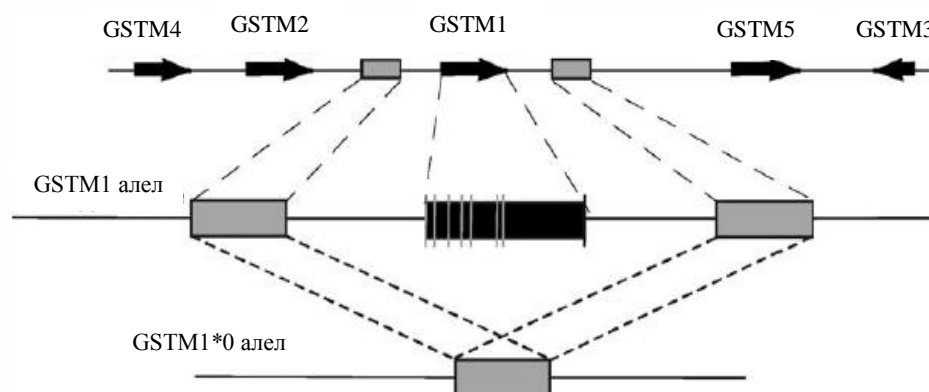
Гени Му класе налазе се на хромозому 1p13.3 и има их 5. Смештени су у тандему (5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3') (Шема 8) у 20 кб кластеру (*Xu u cap., 1998*). Ензими које детерминишу имају функцију у детоксификацији електрофилних једињења, укључујући канцерогене, лекове, срединске токсине и продукте оксидативног стреса, коњугацијом са глутатионом. Потврђено је да је експресија GST код људи ткивно и ћелијско специфична. GSTM се експримира у јетри, мозгу, лимфоцитима, мишићима, тестисима, плућима, танком цреву (*Rowe u cap., 1997; Wang u cap., 2000; Coles u cap., 2003; Eklund u cap., 2006*).



Шема 8 – Организација гена Му класе GST на хромозому 1p13.3

Полиморфизам је присутан у генима Mu класе, а описан је и у GSTM1 гену (*Board u Menon, 2013*). Алели GSTM1*А и GSTM1*В се међусобно разликују само у једној бази у егзону 7 и кодирају мономере који формирају активне хомо и хетеродимере, при чему каталитичка активност ових ензима остаје слична; GSTM1*0 алел је резултат делеције, која код хомозигота (GSTM1 нулти генотип) резултује недостатком функционално активног ензима (*Strange u cap., 2001*). Са друге стране дупликација GSTM1 (GSTM1*1 варијанта), која је описана у популацији Саудијске Арабије, повезана је са брзом ензимском активношћу (*McLellan u cap., 1997*).

Механизам настанка делеције GSTM1 гена приказана је на Шема 9. Наиме, бочно од GSTM1 гена налазе се два скоро идентична региона величине 4,2 кб. Услед хомолог неједнаког кросинг овера између ова два региона настаје делеција региона од 15 кб који садржи цео GSTM1 ген (*Xu u cap., 1998; Parl, 2005*).



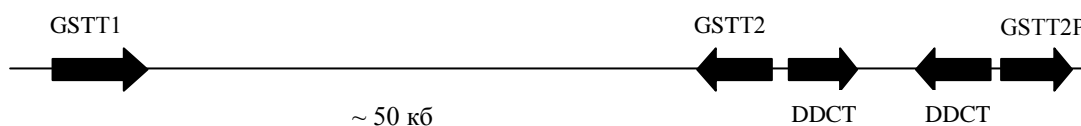
Шема 9 – Механизам настанка GSTM1*0 алела (преузето и прилагођено, *Parl, 2005*).

Полиморфизам M1 гена, првенствено делеција, је предмет многих студија које анализирају њихову повезаност са ризиком за развој различитих болести (*Palli u cap. 2005; Wang u cap., 2015*), као и са одговором на дејство терапије (*Ambrosone u cap., 2001; Zhong u cap., 2006*). Популационе студије показују да је овај полиморфизам различито заступљен у популацијама. Мета анализа која је укључила преко 12000 контрола показано је да је хомозиготна делеција присутна код око 53% популације белаца (42-60%), слична дистрибуција забележена је код Азијата 52,9% (42-54%), док је ова делеција била најмање заступљена (26,7%, 16-36%) код Африканаца (*Garte u cap., 2001*).

1.5.2. Theta класа GST (GSTT)

Овој класи припадају два гена GSTT1 и GSTT2, који се налазе на хромозому бр. 22, а *in situ* хибридизацијом је утврђено да се налазе у субрегиону q11.2 (*Tan u cap., 1995; Weeb u cap., 1996*). Сличне су структуре. Изграђени су од 5 егзона са идентичним егзон интрон границама, али деле само 55% аминокиселинске сличности. Раздвојени су око 50 кб и различитих су дужина. GSTT1 је дужине 8.1 кб, док је GSTT2 само 3.7 кб. GSTT2 се налази поред гена који кодира D-dopachrome tautomerase (DDCT) и оба гена су дуплирана у инверзном редоследу (*Coggan u cap., 1998*) (Шема 10).

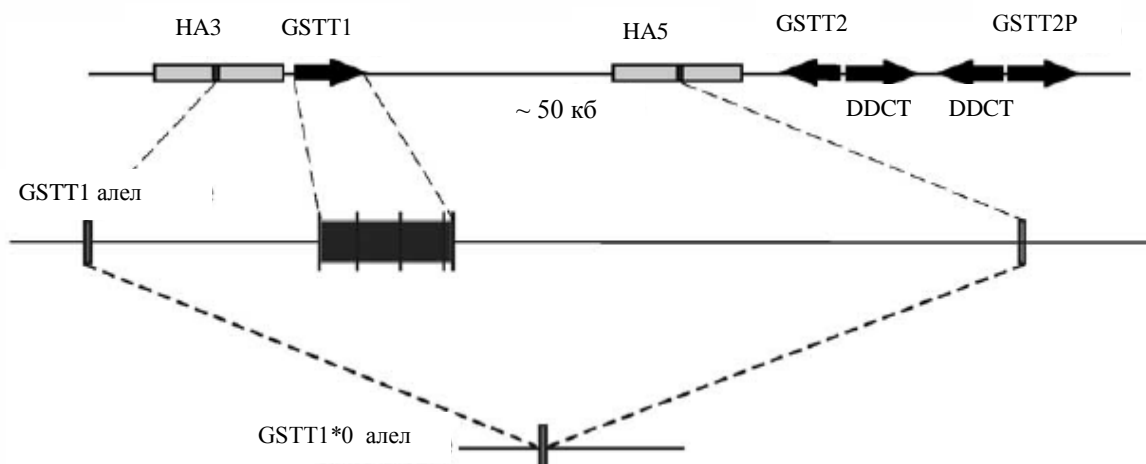
GSTT показује ткивну и ћелијску специфичност у експресији. Имуноблот анализом показано је да се ова класа експримира у еритроцитима, плућима, бубрезима, мозгу, скелетним мишићима, срцу, танком цреву и слезини, гастроинтесталном тракту, али не и у лимфоцитима (*Juronen u cap., 1996; de Bruin u cap., 2000*).



Шема 10 – Организација гена Theta класе GST на хромозому 22q11.2

GSTT1 се сматра ензимом који учествује у детоксификацији, али је потврђено да и активира поједине хемикалије (*Alexandrie u cap., 2002*). За разлику од већине осталих солубилних GST ензима којима је 1-хлоро-2,4-динитробензен супстрат, GSTT1 не показује активност (*Primavera u cap., 2008*).

Описане су полиморфне варијанте овог гена и за неке имају значајне функционалне ефекте (*Board u Menon, 2013*). GSTT1*0 алел је резултат делеције, а особе које имају хомозиготну делецију (GSTT1 нулти генотип) немају ензим. Бочно од GSTT1 гена налазе се два 18 кб региона – HA3 и HA5 (>90% хомологије) који у централном делу имају идентичну 403 бп секвенцу. Хомолога рекомбинација која укључује 403 бп поновке резултује делецијом ~54 кб у коју је укључен и цео GSTT1 ген (*Spreneger u cap., 2000; Parl, 2005*) (Шема 11).



Шема 11– Механизам настанка GSTT1*0 алела (преузето и прилагођено, *Parl, 2005*).

GSTT1*0 генотип је интензивно проучаван, а студије су најчешће односиле на повезаност овог полиморфизма са различитим болестима (*Palli u cap. 2005; Wang u cap., 2015*), као и повезаност са одговором на терапију (*Ambrosone u cap., 2001; Zhong u cap., 2006*). Имајући у виду делециони полиморфизам GSTT1 гена, највећа заступљеност нултог генотипа забележена је код Азијата 47% (35-52%), док је код белаца заступљеност мања и креће се у рангу 13-26% (19,7%) (*Garte u cap., 2001*).

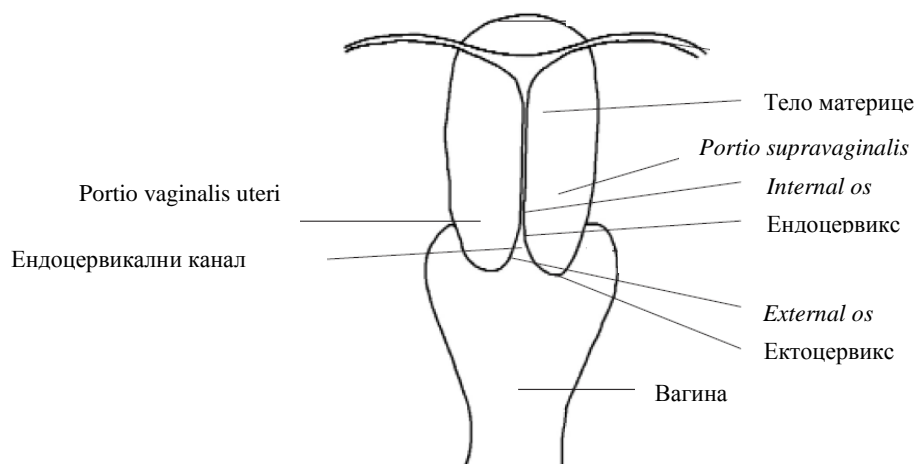
С обзиром на то да продукти GSTT1 и GSTM1 гена имају протективну улогу и штите ћелију од оксидативних оштећења, поставља се питање да ли делециони полиморфизам ових гена повећава ризик за развој канцера. Имајући у виду да карцином грлића материце представља глобални проблем од значаја је да утврди улога полиморфизма GSTT1 и GSTM1 гена у канцерогенези.

1.6. Грлић материце (Cervix uteri)

Грлић материце је дистални део материце који представља везу између материце и вагине; дужине је око 3-4 cm и пречника 2,5 cm, а према облику може бити цилиндричан или коничан. Међутим, облик и величина грлића материце може да варира у току живота жене и зависи од хормоналног статуса, година старости и паритета (*Sellors u Sankaranarayanan, 2003*).

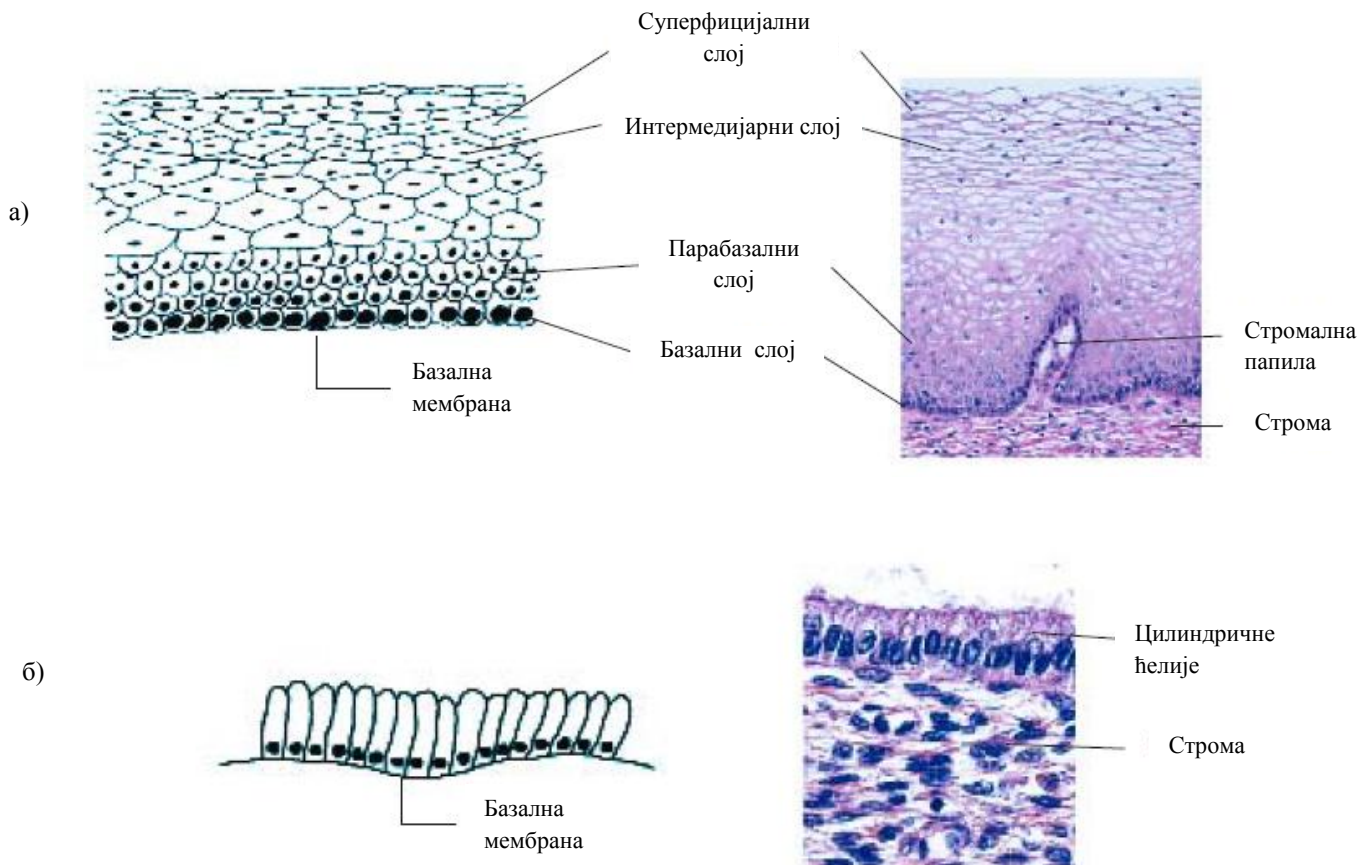
Доња половина грлића материце који се налази у вагини назива се *portio vaginalis uteri* – PVU; док се део грлића који се налази изнад вагине назива *portio supravaginalis*. Материчну дупљу и вагину повезује ендоцервикални канал (пролази

целом дужином ендоцервикса) који се пружа од отвора према вагини (*external os*) до отвора према материци (*internal os*). Део грлића материце који је споља од *external os* назива се ектоцервикс, док је део проксимално од *external os* ендоцервикс (Шема 12) (*Sellors u Sankaranarayanan, 2003*).



Шема 12 – Анатомија грлића материце (преузето и прилагођено, *Sellors u Sankaranarayanan, 2003*)

Грлић материце покривен је са два типа епитела: плочастим и цилиндричним. Плочасти слојевити епител облаже велики део ектоцервикса и састоји се од више слојева ћелија. Са друге стране, цилиндрични епител који чини један слој ћелија облаже ендоцервикс (Шема 13). Врло често због лучења секрета цилиндрични епител назива се жлездани епител (*Sellors u Sankaranarayanan, 2003*).



Шема 13 – а) плочасто-слојевит епител; б) цилиндрични епител (преузето и прилагођено, *Sellors u Sankaranarayanan, 2003*).

Место где се ова два епитела додирују назива се сквамоколумнарна граница. Површина где долази до трансформације цилиндричног епитела у плочасти назива се зона трансформације и ово је место где настаје највећи број премалигних и малигних промена (*Sellors u Sankaranarayanan, 2003*).

1.7. Патолошке промене на грлићу материце

Канцер грлића материце настаје услед промена у ћелијама грлића материце што доводи до неконтролисане пролиферације и сазревања ћелија. Једна од карактеристика овог типа канцера је врло спор развој и у 90% случајева потребно је 10 до 15 година да примарна лезија пређе у инвазивне форме (*Свирачевић и сар., 2000*).

Разликују се два главна хистолошка типа карцинома грлића материце: сквамозни (настаје од ћелија плочастог епитела) и аденокарцином (настаје од ћелија жлезданог епитела). Сквамозни канцер је са око 75% најчешћи облик цервикалног канцера, док је

аденокарцином и аденосквамозни карцином чине око 10-15% свих дијагностикованих цервикалних канцера (*Vizcaino u cap., 1998; Vizcaino u cap., 2000*).

Настанку канцера грлића материце претходе различите форме преканцерогених лезија. Тако се инвазивни сквамозни и аденокарцином развијају постепено кроз преинвазивне лезије, познате као сквамозне интраепителијалне лезије – SIL (squamous intraepithelial lesion) или цервикалне интраепителијалне неоплазије – CIN (cervical intraepithelial neoplasia), односно цервикалне гландуларне интраепителијалне неоплазије – CGIN (cervical glandular intraepithelial neoplasia). У зависности од стадијума, сквамозне интраепителијалне лезије се деле на лезије ниског степена (low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) и лезије високог степена (high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL), односно цервикалне интраепителијалне неоплазије на CIN I – III (*Свирачевић u cap., 2000; Tiltman, 2005*). Иако су ове лезије преинвазивне форме, не развија се свака у инвазивну форму. Наиме, према литературним подацима, у инвазивни канцер напредује само 1% CIN I и >12% CIN III, док оне које не напредују, остају или на истом, или прелазе на нижи стадијум (*Ostor, 1993*).

Слично, CGIN се у зависности од стадијума дели на промене ниског степена (low grade cervical glandular intraepithelial neoplasia – L-CGIN) и високог степена (high grade cervical glandular intraepithelial neoplasia – H-CGIN) у које је укључен и аденокарцином *in situ* (*Tiltman, 2005*).

1.8. Фактори ризика за развој цервикалних лезија

1.8.1. Human papilloma virus (HPV) – најзначајнији фактор ризика

Прва веза између сексуалног понашања, односно гениталне HPV инфекције и цервикалног канцера уочена је од стране Harald zur Hausen, немачког вирусолога добитника Нобелове награде за физиологију и медицину 2008. године (*Nour, 2009*).

HPV су један од најчешћих сексуално преносивих вирусних инфекција на свету и око 80% популације се у току живота инфицира овим вирусом (*Zhang u cap., 2013*). То су вируси сферног облика са дволанчаном ДНК; до данас је описано око 100 HPV (*de Villiers u cap., 2004*) и више од 40 узрокују аногениталне инфекције. Досадашња истраживања су показала да је већина жена са дијагностикованим лезијама на грлићу материце HPV позитивно (*Walboomers u cap., 1999; Evans u cap., 2006; Zuna u cap., 2007; Smith u cap., 2007; Tornesello u cap., 2011; Li u cap., 2011*). Међутим, немају сви

HPV вируси исти онкогени потенцијал, па се на основу свог потенцијала деле у нискоризичне, средњеризичне и високоризичне. Munoz и сарадници (2003) су петнаест HPV вируса класификовали као високоризичне (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82), три су сврстана у групу могућих високоризичних (26, 53 и 66), док је 12 било класификовано као нискоризично (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, и ЦП6108). На основу мета анализа, утврђено је да су HPV16 и HPV18 најчешћи типови HPV вируса у инвазивном цервикалном карциному (*Smith u cap., 2007; Li u cap., 2011*). Обе студије су показале да је HPV16 значајно чешћи код сквамозног типа канцера, док је HPV18 заступљенији код аденокарцинома. Такође, закључено је да је HPV16 најзаступљенији тип вируса код LSIL и HSIL (*Clifford u cap., 2003.; Clifford u cap., 2005*).

1.8.2. Остали фактори ризика

Иако се HPV сматра једним од најважнијих фактора у развоју, само један мали број жена које имају ову инфекцију, у току живота оболи. Мање од 1% клинички детектованих HPV инфекција напредује у цервикални канцер (*Tindle, 2002*). Према проценама на сваких милион жена које имају инфекцију, код приближно 10% ће се развити преканцерозна лезија, од којих ће се код око 8% развити карцином *in situ*, а само код неких жена код којих преканцерозне лезије нису лечене и развити инвазивни цервикални канцер (*Yim u Park, 2006*). Ове претпоставке указују да постоје додатни фактори који имају улогу у развоју цервикалног канцера.

У циљу реанализе доступних података и утврђивања ефекта различитих фактора на развој цервикалног карцинома, 2003. године је формирана ICESCC (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer). Анализом су обухваћени различити егзогени фактори као што су пушење, број сексуалних партнера, паритет, дуга употреба контрацептивних пилула, као и рано ступање у сексуалне односе.

Студија која је обухватила 13541 жена са карциномом грлића материце и 23017 контролних жена из 23 епидемиолошке студије, показала је значајну везу између пушења цигарета и сквамозног канцера (RR=1,60, 95% CI=1,48-1,73), при чему се закључило да је ризик растао упоредо са бројем конзумираних цигарета, као и са раним годинама почетка пушачког стажа, али не и са дужином пушачког стажа. Студија је показала да постоји повећан ризик и код бивших пушача (RR=1,12, 95% CI=1,01-1,25),

али не и да постоји већи ризик код активних или бивших пушача за развој другог хистолошког типа цервикалног канцера, аденокарцинома (*ICESCC, 2006a*).

Имајући у виду репродуктивне факторе, на основу података из 25 епидемиолошких студија, добијени су резултати који указују на директну повезаност између паритета и инвазивног карцинома грлића, као и инверзну повезаност са годинама првог порођаја и инвазивног карцинома грлића (*ICESCC, 2006b*). Резултати *ICESCC (2009)* такође показују да ризик за развој инвазивног карцинома расте са бројем партнера као и са раним ступањем у сексуалне односе.

Један од фактора који повећава ризик за развој инвазивног карцинома је и дуга употреба контрацептивних пилула. Реанализом 24 епидемиолошке студије утврђено је да се ризик повећава са повећањем дужине примене, а да жене које тренутно примењују оралну контрацепцију и примењују је преко 5 година имају скоро дупло повећани ризик за развој цервикалног карцинома у односу на жене које никада нису користиле оралну контрацепцију ($RR=1,90$, $95\% CI=1,69-2,13$) (*ICESCC, 2007a*). Иста студија је показала да до смањења ризика долази са прекидом употребе контрацептивних пилула, као и да се за 10 година од престанка коришћења ризик враћа на ниво присутан код жена које нису никада користиле оралну контрацепцију.

Анализом фактора ризика за два најчешћа хистолошка типа канцера, студија *ICESCC (2007b)* показала је да оба типа карцинома имају исте факторе ризика (број сексуалних партнера, раније ступање у сексуалне односе, паритет, ранија прва трудноћа и дуготрајна употреба контрацептивних пилула), изузев пушења које не представља фактор ризика за инвазивни аденокарцином.

Врло често се, поред HPV, у епидемиолошким студијама анализирају и други инфективни фактори. Утврђено је да HSV-2 (Herpes Simplex Virus) присутнији код жена са инвазивним сквамозним, инвазивним адено и аденосквамозним канцером него код здравих жена. Узимајући у обзир само HPV позитивне жене, присуство HSV-2 повећава за око 2 пута ризик за развој инвазивног сквамозног карцинома ($OR=2,19$, $95\% CI=1,41-3,4$), или за више од три пута за адено/аденосквамозни карцинома ($OR=3,37$, $95\% CI=1,47-7,74$) (*Smith u cap., 2002*). Слични подаци су добијени и за коинфекцију HPV са *Chlamydia trachomatis*. Ризик за развој инвазивног сквамозног карцинома је код ових жена био повећан за 1,80 пута ($95\% CI=1,22-2,66$), док повећаног ризика није било за инвазивни адено и аденосквамозни карцинома ($OR=1,03$, $95\% CI=0,53-2,01$) (*Smith u cap., 2004*). Hawes и сарадници (*2003*) показали су да коинфекција HIV (Human Immunodeficiency Virus) са високоризичним HPV повећава

ризик за развој HSIL или инвазивног цервикалног карцинома, у поређењу са HIV негативним женама. Асоцијација није утврђена код жена без инфекције високоризичним HPV.

1.9. Епидемиологија рака грлића материце

Карцином грлића материце је глобални проблем и са 528000 нових случајева у 2012. години по заступљености био је четврти облик малигнитета код жена у свету. Највећи проценат нових пацијената (85%) бележи се у земљама у развоју, где је стандардизована инциденца 15,7/100000 жена и што је знатно више него инциденца у развијеним земљама (9,9/100000 жена). Према подацима GLOBOCAN-а, 266000 жена је умрло од овог типа малигнитета, са највећим бројем смртних исхода у мање развијеним земљама (87%) са узрасно стандардном стопом морталитета 8,3/100000, што је скоро 2,5 пута виша него у развијеним земљама (3,3/100000) (*Ferlay u cap., 2013*).

На основу података GLOBOCAN-а, а у поређењу са земљама у Европи, Србија је у 2012. години са 1501 новим случајем канцера и старосно стандардизованом стопом инциденце од 23,8/100000 жена, била на четвртном месту, док је са 609 смртних случајева и старосно стандардизоване стопе смртности од 7,7/100000 жена, у тој години била на трећем месту у Европи (*Ferlay u cap., 2013*).

Према епидемиолошким подацима Регистра за рак централне Србије (*2013*), карцином грлића материце чини 7,9 % свих новооткривених малигнух тумора код жена (882 нових случајева), што је треће по учесталости малигно обољење код жена у централној Србији, док је са учесталошћу од 5,5% (347 смртних случајева), карцином грлића материце четврти узрок смртности од малигнух тумора код жена. У периоду 2000-2011. године стандардизована стопа морталитета у централној Србији није варијала (6,8-8/100000 жена), док је у истом периоду стандардизована стопа инциденце била у рангу 14,1-27,2/100000 (*Регистар за рак у централној Србији, 2004,2005а, 2005б, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010а, 2010б, 2011, 2012, 2013*).

2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Имајући у виду значај испитивања хромозомске нестабилности у лимфоцитима периферне крви у процени здравственог стања организма и контрадикторне литературне податке о ефекту GSTT1 и GSTM1 нултих генотипова на развој интрацервикалних лезија грлића материце, основни циљеви ове студије били су да се утврди:

1. Ниво базалног оштећења наследног материјала у лимфоцитима периферне крви новодијагностикованих пацијенткиња са интрацервикалним лезијама грлића материце и здравих контрола применом ЦБМН теста,
2. Корелација између генетичке нестабилности и здравственог стања, демографских карактеристика, животних навика, репродуктивне историје,
3. Да се процени утицај полиморфизма два гена који припадају GST фамилији (GSTT1 и GSTM1) у развоју интрацервикалних лезија. Анализом је обухваћен појединачни ефекат гена, ефекат интеракције анализираних гена, као и ефекат интеракције гена са животним и демографским карактеристикама,
4. Постојање корелације између нивоа базалних оштећења генетичког материјала у лимфоцитима периферне крви и генског профила код испитане популације.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Узорак

Узорак пацијенткиња чиниле су 104 жене са дијагностикованим интрацервикалним лезијама грлића материце (32 LSIL, 33 HSIL и 39 CC – Ca in situ/Ca invasivum), а које су у периоду 2009-2013. године примљене на Клиници за гинекологију и акушерство Клиничког центра Крагујевац и Клиници за гинекологију и акушерство Клиничког центра Ниш.

Контролни узорак сачињавало је 50 здравих жена без историје малигних обољења и интрацервикалних лезија што је потврђено стандардном колпоскопијом и Папаниколау тестом.

Студија је одобрена од стране Етичког комитета Клиничког центра Крагујевца (број одлуке 1/2577) и Медицинског факултета у Нишу (број одлуке 01-5518-1). Студија је реализована у оквиру пројеката Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (евиденциони број 143008). Све пацијенткиње и здраве контроле попуниле су стандардизовани упитник, који је укључивао демографска питања, питања у вези са животним навикама, питања из репродуктивне историје и медицинске историје.

3.2. Процедура ЦБМН теста

За утврђивање нивоа генетичких оштећења у лимфоцитима периферне крви код пацијенткиња и здравих контрола коришћен је цитокинезис блок микронуклеус тест, описан од стране Fenesh и Morley (1985). У стерилном хепаринизованом шприцу из надлактичне вене сваком пацијенту и здравој контроли узето је по 2 ml крви.

Пуна хепаринизована крв (0,5 ml) додата је у 5 ml комплетне подлоге за култивацију лимфоцита периферне крви РВМах Karyotyping (Invitrogen, Калифорнија, САД). За сваку особу постављене су дупле културе које су 72 сата инкубиране на 37° С. У циљу заустављања цитокинезе, 44 сата након почетка инкубације у ћелијске културе је додат цитохалазин Б, у финалној концентрацији од 4 µg/ml. Ћелијске културе су затим инкубиране још 28 сати.

Препарација култура вршена је по стандардном протоколу. Након центрифугирања у трајању од 12 минута на 1800 обртаја, ћелијске суспензије су два пута третиране разблаженим хладним (4°С) хипотоничним раствором KCl (0,56% KCl

+ 0,9% NaCl). Овај третман праћен је центрифугирањем материјала у трајању од 12 минута на 1800 обртаја. Материјал је три пута третиран по 15 минута свеже припремљеним фиксативом (гласијална сирћетна киселина : метанол = 1 : 3). Овако добијена ћелијска суспензија ресуспендована је у малој количини фиксатива, а затим разливена на хладне и чисте предметне плочице. Након иницијалног сушења плочица под лампом и на ваздуху у трајању од три дана, оне су бојене у 2% раствору гимза боје (Алфапон, Нови Сад, Србија) у трајању од 12 минута.

Плочице су анализирани светлосним микроскопом (Nikon E50i) на $\times 400$ увећању. За утврђивање фреквенце микронуклеуса, нуклеусних пупољака и нуклеоплазматских мостова анализирано је 1000 БН ћелија по особи. NDI израчунаван је на 500 ћелија по формули $NDI = ((1 \times M1 + (2 \times M2) + (3 \times M3) + (4 \times M4))/N)$, при чему је $M_1 - M_4$ број ћелија са 1 – 4 једра, N укупан број анализираних вијабилних ћелија (*Fenech, 2000*).

3.3. Мултиплекс PCR (Polymerase Chain Reaction)

ДНК донора изолована је из пуне хепаринизоване крви коришћењем EZ1 DNA Blood 350 μ l Kit (Qiagen, Hilden, Немачка) према упутству произвођача и BioRobot EZ1. Након изоловања ДНК, утврђивана је концентрација изоловане ДНК на биофотометру. Узорци ДНК су чувани на -20°C до извођења PCR реакције.

За анализу GST полиморфизма примењена је мултиплекс PCR метода описана од стране Abdel-Rahman и сарадника (*1996*), са малим модификацијама. ДНК је амплификована у 50 μ l PCR реакционе смеше у присуству 30 pmol прајмера за GSTT1 (5'- TTCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' и 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3') и GSTM1 (5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' и 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3') (Invitrogen, Калифорнија, САД), 200 μ M dNTP (Invitrogen, Калифорнија, САД), 1.5mM MgCl₂, 1X PCR пуфера и 2U Taq polymerase (Invitrogen, Калифорнија, САД). У циљу побољшања PCR реакције, у реакциону смешу додат је глицерол и диметил сулфоксид у финалној концентрацији од 5%. Као интерна контрола успешности PCR реакције, у реакциону смешу додати су прајмери за егзон 7 CYP1A1 гена (5'- GAACTGCCACTTCAGCTGTCT- 3' и 5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC - 3'). PCR реакциона смеша је најпре иницијално денатурирана на 94°C у трајању од 5 минута. Након овог корака, уследила су 35 циклуса денатурације од 2 минута на 94°C , везивање прајмера на 58°C у трајању од 1

минута и екстензије прајмера 1 минут на 72°C. Финална екстензија прајмера трајала је 10 минута на 72°C.

PCR производи су раздвојени и анализирани на 2% агарозном гелу у присуству SYBR Safe DNA gel stain боје (Invitrogen, Калифорнија, САД). Присуство и одсуство GSTT1 и GSTM1 утврђена је присуством и одсуством одговарајућих трака (480 бп за GSTT1 и 215 бп за GSTM1), док је трака од 312 бп која одговара умноженом CYP1A1 гену била увек присутна. Одсуство траке за GSTT1 и GSTM1 указује на хомозиготну делецију гена, док присуство траке указује на присуство гена (хомозиготни или хетерозиготни облик).

3.4. Статистичка обрада података

Резултати ЦБМН теста приказани су као средња вредност \pm стандардна девијација (С.Д), док су подаци добијени мултиплекс PCR-ом приказани бројчано и у процентима. Сви подаци су статистички обрађени статистичким пакетом за обраду података SPSS (Statistical Package for Social Sciences) за Windows, верзија 13. Вредности $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$ су сматране статистички значајним.

Средње вредности фреквенци МН, НП и НПМ и NDI поређене су применом одговарајућег параметарског (Student's t тест) и непараметарског теста (Mann-Whitney U). Ефекти различитих фактора (пушење, године старости, спонтани, намерни побачаји, степен лезије, GST статус) на фреквенцу МН и NDI анализирани су применом мултипле линеарне регресионе анализе. За утврђивање cut off вредности за МН фреквенцу урађена је ROC (Receiver Operating Characteristic) анализа.

Разлике у дистрибуцији GSTT1 и GSTM1 гена поређене су применом χ^2 или Фишеровог теста. Ризик за развој интрацервикалних лезија процењен је помоћу количника шансе (odd ratio, OR) са 95% интервалом поверења (Confidence interval, CI), који је рачунат применом бинарне логистичке регресионе анализе.

4. РЕЗУЛТАТИ

Анализа фреквенце цитогенетичких маркера (МН, НП и НПМ) и дистрибуција МН, НП и НПМ у БН ћелијама извршена је на 136 жена (30 LSIL, 31 HSIL, 34 Ca in situ/Ca invasivum, 41 жена из контролне групе), док је анализа индекса нуклеусне деобе обављена на укупно 146 жена (32 LSIL, 32 HSIL, 37 Ca in situ/Ca invasivum, 45 жена из контролне групе). У студији су из анализе искључене жене код којих није било могуће анализирати 1000 БН ћелија, односно 500 вијабилних ћелија са 1-4 једра.

PCR реакција је била успешна код свих испитиваних жена (32 LSIL, 33 HSIL, 39 Ca in situ/Ca invasivum и 50 жена из контролне групе).

Резултати студије приказани су у Табелама 1-15 као и на Графицима 1-22.

Основне карактеристике анализираног узорка приказане су у Табели 1. Узорак су сачињавале 154 жене (32 LSIL, 33 HSIL и 39 CC и 50 контрола). Најстарију групу чине жене које имају дијагностиковане Ca in situ/Ca invasivum, затим следи група жена са LSIL, контролна група жена, док су најмлађу групу чиниле жене са HSIL (51,26±11,32; 43,37±10,88; 42,98±8,26; 38,97±10,74, ретроспективно).

Изузев LSIL групе (37,5% у односу на 62,5%) у свим осталим групама забележен је већи проценат жена пушача у односу на непушаче. Највећи проценат пушача био је у групи HSIL (63,64%). Сличан проценат жена са пушачким навикама забележен је и у групи Ca in situ/Ca invasivum (61,54%), док је нешто нижи проценат у контролној групи (54%). Подаци о годинама пушења као и броју дневно конзумираних цигарета нису били доступни за све испитанице па су средње вредности су израчунаване само на основу доступних података. Најдужи пушачки стаж 20,11±8,06 (ранг од 10 до 40 година) са просечно 15,64±8,25 цигарета дневно (ранг од 1 до 40) забележен је у узорку контролне групе жена. Ову групу следиле су група са дијагностикованим Ca in situ/Ca invasivum (18,86±10,17 година, опсега 2,5-42 и 14,44±9,16 цигарета дневно са рангом 2-40), након које следи HSIL група (15,45±8,22 година са рангом 5-35, 17,42±5,85 цигарета дневно са рангом 5-30) и на крају је група са дијагностикованим LSIL (14,23±10,51 година и рангом 3-30, 14,08±7,09 цигарета дневно и рангом 1,5-22,5).

Имајући у виду репродуктивну историју, подаци су били доступни за све испитанице. У свим испитиваним групама био је већи проценат жена које нису имале

спонтане побачаје, док је само у групи LSIL проценат жена са намерним побачајима био већи у односу на оне које нису имале намерне побачаје.

HPV анализа је рађена само за мали број пацијенткиња (21 – 8 LSIL, 10 HSIL, 3 Ca in situ/Ca invasivum), док ова анализа није рађена ни за једну жену из контролне групе. Од 8 пацијенткиња са дијагностикованим LSIL и 10 са HSIL дијагнозом, HPV је детектован код већине пацијенткиња (6 – 75% и 8 – 80%, ретроспективно), док је резултат HPV анализе код пацијенткиња са дијагнозом карцинома био негативан.

Табела 1 – Основне карактеристике испитиване популације жена

	LSIL ¹	HSIL ²	Ca in situ/Ca invasivum	Контроле
Укупан број испитаница	32	33	39	50
Старост ($\bar{x} \pm \text{С.Д}$ ранг)	43,37 \pm 10,88 (24-64)	38,97 \pm 10,74 (24-65)	51,26 \pm 11,32 (21-77)	42,98 \pm 8,26 (24-62)
Пушачке навике				
Пушач (%)	12 (37,5)	21(63,64)	24 (61,54)	27 (54)
Пушачки стаж (ранг година)	14,23 \pm 10,51 (3-30)	15,45 \pm 8,22 (5-35)	18,86 \pm 10,17 (2,5-42)	20,11 \pm 8,06 (10-40)
Број цигарета/дан (ранг)	14,08 \pm 7,09 (1,5-22,5)	17,42 \pm 5,85 (5-30)	14,44 \pm 9,16 (2-40)	15,11 \pm 8,53 (1-40)
Непушач (%)	20 (62,5)	12 (36,36)	15 (38,46)	23 (46)
Репродуктивна историја				
Спонтани побачаји				
Да (%; ранг)	10 (31,25; 1-2)	10 (30,30; 1-3)	10 (25,64; 1-4)	10 (20; 1-2)
Не (%)	22 (68,75)	23 (69,70)	29 (74,36)	40 (80)
Намерни побачаји				
Да (%; ранг)	23 (71,87; 1-7)	16 (48,48; 1-4)	19 (48,72; 1-10)	18 (36; 1-5)
Не (%)	9 (28,13)	17 (51,52)	20 (51,28)	32 (64)
HPV³(испитивано)	8	10	3	-
HPV позитивно (%)	6 (75)	8 (80)	0 (0)	-
HPV негативно (%)	2 (25)	2 (20)	3 (100)	-

¹Low grade squamous intraepithelial lesions ; ²High grade squamous intraepithelial lesions; ³Human papiloma virus

У Табелама 2-5 приказане су основне демографске карактеристике, животне навике, основни медицински подаци као и резултати три теста: ЦБМН, PCR и HPV појединачно за сваку жену.

Фреквенца МН/1000 БН ћелија у групи пацијенткиња са LSIL дијагнозом кретала се у опсегу 6-23. НППМ забележени су код 12 пацијенткиња (ранг 1-2 на 1000 БН ћелија), а НП су уочени код три пацијенткиње (1-2 на 1000 БН ћелија). Вредности NDI кретале су се у опсегу 1,58-1,83 (Табела 2).

У HSIL групи најмања уочена фреквенца МН била је 6 МН/1000 БН ћелија, а највећа 26 МН/1000 БН ћелија. Код 13 пацијенткиња су уочени НППМ (ранг 1-2 на 1000 БН ћелија), док су само код 2 пацијенткиње уочени НП (1/1000 БН ћелија). Вредности NDI кретале су се у опсегу 1,48-1,86 (Табела 3).

Фреквенца МН/1000 БН ћелија у групи пацијенткиња са дијагнозом карцинома кретала се у опсегу 10-23. Код 6 пацијенткиња су уочени НППМ (ранг 1-2 на 1000 БН ћелија), а код истог броја пацијенткиња уочени су и НП у БН ћелијама (ранг 1-2 на 1000 БН ћелија). Вредности NDI кретале су се у опсегу 1,24-1,86 (Табела 4).

У контролној групи фреквенца МН варирала је од 3 до 16 МН/1000 БН ћелија. НППМ су уочени само код 2 жене (1 НППМ/1000 БН ћелија), а НП код 7 жена (ранг 1-2 на 1000 БН ћелија). Вредности NDI кретале су се у опсегу 1,45-1,89 (Табела 5).

Табела 2 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова код пацијенткиња са дијагностикованим лезијама на грлићу материце – LSIL

Ред. број	Год	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БНМН	Дистрибуција МН					NDI	Генотип GST ³		HPV ⁴
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН	4МН	5МН		T1	M1	
1.	37	0	0	0	0	18	0	0	15	12	3	0	0	0	1,71	0	1	-
2.	50	0	0	0	2	11	0	0	11	11	0	0	0	0	1,70	1	0	-
3.	58	0	0	0	1	13	0	0	13	13	0	0	0	0	1,74	1	0	-
4.	64	0	0	0	1	20	0	2	16	13	2	1	0	0	1,67	1	0	-
5.	52	0	0	0	0	20	0	1	19	18	1	0	0	0	1,70	0	1	-
6.	54	0	0	0	4	13	0	0	11	10	0	1	0	0	1,69	1	1	-
7.	24	0	0	0	0	15	0	2	14	13	1	0	0	0	1,77	0	0	-
8.	28	3	10	1	2	12	0	2	12	12	0	0	0	0	1,78	1	0	-
9.	35	0	0	1	0	11	0	0	11	11	0	0	0	0	1,70	0	1	-
10.	50	0	0	0	4	16	0	0	13	11	1	1	0	0	1,75	0	0	-
11.	49	0	0	0	3	20	0	0	20	20	0	0	0	0	1,65	1	1	-
12.	49	25	20-25	0	4	18	1	1	17	16	1	0	0	0	1,68	0	0	-
13.	54	0	0	0	2	23	2	0	16	14	0	0	1	1	1,64	0	0	1
14.	28	8	10	0	2	11	0	0	11	11	0	0	0	0	1,70	1	0	-
15.	50	30	20	0	1	4 ¹	1	0	4	4	0	0	0	0	1,69	1	0	0
16.	27	0	0	0	1	10	0	1	10	10	0	0	0	0	1,75	1	0	-
17.	37	0	0	0	0	10	1	0	10	10	0	0	0	0	1,66	1	0	-
18.	50	0	0	1	2	13	0	0	13	13	0	0	0	0	1,68	0	0	-
19.	30	7	20	1	2	6	0	0	6	6	0	0	0	0	1,67	0	1	-
20.	33	16	20	0	2	11	0	2	11	11	0	0	0	0	1,75	0	0	-
21.	39	0	0	2	1	15	0	1	14	13	1	0	0	0	1,69	1	0	1
22.	55	0	0	1	7	6 ²	0	1	5	4	1	0	0	0	1,83	1	1	-
23.	51	-	1-2	0	1	18	0	1	16	14	2	0	0	0	1,78	0	0	1
24.	55	0	0	0	2	12	0	0	10	9	0	1	0	0	1,79	1	0	-

Наставак Табела 2																		
Ред. број	Год	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БНМН	Дистрибуција МН					NDI	Генотип GST ³		HPV ⁴
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН	4МН	5МН		T1	M1	
25.	36	4-5	10	0	0	9	0	0	8	7	1	0	0	0	1,77	1	0	1
26.	46	30	20	2	3	17	0	2	17	17	0	0	0	0	1,72	1	0	1
27.	46	0	0	1	7	16	0	0	14	12	2	0	0	0	1,58	0	0	1
28.	53	0	0	0	0	7	0	0	7	7	0	0	0	0	1,80	0	0	0
29.	34	3	5	0	0	7	0	0	7	7	0	0	0	0	1,79	0	0	-
30.	31	10	20	2	2	7	0	1	7	7	0	0	0	0	1,67	1	0	-
31.	32	0	0	0	0	8	0	0	8	8	0	0	0	0	1,68	1	0	-
32.	51	20	10	2	2	15	0	0	15	15	0	0	0	0	1,65	1	0	-

¹ фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 338 БН ћелија, ² фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 762 БН ћелија, ³0 – непостојање гена, 1 – присуство гена, ⁴0 – HPV негативна, 1 – HPV позитивна, - нема података

Табела 3 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова код жена са дијагностикованим лезијама на грлићу материце – HSIL

Ред. број	Год.	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БМНН	Дистрибуција МН			NDI	Генотип GST ²		HPV ³
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН		T1	M1	
1.	45	0	0	1	2	16	0	0	16	16	0	0	1,69	1	1	-
2.	35	20	20	0	1	12 ¹	0	0	9	6	3	0	1,69	1	0	-
3.	35	15	15-20	0	1	11	0	0	10	9	1	0	1,68	1	1	-
4.	35	15	15-20	0	0	14	0	0	12	10	2	0	1,69	1	0	-
5.	48	15	7-10	0	3	17	0	1	17	17	0	0	1,73	1	0	-
6.	29	5	5	0	4	13	0	1	13	13	0	0	1,63	1	1	0
7.	41	20	10-15	0	3	16	0	1	15	14	1	0	1,66	1	1	-
8.	38	0	0	3	2	24	1	1	22	20	2	0	1,70	1	0	-
9.	37	10	20	0	1	26	0	0	25	24	1	0	1,70	0	0	0
10.	33	0	0	0	2	14	1	1	13	12	1	0	1,64	1	0	1
11.	49	0	0	1	4	22	0	0	19	16	3	0	1,79	1	0	-
12.	34	0	0	1	0	15	0	0	12	10	1	1	1,57	1	0	-
13.	65	30	30	1	3	20	0	0	18	17	0	1	1,73	0	0	-
14.	33	5	10	0	0	11	0	1	11	11	0	0	1,65	1	0	-
15.	62	0	0	2	0	21	0	0	19	17	2	0	1,68	0	0	-
16.	47	20	15-20	1	0	12	0	0	11	10	1	0	1,48	0	1	-
17.	44	-	-	1	0	16	0	0	13	10	3	0	1,74	0	1	-
18.	58	20	10	0	4	14	0	0	14	14	0	0	1,67	0	0	-
19.	24	6	20	0	0	18	0	0	12	9	0	3	1,69	1	0	1
20.	46	0	0	0	2	14	0	1	14	14	0	0	1,73	0	0	-
21.	27	10	20	1	0	14	0	0	12	11	0	1	1,75	0	0	-
22.	32	15	20	2	0	12	0	0	12	12	0	0	1,55	1	0	1
23.	24	6	15	0	0	11	0	0	11	11	0	0	1,67	1	0	1
24.	42	0	0	0	0	9	0	0	9	9	0	0	1,79	1	1	-

Наставак Табела 3																
Ред. број	Год.	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БМНН	Дистрибуција МН			NDI	Генотип GST ²		HPV ³
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН		T1	M1	
25.	36	0	0	0	0	14	0	0	13	12	1	0	1,82	1	0	-
26.	27	14	25	0	0	9	0	2	8	7	1	0	1,71	0	0	1
27.	47	25	20	0	2	14	0	1	14	14	0	0	1,68	1	0	-
28.	35	15	20	0	0	13	0	1	12	11	1	0	1,83	0	0	1
29.	52	35	20	0	0	18	0	1	18	18	0	0	1,51	0	1	-
30.	43	0	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	- ⁴	1	0	-
31.	25	8	20	0	1	12	0	1	12	12	0	0	1,86	1	0	1
32.	24	0	0	0	0	8	0	2	8	8	0	0	1,83	1	0	1
33.	34	0	0	0	0	6	0	0	5	4	1	0	1,79	0	0	-

¹ фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 740 БН ћелија, ² 0 – непостојање гена, 1 – присуство гена, ³ 0 – HPV негативна, 1 – HPV позитивна, - нема података, ⁴ – ЦБМН тест није успео

Табела 4 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова код жена са дијагностикованим лезијама на грлићу материце – Ca in situ/Ca invasivum

Ред. број	Год.	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БНМН	Дистрибуција МН				NDI	Генотип GST ⁴		HPV ⁵
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН	4МН		T1	M1	
1.	40	15	20	0	2	14	0	0	13	12	1	0	0	1,73	1	0	-
2.	57	20-30	10-20	0	0	17	0	0	17	17	0	0	0	1,60	1	1	-
3.	62	0	0	0	0	23	0	2	21	20	0	1	0	1,75	1	0	-
4.	61	0	0	1	1	16	0	0	15	14	1	0	0	1,73	0	0	-
5.	53	0	0	0	1	8 ¹	0	0	7	6	1	0	0	1,67	0	0	0
6.	52	0	0	4	0	17	0	0	17	17	0	0	0	1,67	1	0	-
7.	31	0	0	2	0	4 ²	0	0	4	4	0	0	0	-	1	1	-
8.	44	20	10	0	4	18	2	0	18	18	0	0	0	1,76	1	0	-
9.	60	40	30	0	6	16	1	0	15	14	1	0	0	1,64	1	0	-
10.	53	0	0	0	1	10	0	0	10	10	0	0	0	1,77	1	0	-
11.	67	10	2	0	1	14 ³	0	0	13	12	1	0	0	1,64	0	0	-
12.	51	25	20	0	0	14	0	0	13	12	1	0	0	1,86	1	0	-
13.	61	15	3	0	0	19	0	1	15	13	1	0	1	1,68	0	0	-
14.	48	0	0	0	0	11	0	1	10	9	1	0	0	1,58	1	1	-
15.	43	11	10	0	0	13	0	0	12	11	1	0	0	1,76	1	0	-
16.	58	15	3-5	1	5	14	0	0	12	10	2	0	0	1,56	1	1	-
17.	62	0	0	0	0	16	0	0	16	16	0	0	0	1,75	1	0	-
18.	63	0	0	0	0	13	0	0	13	13	0	0	0	1,71	0	0	-
19.	42	0	0	0	1	13	0	1	12	11	1	0	0	1,47	1	0	-
20.	58	30	20	0	2	20	0	0	17	14	3	0	0	1,81	0	1	-
21.	63	0	0	1	0	14	1	0	14	14	0	0	0	1,70	1	1	-
22.	49	20	10	0	0	13	1	0	12	11	1	0	0	1,82	1	1	-

Наставак Табела 4																	
Ред. број	Год.	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БНМН	Дистрибуција МН				NDI	Генотип GST ⁴		HPV ⁵
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН	4МН		T1	M1	
23.	41	20	10	0	0	13	0	0	12	11	1	0	0	1,75	1	1	-
24.	55	4	7	0	1	15	0	1	15	15	0	0	0	1,82	0	0	-
25.	46	25	20	0	1	17	0	0	15	14	0	1	0	1,32	0	0	-
26.	50	2-3	15-20	0	3	14	0	0	14	14	0	0	0	1,48	0	0	-
27.	77	0	0	1	1	17	0	1	16	15	1	0	0	1,59	0	0	-
28.	46	-	20	0	0	21	0	0	20	19	1	0	0	1,30	0	0	-
29.	62	42	40	0	4	10 ⁶	0	0	10	10	0	0	0	1,33	0	0	0
30.	21	3	15	0	0	14	0	0	11	8	3	0	0	1,24	1	0	0
31.	37	10	7	0	0	12	2	0	12	12	0	0	0	1,26	1	1	-
32.	33	0	0	1	1	10	0	0	10	10	0	0	0	1,74	1	1	-
33.	59	30	20	0	6	13	0	0	13	13	0	0	0	1,67	0	1	-
34.	59	15	5-6	1	0	19	0	0	18	17	1	0	0	1,54	1	0	-
35.	41	0	0	1	2	16	1	0	15	14	1	0	0	1,68	1	0	-
36.	59	20	2-3	0	10	14	0	0	14	14	0	0	0	1,56	1	1	-
37.	51	20	20	0	0	11	0	0	11	11	0	0	0	1,61	0	0	-
38.	35	16	15-20	1	0	10	0	0	10	10	0	0	0	1,80	1	0	-
39.	49	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	- ⁷	1	0	-

¹фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 463 БН ћелија, ² фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 260 БН ћелија, ³фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 791 БН ћелија, ⁴0 – непостојање гена, 1 – присуство гена, ⁵0 – HPV негативна, 1 – HPV позитивна, - нема података, ⁶ фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 890 БН ћелија, ⁷ – ЦБМН тест није успе

Табела 5 – Основне демографске и животне карактеристике и резултати примењених тестова у контролној групи жена

Ред. број	Год.	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БНМН	Дистрибуција МН				NDI	Генотип GST ⁵	
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН	4МН		T1	M1
1.	32	10	10	0	1	14	0	0	11	10	0	0	1	1,45	0	0
2.	24	0	0	0	0	8	0	0	8	8	0	0	0	1,53	0	1
3.	31	0	0	0	1	7 ¹	0	0	7	7	0	0	0	1,53	0	0
4.	29	10	10-15	0	0	9	0	0	9	9	0	0	0	1,53	1	0
5.	40	0	0	0	0	9	0	0	8	7	1	0	0	1,84	0	0
6.	42	20	20	0	0	7	1	0	7	7	0	0	0	1,84	0	1
7.	42	0	0	0	0	5	0	0	5	5	0	0	0	1,79	1	1
8.	46	31	20	0	0	9	0	0	8	7	1	0	0	1,75	1	0
9.	53	0	0	1	2	9	1	0	8	7	1	0	0	1,78	1	0
10.	43	20	3-4	1	0	5	0	1	5	5	0	0	0	1,68	1	0
11.	53	0	0	0	3	3 ²	0	0	3	2	1	0	0	1,65	0	1
12.	42	15	10	0	0	9	0	0	9	9	0	0	0	1,50	1	0
13.	44	25	15	0	0	2 ³	0	0	2	2	0	0	0	1,55	0	0
14.	45	0	0	0	0	7	0	0	6	5	1	0	0	1,86	1	0
15.	44	25	6-7	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	- ⁴	0	0
16.	50	15	15-20	0	2	3	0	0	3	3	0	0	0	1,78	1	0
17.	38	-	20	0	3	5	0	0	4	3	1	0	0	1,89	1	0
18.	47	0	0	0	5	8	0	1	8	8	0	0	0	1,73	1	0
19.	52	15	10	1	2	8	0	0	7	6	1	0	0	1,77	1	0
20.	42	22	20	0	1	6	0	0	5	4	1	0	0	1,72	1	0
21.	51	0	0	1	0	16	0	0	13	11	1	1	0	1,72	1	0
22.	56	0	0	0	0	10	0	0	10	10	0	0	0	1,71	1	1
23.	58	10	3	0	0	10	0	0	10	10	0	0	0	1,76	1	1
24.	40	15	20	0	2	7	0	0	6	5	1	0	0	1,77	1	1

Наставак Табела 5																
Ред. број	Год.	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БНМН	Дистрибуција МН				NDI	Генотип GST ⁴	
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН	4МН		T1	M1
25.	53	20	40	0	0	7	0	0	7	7	0	0	0	1,72	0	1
26.	51	30	20	0	3	2 ⁵	0	0	2	2	0	0	0	1,77	0	0
27.	41	10	1	1	1	10	0	0	10	10	0	0	0	1,84	1	1
28.	45	20	15	2	0	9	0	0	7	5	2	0	0	1,71	1	0
29.	45	0	0	1	0	3	0	0	3	3	0	0	0	1,72	1	0
30.	44	25	20-30	0	2	8	1	0	8	8	0	0	0	1,83	1	1
31.	44	0	0	0	1	7	0	0	5	3	2	0	0	1,66	0	1
32.	51	30	20	0	0	10	0	0	10	10	0	0	0	1,53	1	1
33.	46	25	20	1	1	8	0	0	8	8	0	0	0	1,82	1	0
34.	47	20	10-20	0	0	10	0	0	8	6	2	0	0	1,70	1	1
35.	44	0	0	1	0	8	1	0	8	8	0	0	0	1,84	0	0
36.	51	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
37.	50	30	10	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
38.	46	0	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1
39.	35	0	0	0	0	7	0	0	7	7	0	0	0	1,80	0	1
40.	28	0	0	0	0	5	0	0	5	5	0	0	0	1,66	1	0
41.	34	10	10	0	0	6	0	0	6	6	0	0	0	1,72	1	1
42.	35	0	0	0	0	4	0	0	4	4	0	0	0	1,73	1	0
43.	40	0	0	0	0	7	1	0	7	7	0	0	0	1,67	0	0
44.	37	20	15-20	0	1	7	0	0	7	7	0	0	0	1,67	1	0
45.	36	0	0	0	0	10	1	0	9	8	1	0	0	1,80	1	1
46.	31	0	0	0	0	4	0	0	4	4	0	0	0	1,70	1	0

Наставак Табела 5																
Ред. број	Год.	Пушачки стаж (година)	Број цигарета	Репродуктивна историја		Цитогенетички биомаркери			БНМН	Дистрибуција МН				NDI	Генотип GST ⁴	
				Спонтани побачаји	Намерни побачаји	МН	НП	НПМ		1МН	2МН	3МН	4МН		T1	M1
47.	43	10	1-2	0	0	6	0	0	6	6	0	0	0	1,70	0	1
48.	37	0	0	0	0	10	2	0	10	10	0	0	0	1,81	0	1
49.	62	40	20-30	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1
50.	29	0	0	0	0	7	0	0	7	7	0	0	0	1,78	0	1

¹фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 864 БН ћелија, ² фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 374 БН ћелија, ³фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 452 БН ћелија, ⁴0 – непостојање гена, 1 – присуство гена, ⁵фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НП, НПМ) и дистрибуција МН анализирана на 566 БН ћелија

На Графицима 1-3 приказан је број пацијенткиња са дијагностикованим интрацервикалним лезијама у односу на године старости. Највећи број пацијенткиња са LSIL био је старости 50-54 година (10 пацијенткиња), док је најмањи број жена са овим стадијумом лезија старости 20-24 године (1 пацијенткиња) и 60-64 године старости (1 пацијенткиња). Највећи број пацијенткиња са HSIL дијагнозом био је старости 35-39 (7 пацијенткиња) (График 4). Највећа учесталост пацијенткиња са карциномом била је у старости 60-64 година (График 5).

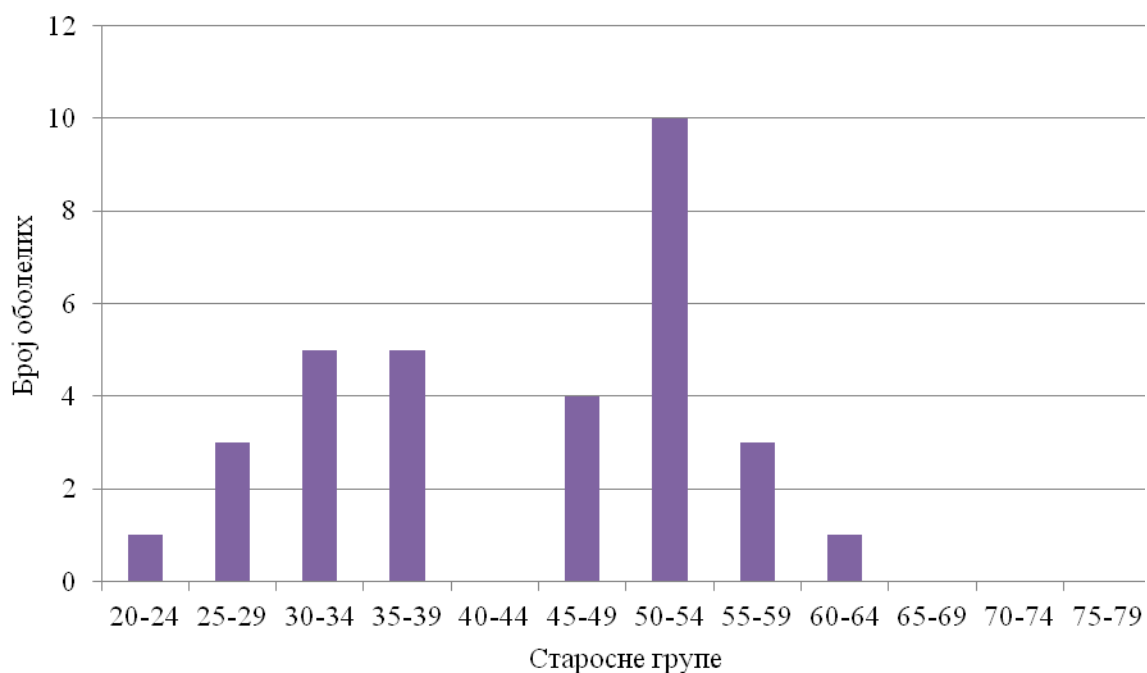


График 1– Број оболелих од интрацервикалних лезија грлића материце – LSIL према узрасту

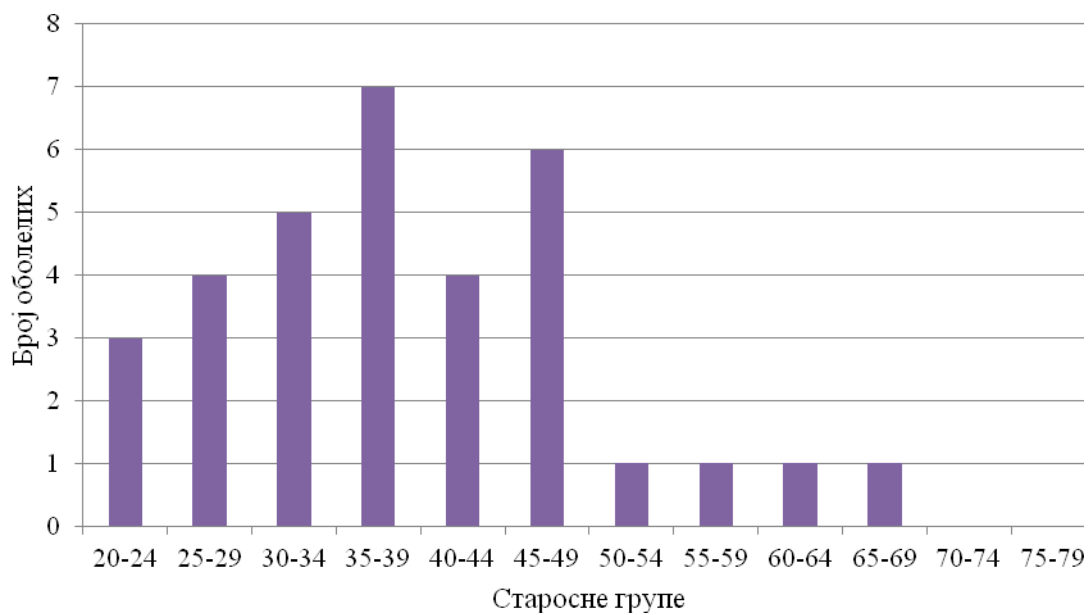


График 2 – Број оболелих од интрацервикалних лезија грлића материце – HSIL према узрасту

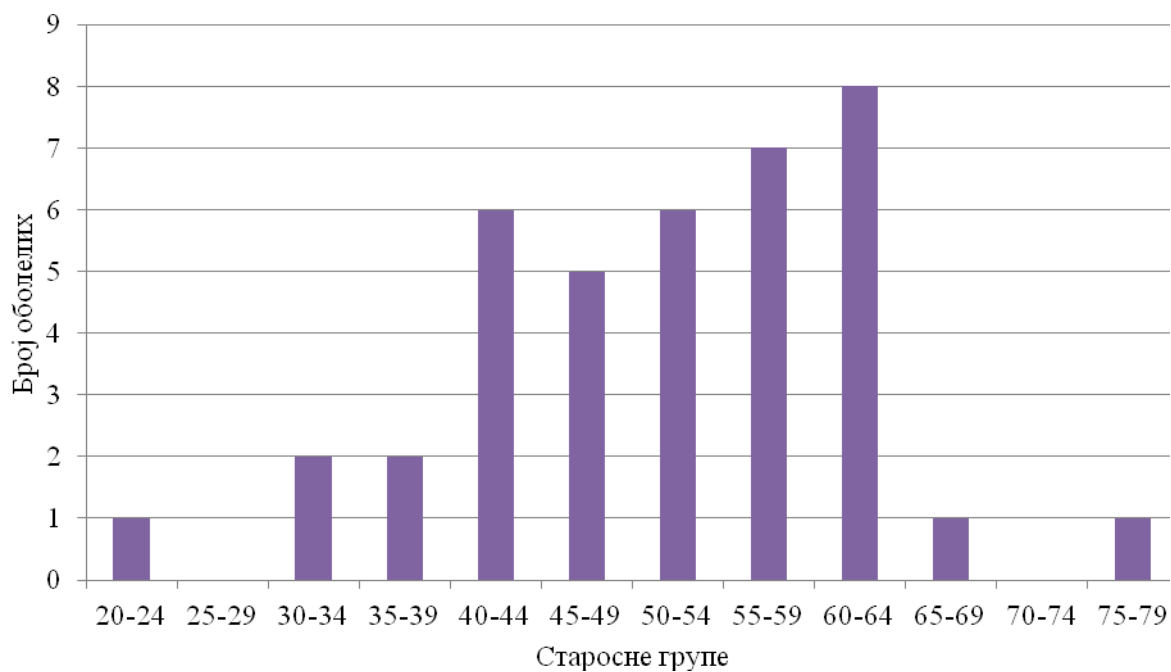


График 3 – Број оболелих од интрацервикалних лезија грлића материце – Ca in situ/Ca invasivum према узрасту

У Табели 6 Графицима 4-6 приказане су средње вредности цитогенетичких маркера (МН, НП, НПМ) на 1000 БН ћелија у зависности од здравственог стања, демографских, медицинских и животних карактеристика.

Највећа фреквенца МН забележена је у групи пацијенткиња са дијагнозом *Ca in situ* и *Ca invasivum* ($14,91 \pm 3,17$ МН/1000 БН), затим у HSIL ($14,64 \pm 4,56$ МН/1000 БН) и LSIL ($13,40 \pm 4,54$ МН/1000 БН). Најмања фреквенца МН забележена у контролној групи жена ($7,73 \pm 2,60$ МН/1000 БН). Статистичком обрадом добијених података утврђена је статистички значајна разлика у МН фреквенцама између контроле и појединачно свих група пацијенткиња ($p < 0,0005$). Поређењем МН фреквенце између група пацијенткиња нису добијени статистички значајне разлике ($p > 0,05$).

Највећа фреквенца НП забележена је у групи пацијенткиња са дијагнозом *Ca in situ* и *Ca invasivum* ($0,23 \pm 0,55/1000$ БН), док је најмања фреквенца овог маркера забележена у HSIL групи пацијенткиња ($0,06 \pm 0,25/1000$ БН). У међусобном поређењу добијених података, статистички значајна разлика није утврђена између контроле и група пацијенткиња, као и између жена са различитим хистолошким стадијумима лезија ($p > 0,05$).

Фреквенца НПМ у лимфоцитима периферне крви континуирано је опадала са растом степена интрацервикалне лезије ($0,53 \pm 0,78$ LSIL; $0,48 \pm 0,62$ HSIL; $0,21 \pm 0,48$ *Ca in situ* и *Ca invasivum*). Најмања фреквенца уочена је у контролној групи жена ($0,05 \pm 0,22$). У поређењу са контролном групом жена, фреквенца НПМ је статистички значајно већа само у LSIL групи и HSIL групи ($p < 0,01$ и $p < 0,0005$). Статистички значајно већа фреквенца НПМ уочена је у HSIL групи у односу на *Ca in situ* и *Ca invasivum* групу ($p < 0,05$).

Анализом добијених података показано је да пушење цигарета није значајно утицало на фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња. Већа фреквенца МН у лимфоцитима забележена је код непушача у односу на пушаче ($14,52 \pm 4,53$ у односу на $14,21 \pm 3,80$; $p > 0,05$). Незнатно већа фреквенца НП је забележена код непушача ($p > 0,05$), слично разлика у фреквенци НПМ није уочена ($p > 0,05$).

Пацијенткиње које су имале спонтане побачаје у току репродуктивног периода имале су незнатно веће фреквенце МН у лимфоцитима, док су фреквенце друга два анализирана параметра биле веће код жена које нису имале спонтане побачаје у току репродуктивног периода, али без статистичке значајности ($p > 0,05$).

Испитиване пацијенткиње су анализиране и на основу историје намерних побачаја. Веће фреквенце МН, НП, НПМ уочене су код пацијенткиња које су имале намерне побачаје у току репродуктивног периода у односу на жене које нису имале намерне побачаје, али забележене разлике у фреквенцама нису биле статистички значајне ни за један цитогенетички маркер ($p>0,05$).

Као један од потенцијалних фактора који може да модулира фреквенцу цитогенетичких маркера у анализу су укључене и године старости. У групи пацијенткиња, жене >45 година имале су значајно већу фреквенцу МН у поређењу са МН фреквенцом код пацијенткиња ≤ 45 година старости ($15,88\pm 3,57$ у односу на $12,72\pm 4,07$; $p<0,0005$). Супротно, фреквенце НП и НПМ биле су незначајно веће код жена ≤ 45 година старости ($p>0,05$).

У контролном узорку, утицај пушења на фреквенцу цитогенетичких параметара анализиран је код 41 жене (19 непушача и 22 пушача). Незнатно већа фреквенца МН је забележена код пушача у поређењу са непушачима ($7,86\pm 0,23$ у односу на $7,58\pm 2,93$; $p>0,05$). Супротно, незнатно веће фреквенце НП и НПМ забележене су у групи непушача ($p>0,05$).

У контролној групи, жене које су имале спонтане побачаје у току репродуктивног периода имале су веће фреквенце сва три цитогенетичка маркера у поређењу са женама без спонтаних побачаја, али без статистичке значајности ($p>0,05$). У погледу намерних побачаја и фреквенце МН, НП и НПМ, изузев за фреквенцу НПМ, која је незнатно већа у групи жена које су имале бар један намерни побачај, фреквенце осталих маркера су незначајно веће у групи жена које у току свог репродуктивног периода нису имале намерне побачаје ($p>0,05$).

Слично као у испитиваној популацији пацијенткиња, и у контролној групи жена >45 година старости фреквенца МН је била значајно већа него у групи жена ≤ 45 година старости ($9,00\pm 2,95$ у односу на $7,21\pm 2,29$; $p<0,05$). Већа фреквенца НП уочена је у млађој групи, док је фреквенца НПМ већа у старијој групи, али без статистичке значајности ($p>0,05$).

Табела 6 - Средње вредности фреквенце микронуклеуса (МН), нуклеусних пупољака (НП) и нуклеоплазматских мостова (НПМ) у лимфоцитима периферне крви у зависности од демографских, медицинских и животних карактеристика

Фактор	Пацијенткиње				Контроле			
	N ^o	Средња вредност±С.Д/1000 БН ћелија (ранг)			N ^o	Средња вредност±С.Д/1000 БН ћелија (ранг)		
		МН	НП	НПМ		МН	НП	НПМ
Стадијум лезија								
LSIL	30	13,40±4,54 (6-23)	0,13±0,43 (0-2)	0,53±0,78 (0-2)	41	7,73±2,60 (3-16)	0,19±0,46 (0-2)	0,05±0,22 (0-1)
HSIL	31	14,64±4,56 (6-26)	0,06±0,25 (0-1)	0,48±0,62 (0-2)				
Ca in situ/Ca invasivum	34	14,91±3,17 (10-23)	0,23±0,55 (0-2)	0,21±0,48 (0-2)				
p		0,290 ¹ ; 0,133 ² ; 0,784 ³	0,595 ⁴ 0,385 ⁵ 0,160 ⁶	0,960 ⁷ 0,064 ⁸ 0,035 ⁹		<0,0005 ¹⁰	0,424 ¹¹ 0,174 ¹² 0,897 ¹³	0,001 ¹⁴ 0,0005 ¹⁵ 0,073 ¹⁶
Пушачке навике								
Непушач	42	14,52±4,53 (6-24)	0,17±0,44 (0-2)	0,40±0,66 (0-2)	19	7,58±2,93 (3-16)	0,32±0,58 (0-2)	0,05±0,23 (0-1)
Пушач	53	14,21±3,80 (6-26)	0,13±0,44 (0-2)	0,40±0,63 (0-2)	22	7,86±2,33 (3-14)	0,09±0,29 (0-1)	0,04±0,21 (0-1)
p		0,821	0,495	0,967		0,731	0,139	0,916
Репродуктивна историја								
Спонтани побачаји								
Не	67	14,12±4,11 (6-26)	0,16±0,48 (0-2)	0,45±0,66 (0-2)	32	7,53±2,28 (3-14)	0,19±0,47 (0-2)	0,03±0,18 (0-1)
Да	28	14,89±4,17 (6-24)	0,11±0,31 (0-1)	0,28±0,60 (0-2)	9	8,44±3,57 (3-16)	0,22±0,44 (0-1)	0,11±0,33 (0-1)
p		0,283	0,814	0,197		0,358	0,682	0,332

Наставак Табела 6								
	Пацијенткиње				Контроле			
Фактор	№	Средња вредност±С.Д/1000 БН ћелија (ранг)			№	Средња вредност±С.Д/1000 БН ћелија (ранг)		
		МН	НП	НПМ		МН	НП	НПМ
<i>Намерни побачаји</i>								
Не	44	13,54±4,13 (6-23)	0,11±0,39 (0-2)	0,32±0,64 (0-2)	28	7,75±2,65 (3-16)	0,21±0,50 (0-2)	0,03±0,19 (0-1)
Да	51	15,04±4,02 (6-26)	0,18±0,48 (0-2)	0,47±0,64 (0-2)	13	7,69±2,59 (3-14)	0,15±0,37 (0-1)	0,08±0,28 (0-1)
p		0,078	0,480	0,132		0,832	0,814	0,573
<i>Године</i>								
≤ 45	46	12,72±4,07 (6-26)	0,17±0,48 (0-2)	0,46±0,69 (0-2)	29	7,21±2,29 (3-14)	0,24±0,51 (0-2)	0,03±0,18 (0-1)
>45	49	15,88±3,57 (7-23)	0,12±0,39 (0-1)	0,35±0,60 (0-2)	12	9,00±2,95 (3-16)	0,08±0,29 (0-1)	0,08±0,29 (0-1)
p		<0,0005	0,648	0,460		0,043	0,335	0,514

¹LSIL у односу на HSIL; ²LSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ³HSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ⁴LSIL у односу на HSIL; ⁵LSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ⁶HSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ⁷LSIL у односу на HSIL; ⁸LSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ⁹HSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ¹⁰Контроле у односу на LSIL, контроле у односу на HSIL и контроле у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ¹¹контроле у односу на LSIL; ¹²контроле у односу на HSIL; ¹³контроле у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ¹⁴контроле у односу на LSIL; ¹⁵контроле у односу на HSIL; ¹⁶контроле у односу на Ca in situ/Ca invasivum.

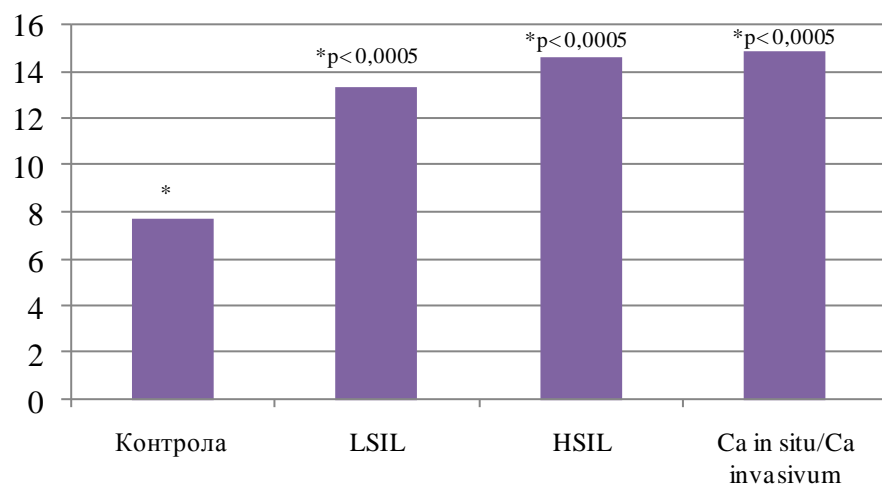


График 4 – Фреквенца микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви контрола и пацијенткиња

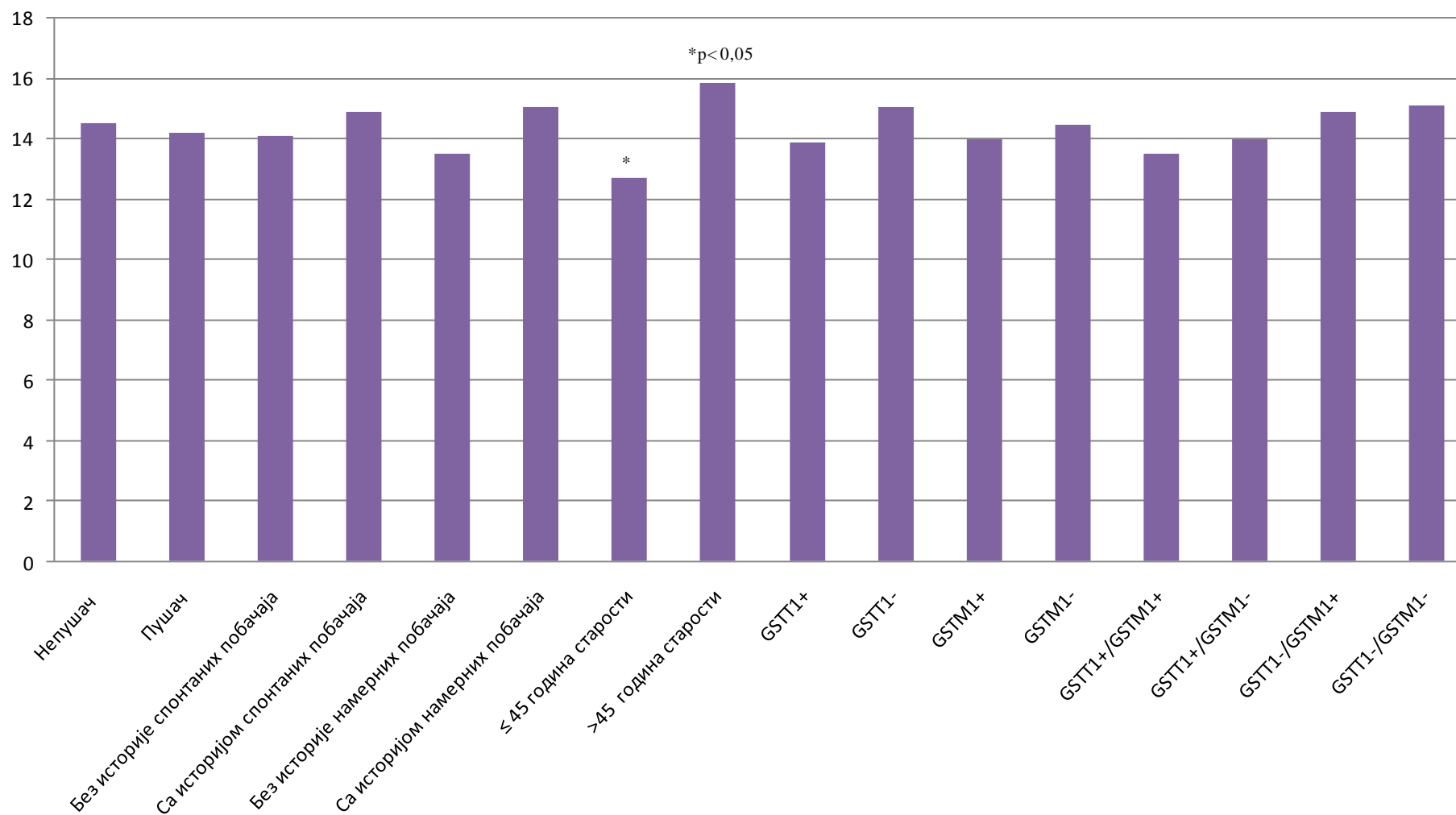


График 5 – Фреквенца микронуклеуса (MN) у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST гена

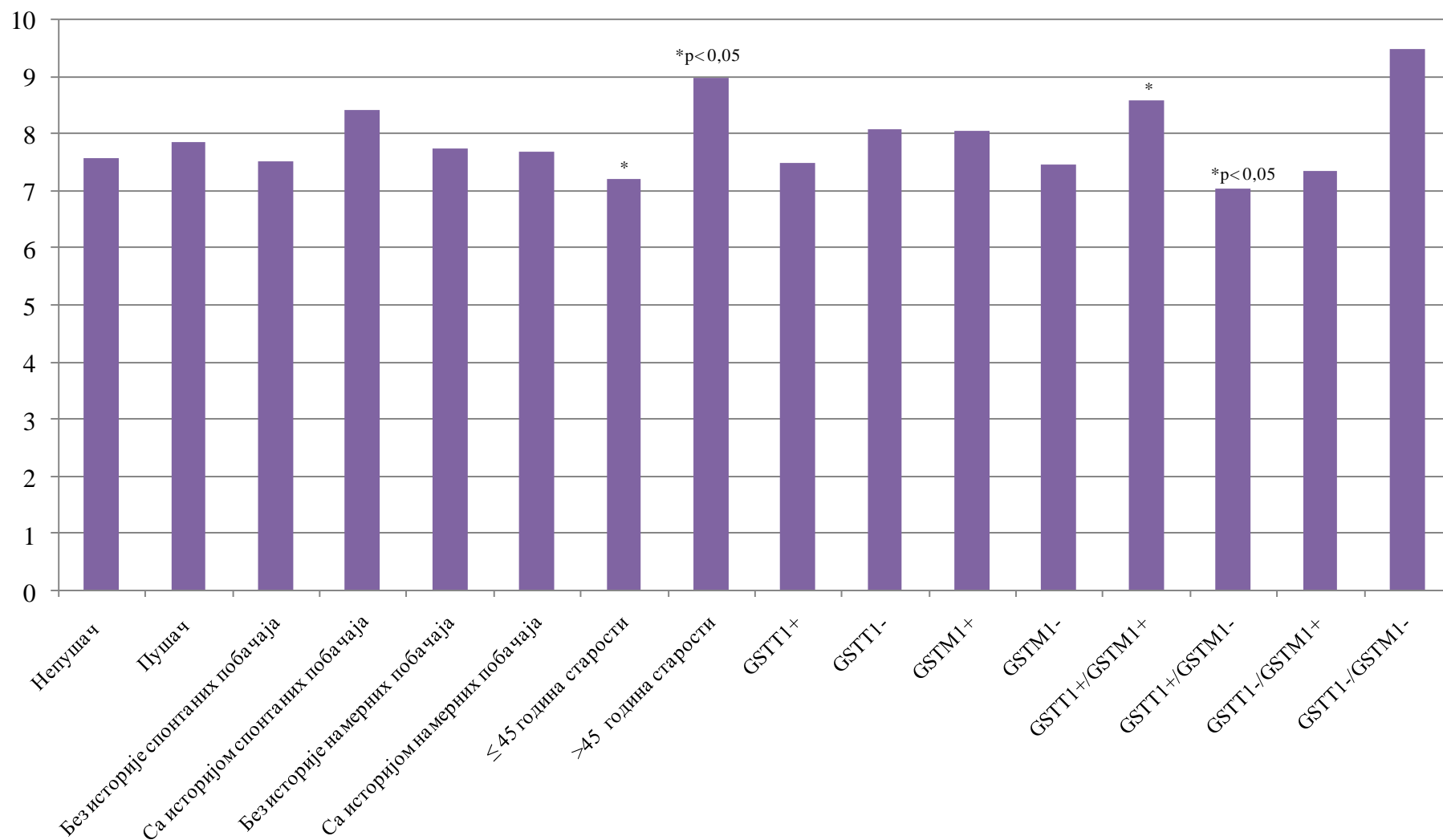


График 6 – Фреквенца микронуклеуса (MN) у лимфоцитима периферне крви контролне групе у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST gena

Заступљеност БН ћелија са МН, НП и НПМ као и дистрибуција МН у анализираним БН ћелијама приказане су у Табели 7.

БН ћелије које су имале бар један МН биле су најзаступљеније у групи жена са дијагнозом Ca in situ и Ca invasivum (478 БН ћелија од 34000 укупно анализираних БН, 1,41%). Процент ових ћелија опада са смањењем степена лезије (1,35% у HSIL, 1,24% у LSIL). Од укупно 41000 анализираних БН ћелија у контролној групи, 296 БН ћелија је имало МН (0,72%).

Ћелије са 1МН су биле најзаступљеније у свим групама. Највећи проценат БН ћелија са 1МН био је у Ca in situ и Ca invasivum групи (1,33%), док је најмањи проценат забележен је у контролној групи жена (0,68%).

Најмања заступљеност бинуклеусних ћелија са 2МН је у контролној групи жена (0,04%), док је највећи проценат ових ћелија забележен у групи жена са дијагностикованим HSIL (0,07%). Слична је и дистрибуција БН ћелија са 3 МН. Највећа и најмања заступљеност забележене су у групи HSIL и контроли (0,02% и 0,002%). Ћелије са 4МН нису уочене само у HSIL групи, док је само једна БН ћелија са 5МН забележена, и то у групи пацијенткиња са LSIL дијагнозом (0,003%).

Процент БН ћелија са НП био је сличан у контроли и групама пацијенткиња (0,01% у LSIL и HSIL; 0,02% у контроли и Ca in situ и Ca invasivum групи). Процент ћелија са НПМ био је исти у LSIL и HSIL групи (0,05%), док је мања заступљеност забележена у контроли и Ca in situ/Ca invasivum групи (0,005% и 0,02%).

Дистрибуција БН са 1, 2 3, 4 и 5 МН анализирана је у контроли и код пацијенткиња и на основу пушачких навика. Незнатно већа заступљеност БН ћелија са МН забележена је код пушача у контролној групи (0,73% у односу на 0,71%) и пацијенткиња непушача (1,34% у односу на 1,33%). Дистрибуција БН са 1МН, 2МН, 3МН и 4МН није се разликовала између анализираних група код пацијенткиња (1,26%; 0,06%; 0,01% и 0,002%), док је БН ћелија са 5МН забележена само код непушача. Нешто већи проценат БН са 1МН забележен код пушача у контролној групи (0,69% у односу на 0,67%), док није забележена разлика у дистрибуцији БН са 2МН у контролној групи (0,04%). У контролној групи БН са 3МН забележена је у групи непушача, док је у групи пушача забележена БН ћелија са 4МН. У свим анализираним групама забележене су БН ћелије са НП и НПМ. Није било разлике у процентуалној заступљености НПМ између пушача и непушача у узорку пацијенткиња, док је незнатно већи проценат ових ћелија био код непушача у контролној групи. Већи проценат БН са НП забележен је код непушача у односу на пушаче у обе групе.

У погледу заступљености цитогенетичких маркера, а на основу историје спонтаних побачаја, већи проценат БНМН, као и БН са 1 и 2 МН забележен је и код контроле и пацијенткиња које су имале спонтане побачаје (0,77% у односу на 0,71%; 0,70% у односу на 0,67%; 0,06% у односу на 0,03%; 1,39% у односу на 1,31%; 1,31% у односу на 1,24%; 0,08% у односу на 0,06%). Бинуклеусне ћелије са 3МН нису забележене само у контроли без спонтаних побачаја, док БН ћелије са 4МН нису забележене у контроли и групи пацијенткиња са спонтаним побачајима. Само је једна ћелија са 5МН забележена и то у групи пацијенткиња без историје спонтаних побачаја. У свим анализираним узорцима, а који су подељени по овом критеријуму, забележене су БН ћелије са НП и НПМ. Већи проценат БН са НП и НПМ био је у групи пацијенткиња без спонтаних побачаја (0,02% у односу на 0,01% и 0,04% у односу на 0,03%). Процент БН ћелија са НП није се разликовао у контролним групама (0,02%), а већи проценат ћелија са НПМ забележен је у групи са спонтаним побачајима (0,01% у односу на 0,003%).

У контролној групи, жене без историје намерних побачаја имале су већу заступљеност БНМН, БН са 1МН, док је супротна учесталост забележена за БН са 2МН и НПМ. Процент БН са НП био је исти (0,02%). Бинуклеусна ћелија са 3МН забележена је у групи жена без историје намерних побачаја и једна БН са 4МН у групи са намерним побачајима.

Код пацијенткиња, већа заступљеност БНМН, БН ћелија са 1МН, НП и НПМ била је у групи са историјом намерних побачаја. Бинуклеусне ћелије са 3МН и 4МН уочене су у обе групе, док је само једна БН ћелија са 5МН уочена код жена са историјом намерних побачаја.

Процент БНМН и БН са 1МН, 2МН и НПМ био је већи у старијој групи контроле (>45 година старости), док су БН са НП биле учесталије у млађој групи (≤45 година). БН ћелија са 3МН забележена је само у старијој групи (>45 година старости), док је 4МН уочена само у млађој групи контрола (≤45 година старости). У групи пацијенткиња, старије жене имале су већи проценат БНМН као и БН са 1МН, док је незнатно већа учесталост БН са 2МН, НП и НПМ забележена у млађој групи пацијенткиња. Процент БН ћелија са 3МН није се разликовао (0,01%). БН ћелије са већим бројем МН (4МН и 5МН) уочене су код пацијенткиња >45 година старости.

Табела 7 – Заступљеност бинуклеусних (БН) ћелија са микронуклеусима (МН), нуклеусним пупољцима (НП) и нуклеоплазматским мостовима (НПМ) и дистрибуција МН у испитиваној популацији

Фактор	Анализирано БН	БНМН (%)	Дистрибуција МН					БННП (%)	БННПМ (%)
			1МН (%)	2МН (%)	3МН (%)	4МН (%)	5МН (%)		
Контрола	41000	296 (0,72)	278 (0,68)	16 (0,04)	1 (0,002)	1 (0,002)	0 (0)	8 (0,02)	2 (0,005)
LSIL	30000	372 (1,24)	351 (1,17)	15 (0,05)	4 (0,01)	1 (0,003)	1 (0,003)	4 (0,01)	16 (0,05)
HSIL	31000	420 (1,35)	392 (1,26)	22 (0,07)	6 (0,02)	0 (0)	0 (0)	2 (0,01)	15 (0,05)
Ca in situ/Ca invasivum	34000	478 (1,41)	453 (1,33)	22 (0,06)	2 (0,01)	1 (0,003)	0 (0)	8 (0,02)	7 (0,02)
Пушачке навике									
<i>Контрола</i>									
Непушач	19000	135 (0,71)	127 (0,67)	7 (0,04)	1 (0,01)	0 (0)	0 (0)	6 (0,03)	1 (0,01)
Пушач	22000	161 (0,73)	151 (0,69)	9 (0,04)	0 (0)	1 (0,005)	0 (0)	2 (0,01)	1 (0,005)
<i>Пацијенти</i>									
Непушач	42000	564 (1,34)	529 (1,26)	27 (0,06)	6 (0,01)	1 (0,002)	1 (0,002)	7 (0,02)	17 (0,04)
Пушач	53000	706 (1,33)	667 (1,26)	32 (0,06)	6 (0,01)	1 (0,002)	0 (0)	7 (0,01)	21 (0,04)
Репродуктивна историја									
Спонтани побачаји									
<i>Контрола</i>									
Не	32000	227 (0,71)	215 (0,67)	11 (0,03)	0 (0)	1 (0,003)	0 (0)	6 (0,02)	1 (0,003)
Да	9 000	69 (0,77)	63 (0,70)	5 (0,06)	1 (0,01)	0 (0)	0 (0)	2 (0,02)	1 (0,01)
<i>Пацијенти</i>									
Не	67000	880 (1,31)	830 (1,24)	38 (0,06)	9 (0,01)	2 (0,003)	1 (0,001)	11 (0,02)	30 (0,04)
Да	28000	390 (1,39)	366 (1,31)	21 (0,08)	3 (0,01)	0 (0)	0 (0)	3 (0,01)	8 (0,03)
Намерни побачаји									
<i>Контрола</i>									
Не	28000	206 (0,74)	196 (0,70)	9 (0,03)	1 (0,004)	0 (0)	0 (0)	6 (0,02)	1 (0,004)
Да	13000	90 (0,69)	82 (0,63)	7 (0,05)	0 (0)	1 (0,01)	0 (0)	2 (0,02)	1 (0,01)
<i>Пацијенти</i>									
Не	44000	551 (1,25)	514 (1,17)	30 (0,07)	6 (0,01)	1 (0,002)	0 (0)	5 (0,01)	14 (0,03)
Да	51000	719 (1,41)	682 (1,34)	29 (0,06)	6 (0,01)	1 (0,002)	1 (0,002)	9 (0,02)	24 (0,05)

Наставак Табела 7									
<i>Фактор</i>	Анализирано БН	БНМН ¹ (%)	Дистрибуција МН ¹					БННП (%)	БННПМ (%)
			1МН (%)	2МН (%)	3МН (%)	4МН (%)	5МН (%)		
<i>Године</i>									
<i>Контроле</i>									
≤ 45	29000	196 (0,68)	185 (0,64)	10 (0,03)	0 (0)	1 (0,003)	0 (0)	7 (0,02)	1 (0,003)
>45	12000	100 (0,83)	93 (0,78)	6 (0,05)	1 (0,01)	0 (0)	0 (0)	1 (0,01)	1 (0,01)
<i>Пацијенти</i>									
≤ 45	46000	545 (1,18)	510 (1,11)	30 (0,07)	5 (0,01)	0 (0)	0 (0)	8 (0,02)	21 (0,05)
>45	49000	725 (1,48)	686 (1,40)	29 (0,06)	7 (0,01)	2 (0,004)	1 (0,002)	6 (0,01)	17 (0,03)

¹Процент БНМН, БН са 1МН, 2МН, 3МН, 4МН, 5МН, БННП и БННПМ приказан је у односу на укупан број анализираних БН ћелија

Од укупног броја анализираних БН ћелија у контролној групи жена, највећи проценат чиниле су БН ћелије без МН (99,28%). Остатак 0,72% БН ћелија било је са МН. БН ћелије са 1МН су биле најзаступљеније (0,68%), након чега су следиле БН ћелије са 2МН. Процент БН ћелија са 3МН и 4МН је био исти (График 7).

Слично као у контролној групи жена, у групама пацијенткиња (LSIL, HSIL и Ca in situ/Ca invasivum) највећи проценат анализираних БН ћелија био је без МН (98,76%, 98,65% и 98,59%, ретроспективно). У свим групама пацијенткиња БН ћелије са 1МН су биле следеће по заступљености, након чега су следиле БН ћелије са 2МН и 3МН (График 8-10). Процент БН ћелија са 4МН и 5МН је био исти у групи пацијенткиња са LSIL дијагнозом (0,003%, График 8). У групи пацијенткиња са Ca in situ/Ca invasivum дијагнозом најмањи проценат чиниле су БН ћелије са 4МН (График 10).

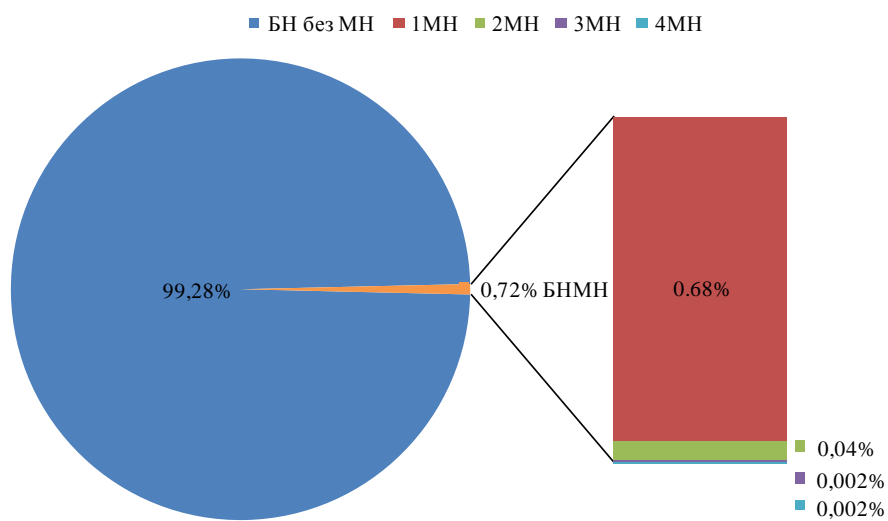


График 7 – Дистрибуција MN у контролној групи

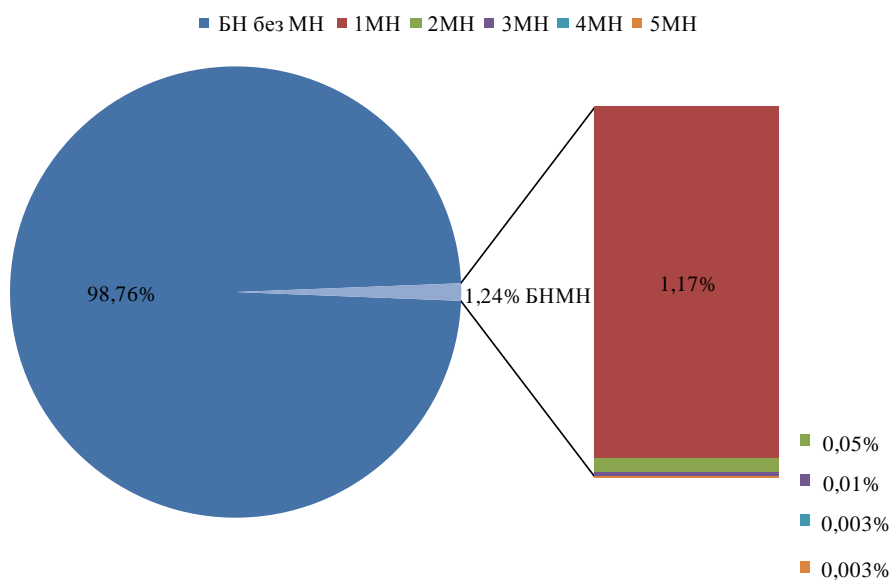


График 8 – Дистрибуција MN у LSIL групи

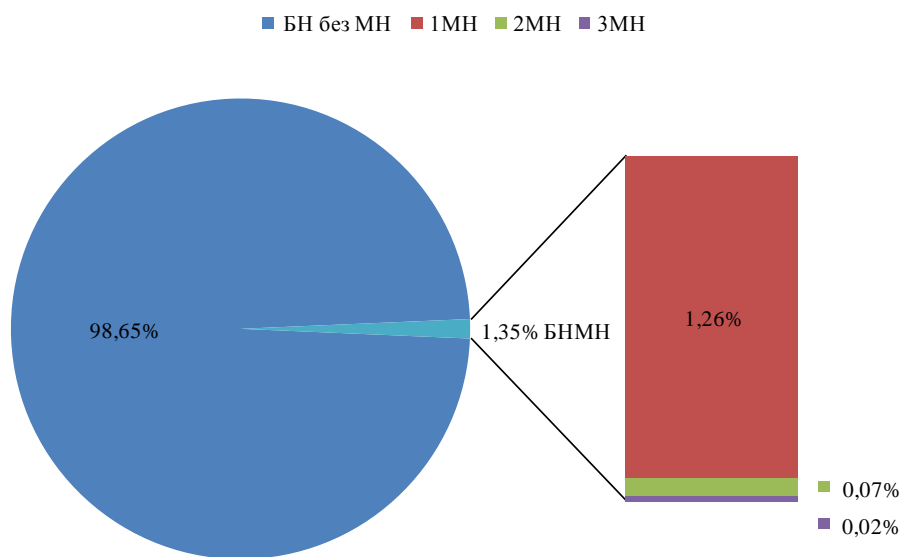


График 9 – Дистрибуција MN у HSIL групи

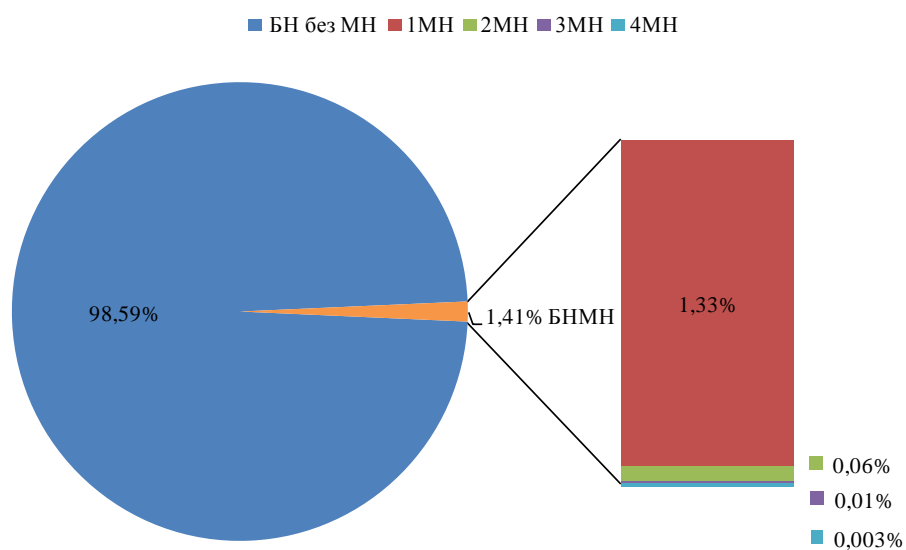


График 10 – Дистрибуција MN у Ca in situ/Ca invasivum групи

Од укупног броја анализираних БН ћелија у контролној групи, највећи проценат чиниле су БН ћелије без МН (99,29% код непушача и 99,27% код пушача), након чега су следиле БН ћелије са 1МН и БН ћелије са 2МН. Најмањи проценат чиниле су БН ћелије са 3МН код непушача (0,01%) и БН ћелије са 4МН у групи пушача (0,005%) (График 11).

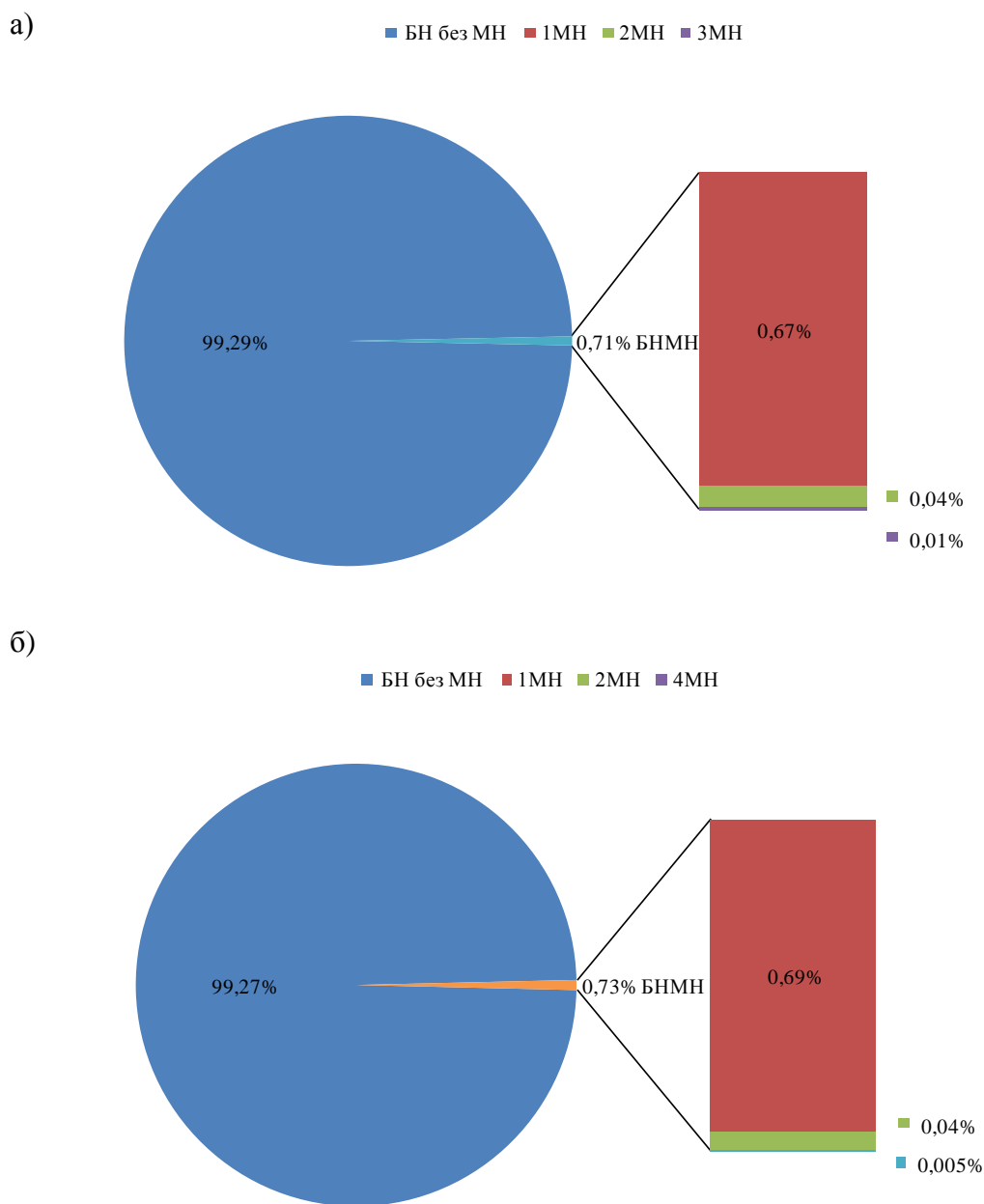


График 11 – Дистрибуција МН у контролној групи: а) непушачи; б) пушачи

Дистрибуција БН ћелија код пацијенткиња на основу пушачких навика приказана је на Графику 12. Највећи проценат ћелија чиниле су БН ћелије без МН и у групи непушача и пушача, а следиле су ћелије са 1МН, 2МН, 3МН и 4МН у групи пушача, односно 1МН, 2МН, 3МН, 4МН и 5МН у групи непушача.

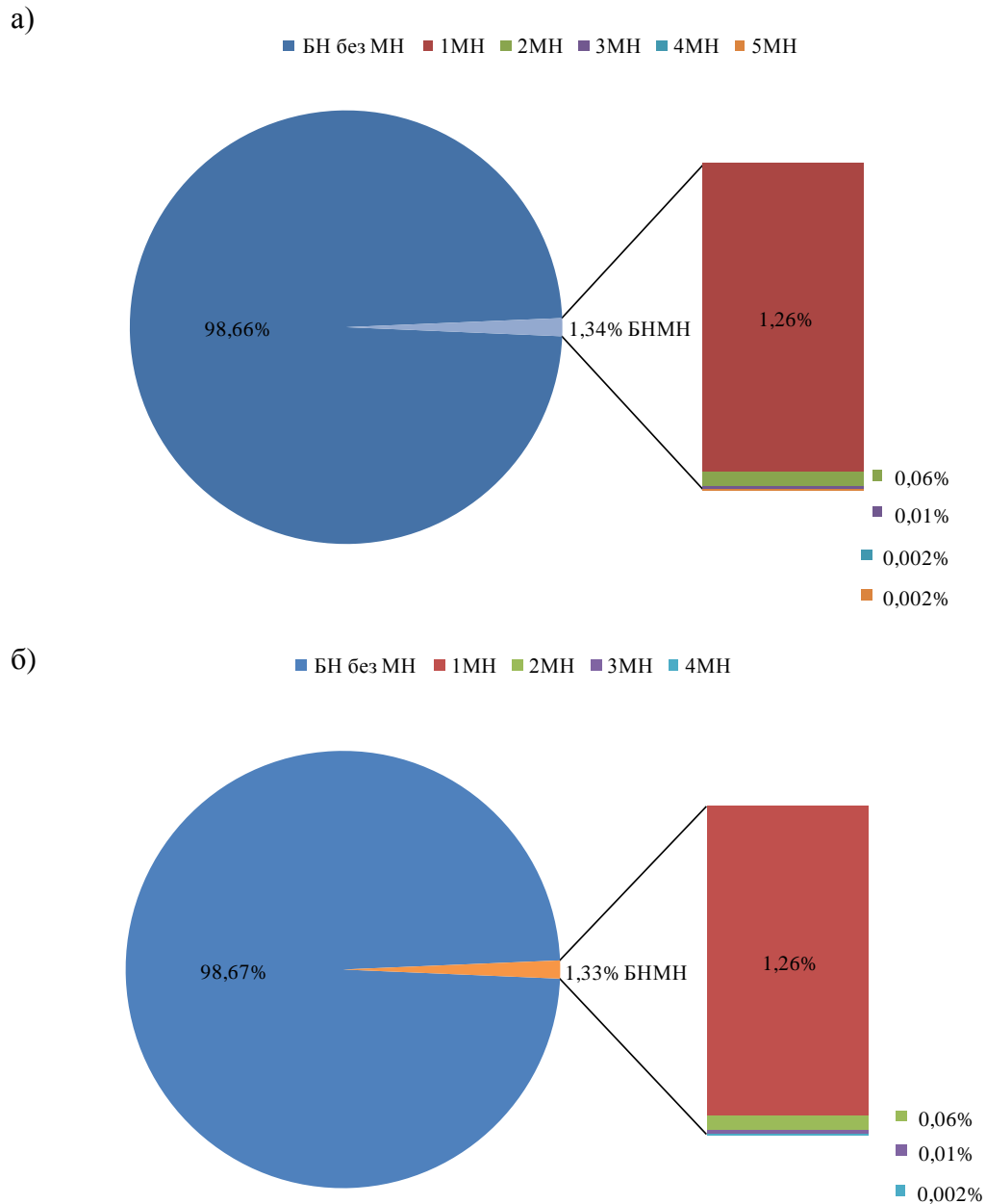


График 12 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) непушачи; б) пушачи

У контролној групи жена, а без историје спонтаних побачаја, највећи проценат анализираних БН ћелија биле су без МН (99,29%). Након чега су следиле ћелије са 1МН, 2МН и 4МН. Слично, у групи жена са историјом спонтаних побачаја, највећи проценат анализираних БН ћелија чиниле су БН ћелије без МН (99,23%). Мањи проценат чиниле су ћелије са 1МН, 2МН и 3МН (График 13).

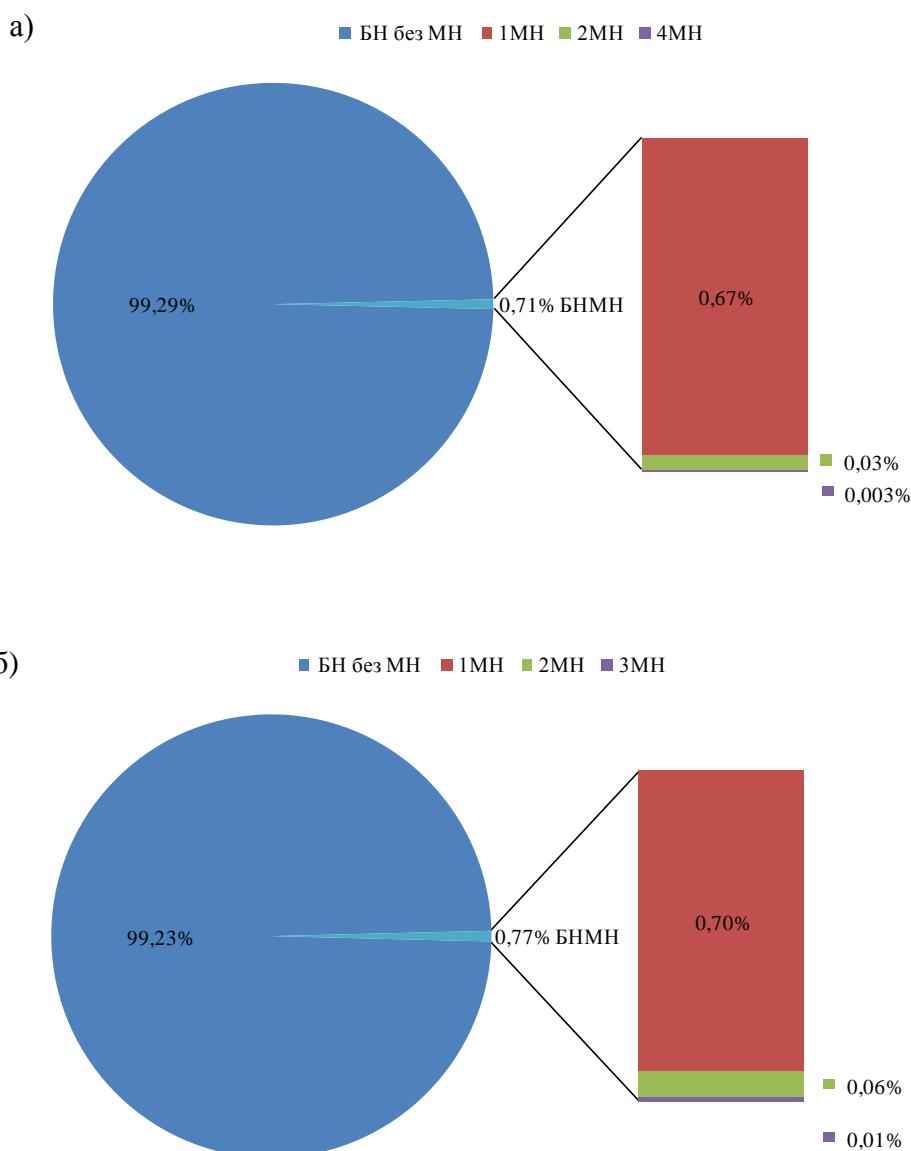
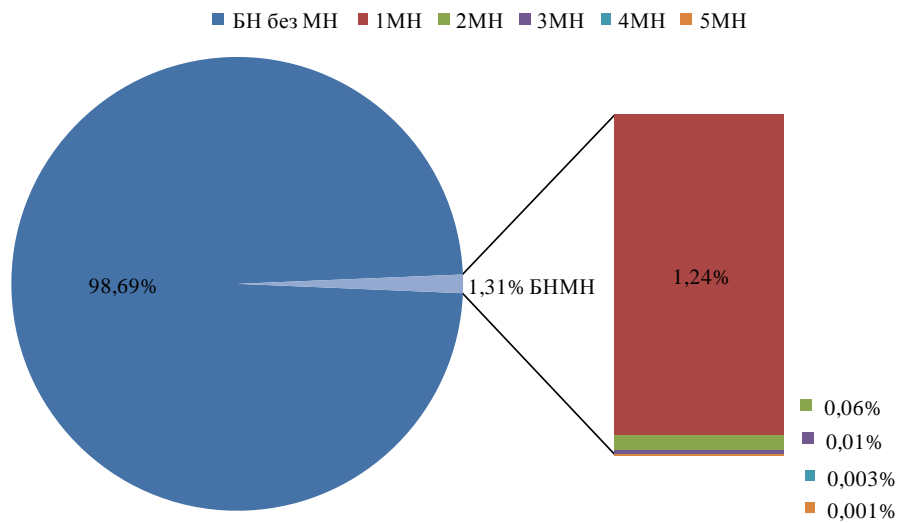


График 13 – Дистрибуција МН у контролној групи: а) без историје спонтаних побачаја; б) са историјом спонтаних побачаја

Дистрибуција БН ћелија у групи пацијенткиња подељених на основу историје спонтаних побачаја приказана је на Графику 14. У обе групе највећи проценат чиниле су БН ћелије без МН. Од БН ћелија са МН, у обе групе највећи проценат чиниле су ћелије са 1МН, након чега су следиле БН ћелије са 2МН, 3МН, 4МН и 5МН у групи жена без историје спонтаних побачаја, односно БН ћелије са 2МН, 3МН у групи жена са историјом спонтаних побачаја.

а)



б)

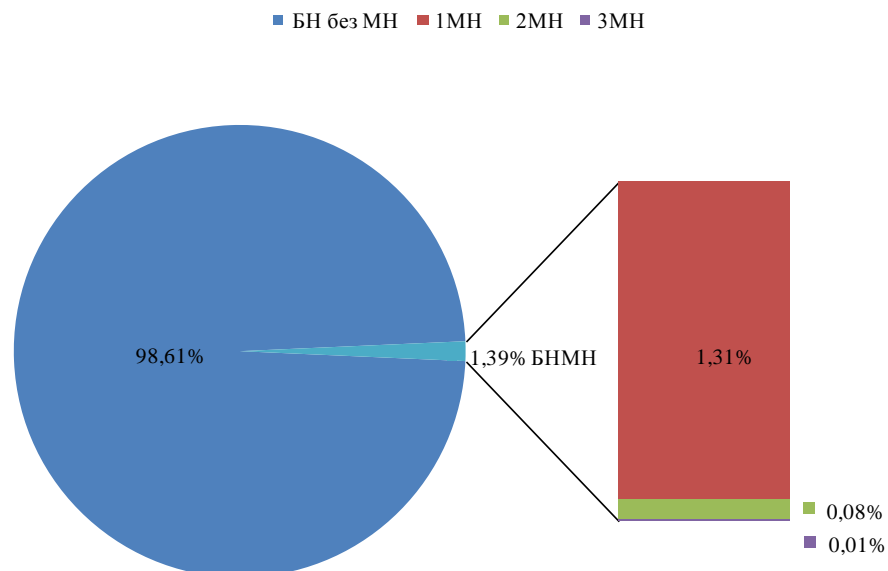


График 14 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) без историје спонтаних побачаја; б) са историјом спонтаних побачаја

Највећи проценат анализираних БН ћелија у контролној групи жена без историје намерних побачаја и жена са историјом намерних побачаја чиниле су БН без МН (99,26% и 99,31%, ретроспективно). Након чега следиле су БН ћелије са 1МН, 2МН и 3МН у групи жена без историје намерних побачаја, односно БН ћелије са 1МН, 2МН и 4МН у групи жена са историјом намерних побачаја (График 15).

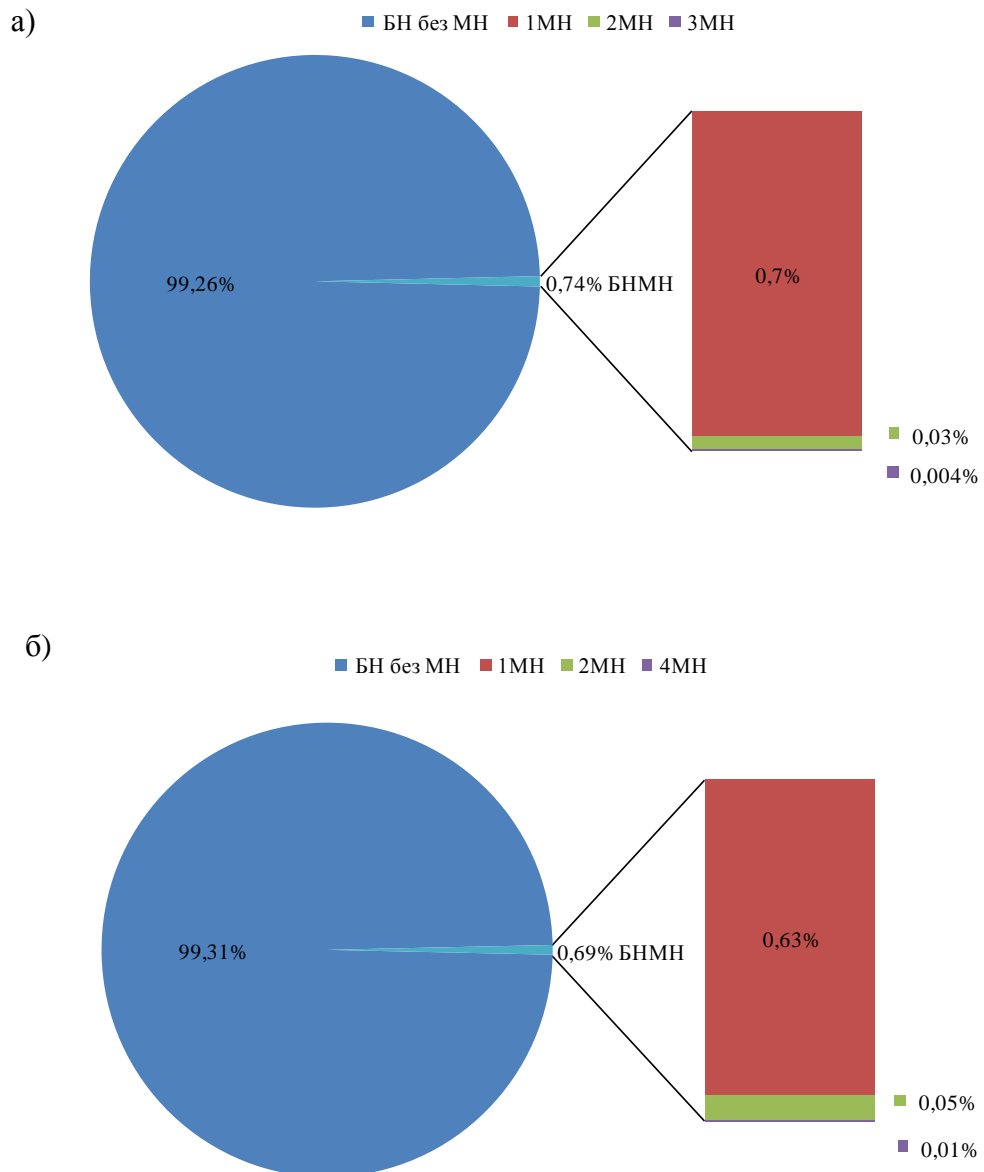
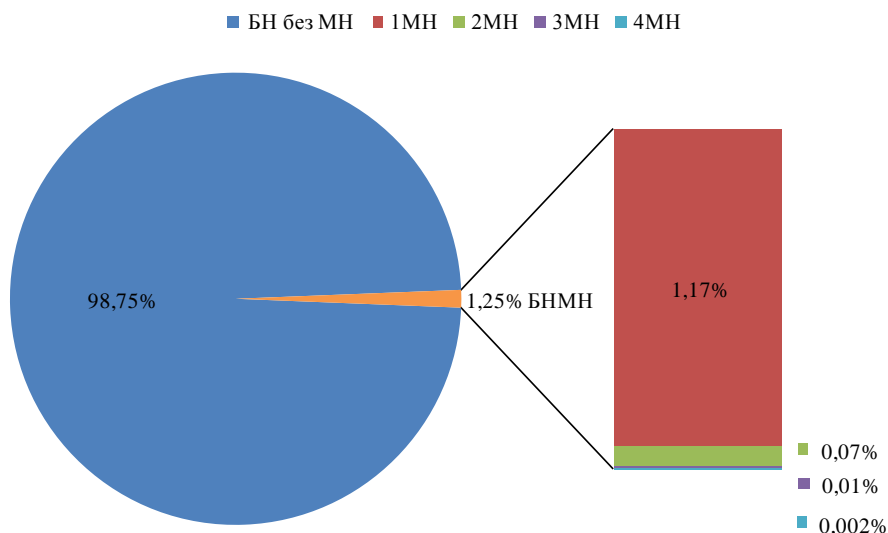


График 15 – Дистрибуција МН у контролној групи: а) без историје намерних побачаја; б) са историјом намерних побачаја

Слично као у контролној групи, највећи проценат анализираних БН ћелија код пацијенткиња без и са историјом намерних побачаја чиниле су ћелије без МН (98,75% и 98,59%). У обе групе, БН ћелије са 1МН биле су следеће по заступљености. Мањи проценат чиниле су ћелије са 2МН, 3МН и 4МН у групи без историје, односно ћелије са 2МН, 3МН, 4МН и 5МН у групи жена са историјом намерних побачаја (График 16).

а)



б)

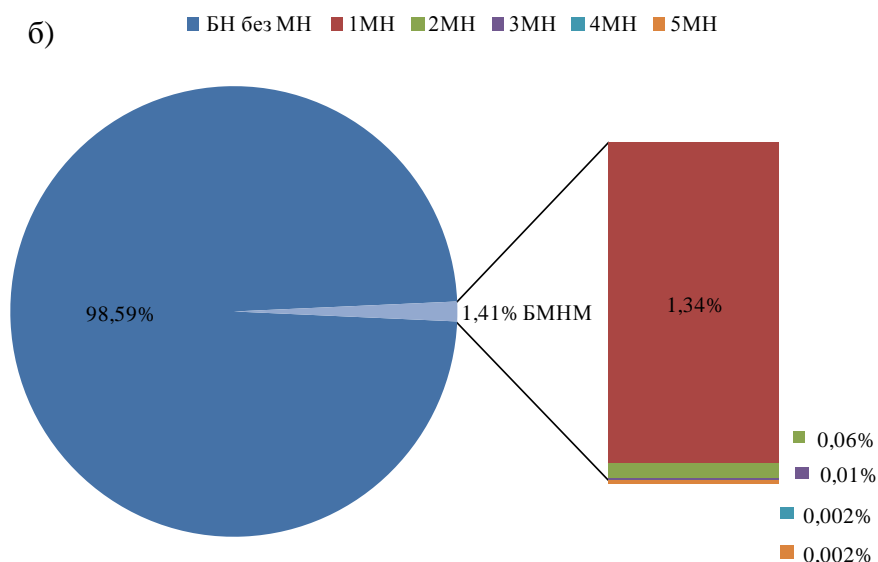


График 16 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) без историје намерних побачаја; б) са историјом намерних побачаја

БН ћелије без МН биле су најзаступљеније у обе контролне групе жена ≤ 45 година старости и >45 година старости (99,32% и 99,17%). У обе групе следеће по заступљености биле су БН ћелије са 1МН, па БН са 2МН. Најређе заступљене биле су БН ћелије са 4МН у групи ≤ 45 година старости и БН ћелије са 3МН у групи жена >45 година старости (График 17).

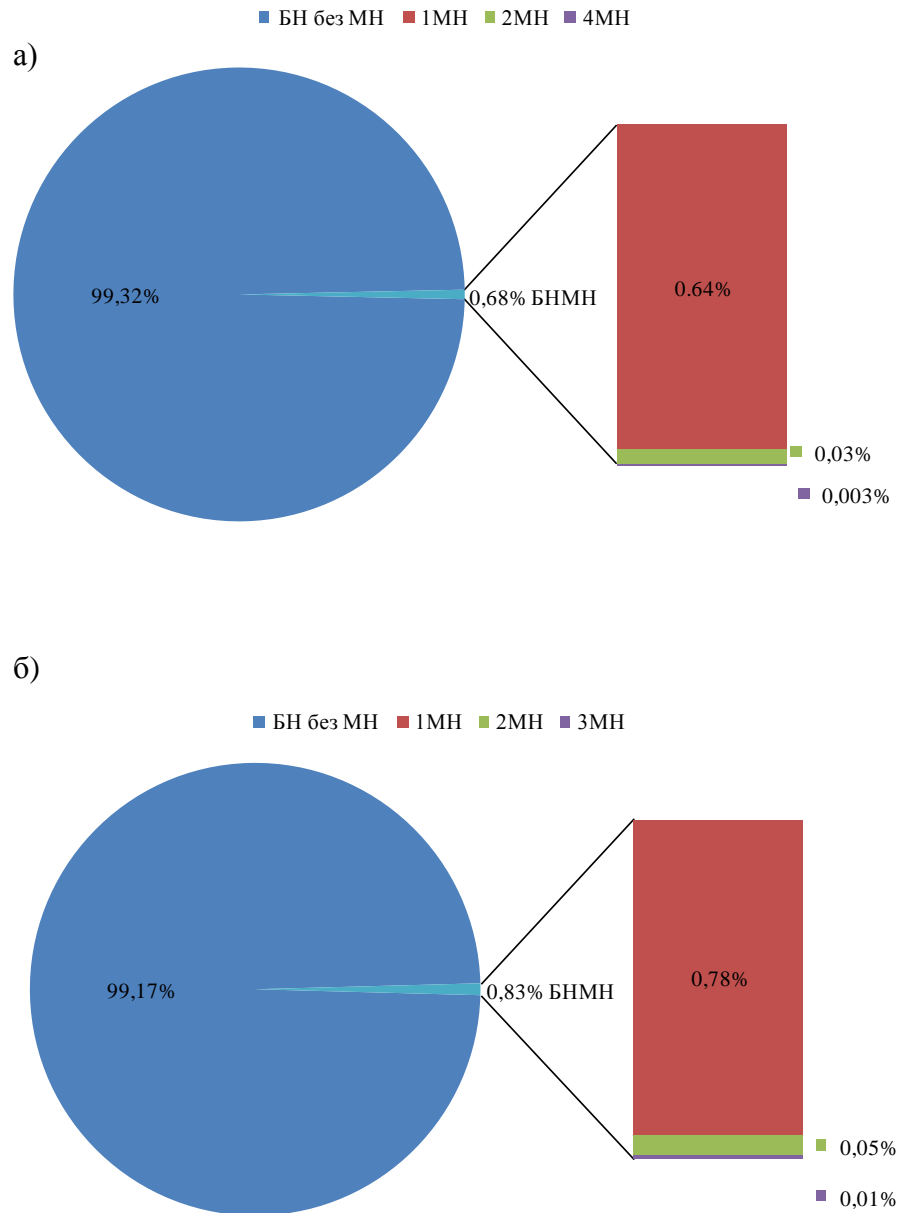


График 17 - Дистрибуција МН у контролној групи: а) ≤ 45 година старости; б) >45 година старости

У обе групе пацијенткиња ≤ 45 година старости и >45 година старости, највећа је била заступљеност БН ћелија без МН (98,82% и 98,52%). Следиле су БН ћелије са 1МН, 2МН и 3МН у групи ≤ 45 година старости, односно БН ћелије са 1МН, 2МН, 3МН, 4МН и 5МН у групи пацијенткиња >45 година старости (График 18).

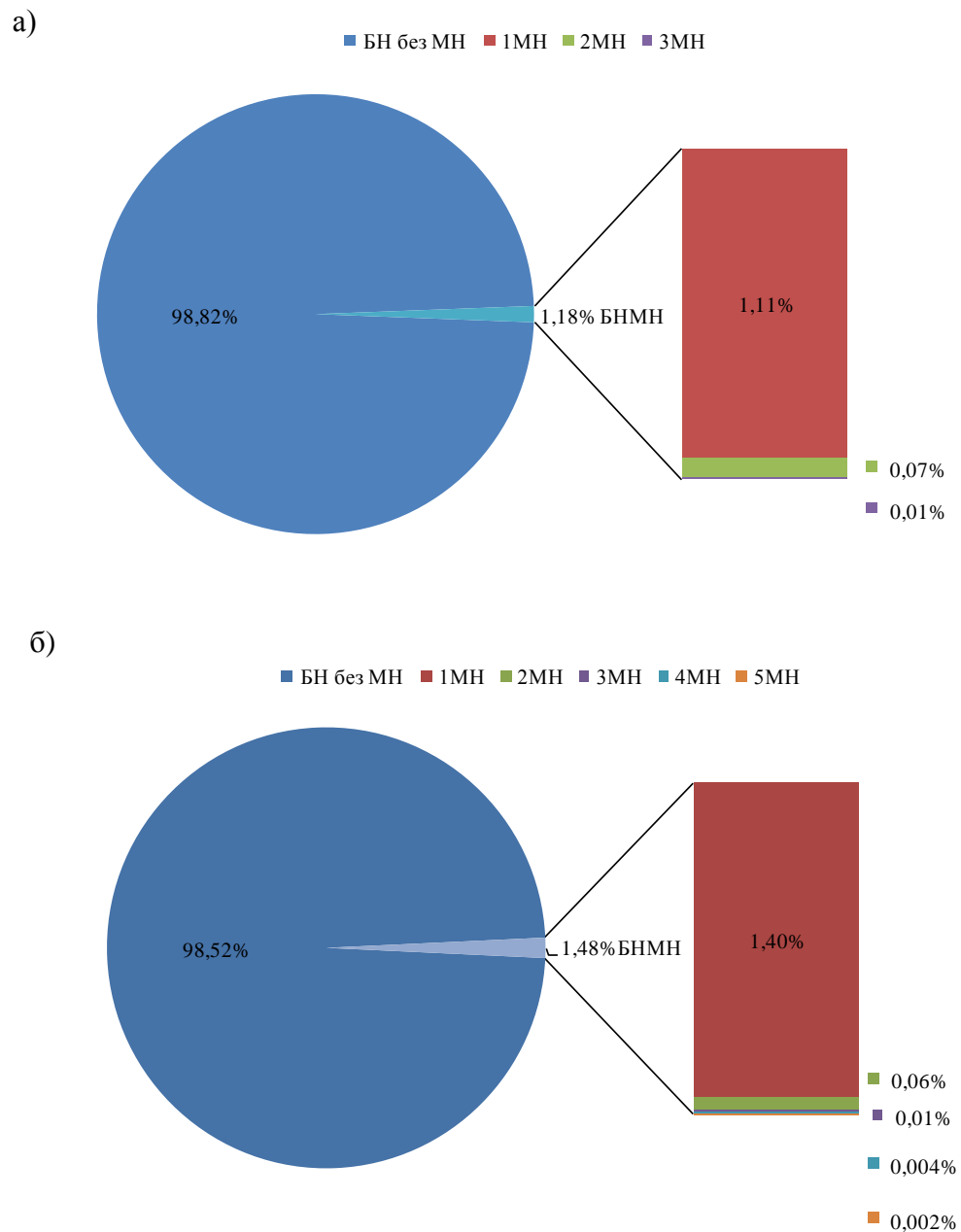


График 18 – Дистрибуција МН у групи пацијенткиња: а) ≤ 45 година старости; б) >45 година старости

У Табели 8 и Графицима 19-21 приказане су просечне вредности NDI у зависности од здравственог стања, демографских, медицинских и животних карактеристика.

Контролна група жена имала је највећу вредност NDI ($1,72 \pm 0,11$), док су се вредности овог индекса континуално смањивале од LSIL, преко HSIL до Ca in situ/Ca invasivum ($1,71 \pm 0,06$; $1,69 \pm 0,08$ и $1,63 \pm 0,17$). Статистички значајна разлика у вредностима NDI забележена је само између контролне групе жена и пацијенткиња са дијагнозом Ca in situ и Ca invasivum ($p < 0,05$).

Резултати анализе у групи пацијенткиња су показали да пушачке навике нису значајно утицале на NDI. Просечна вредност NDI код пушача износила је $1,66 \pm 0,15$ у односу на $1,70 \pm 0,07$ колика је била у групи непушача ($p > 0,05$).

Незначајно мања вредност NDI забележена је у групи пацијенткиња које у току свог репродуктивног периода нису имале намерне побачаје у односу на оне које су имале бар један ($p > 0,05$). Такође, разлика у вредностима овог параметра између жена са спонтаним и без спонтаних побачаја у својој репродуктивној историји није забележена ($p > 0,05$).

Пацијенткиње су подељене на основу година у две старосне групе (≤ 45 и > 45 година). Просечна вредност NDI је била незначајно мања у старијој групи пацијенткиња ($1,66 \pm 0,12$ у односу на $1,69 \pm 0,12$; $p > 0,05$).

Слични резултати добијени су и у контролној групи жена. Код пушача је забележена мања вредност NDI у односу на непушаче ($1,71 \pm 0,12$ у односу на $1,73 \pm 0,09$), али без статистичке значајности ($p > 0,05$).

Веће вредности NDI забележене су у групи контрола које су имале бар један спонтани побачај и намерни побачај у односу на жене без побачаја у репродуктивној историји, са вероватноћом $p > 0,05$.

Незнатно већа вредност NDI која је забележена у старијој групи контрола (> 45 година) у односу на млађу групу контрола (≤ 45 година) није била статистички значајна ($1,73 \pm 0,07$ у односу на $1,71 \pm 0,12$; $p > 0,05$).

Табела 8 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) у испитиваној популацији у зависности од демографских, медицинских и животних карактеристика

Фактор	Пацијенткиње		Контроле	
	№	Средња вредност NDI ±С.Д (ранг)	№	Средња вредност NDI ±С.Д (ранг)
Стадијум лезија			45	1,72±0,11 (1,45-1,89)
LSIL ¹	32	1,71±0,06 (1,58-1,83)		
HSIL ²	32	1,69±0,09 (1,48-1,86)		
Ca in situ/Ca invasivum	37	1,63±0,17 (1,24-1,86)		
p		0,404 ³ ; 0,060 ⁴ ; 0,187 ⁵		0,234 ⁶ ; 0,164 ⁷ ; 0,016 ⁸
Пушачке навике				
Непушач	44	1,70±0,07 (1,47-1,83)	21	1,73±0,09 (1,53-1,86)
Пушач	57	1,66±0,15 (1,24-1,86)	24	1,71±0,12 (1,45-1,86)
p		0,151		0,517
Репродуктивна историја				
Спонтани побачаји				
Не	72	1,68±0,13 (1,24-1,86)	36	1,71±0,11 (1,45-1,89)
Да	29	1,68±0,08 (1,48-1,83)	9	1,76±0,06 (1,68-1,84)
p		0,441		0,177
Намерни побачаји				
Не	44	1,67±0,14 (1,24-1,86)	29	1,71±0,10 (1,50-1,86)
Да	57	1,68±0,10 (1,32-1,86)	16	1,73±0,12 (1,45-1,89)
p		0,459		0,529
Године				
≤ 45	47	1,69±0,12 (1,24-1,86)	31	1,71±0,12 (1,45-1,89)
>45	54	1,66±0,12 (1,28-1,86)	14	1,73±0,07 (1,53-1,82)
p		0,103		0,951

¹Low grade squamous intraepithelial lesions; ²High grade squamous intraepithelial lesions; ³LSIL у односу на HSIL; ⁴LSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ⁵HSIL у односу на Ca in situ/Ca invasivum; ⁶контроле у односу на LSIL; ⁷контроле у односу на HSIL; ⁸контроле у односу на Ca in situ/Ca invasivum

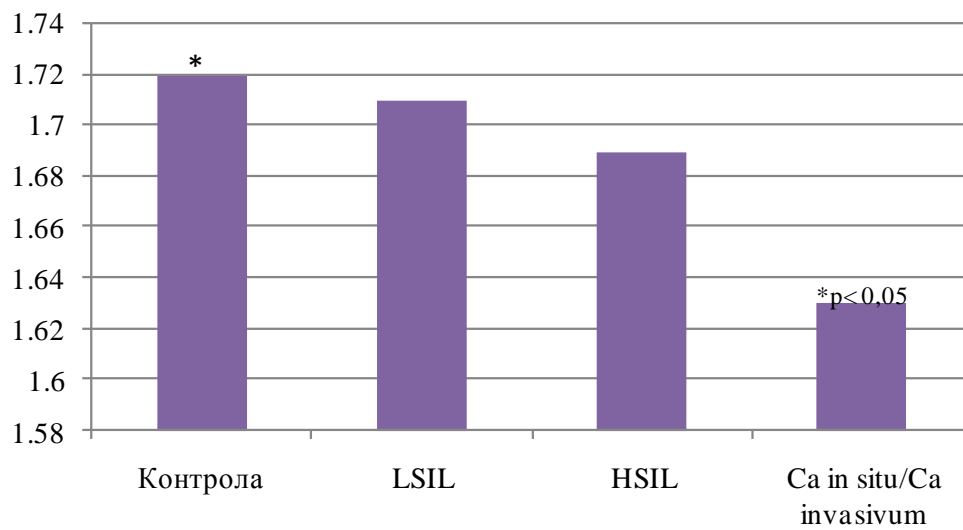


График 19 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) код контрола и пацијенткиња

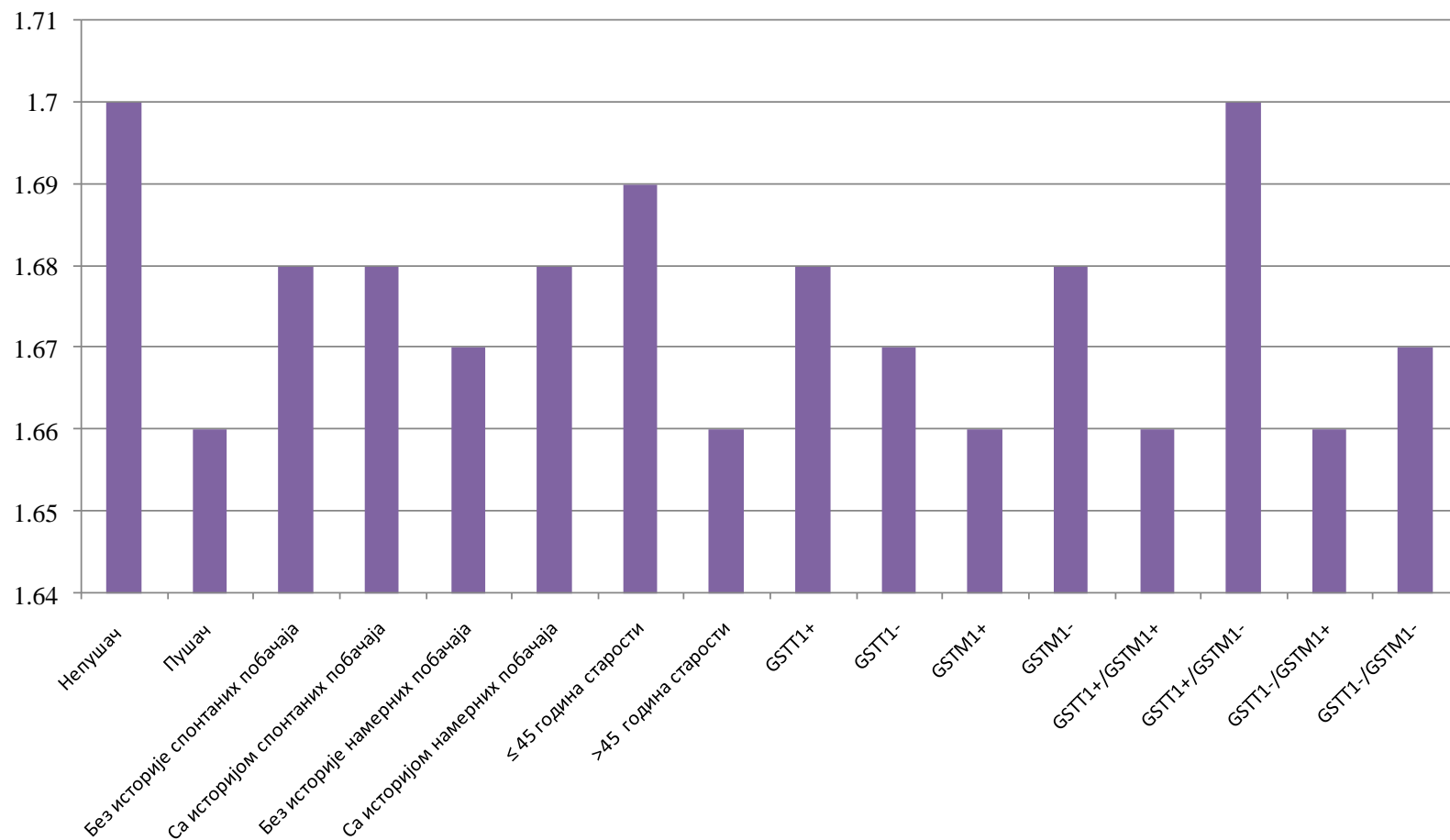


График 20 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) код пацијенткиња у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST гена

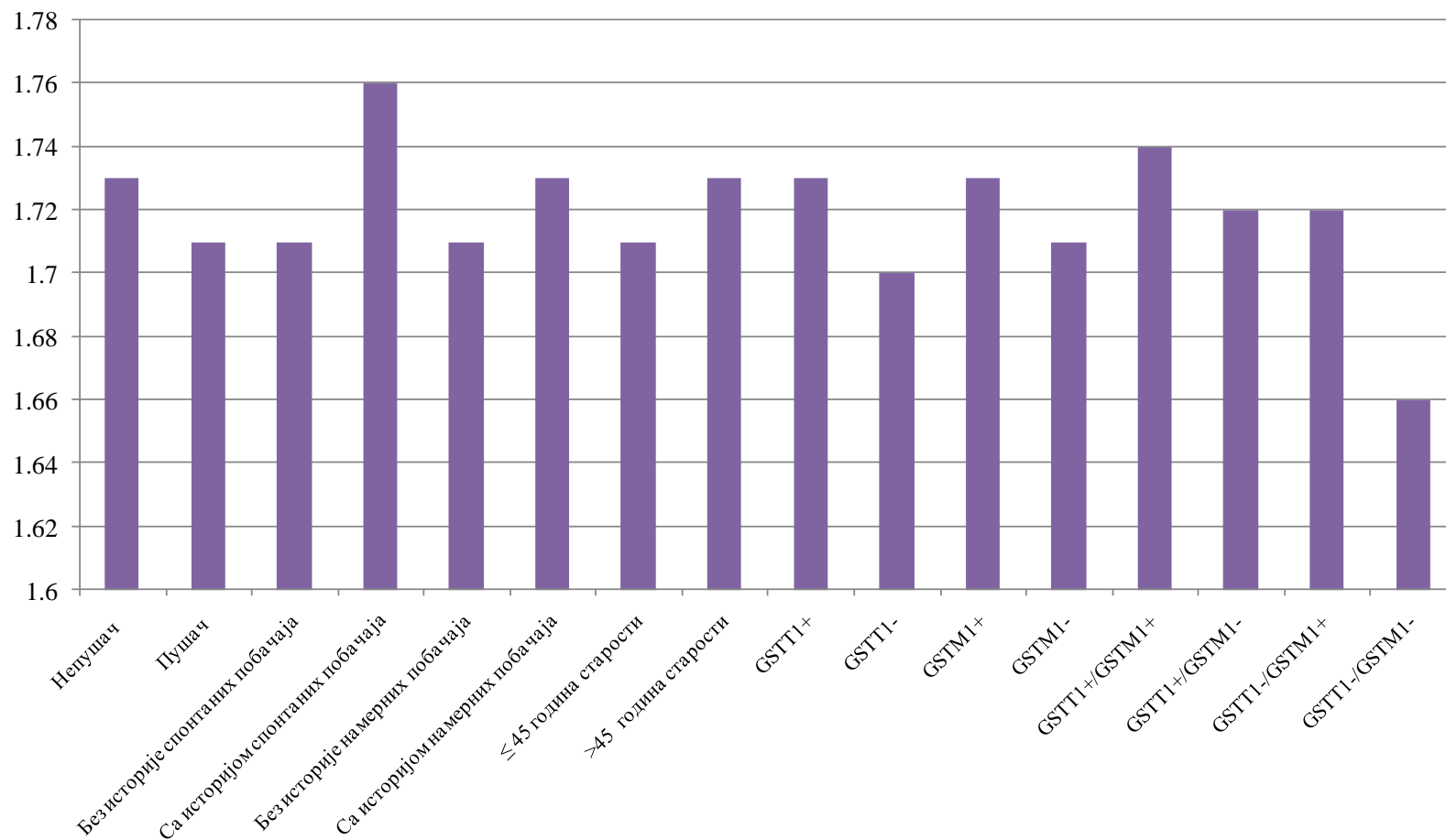


График 21 – Индекс нуклеусне деобе (NDI) код контрола у зависности од демографских, медицинских, животних карактеристика и статуса GST gena

Резултати ROC анализе приказани су на Графику 22. Вредност AUC (Area Under Curve) је 0,917 (CI=0,866-0,968, $p < 0,0005$), док је вредност Cut off за МН фреквенцу износила 10,5 МН/1000 БН, сензитивност је 84,2%, а специфичност је била 95,1%.

ROC крива

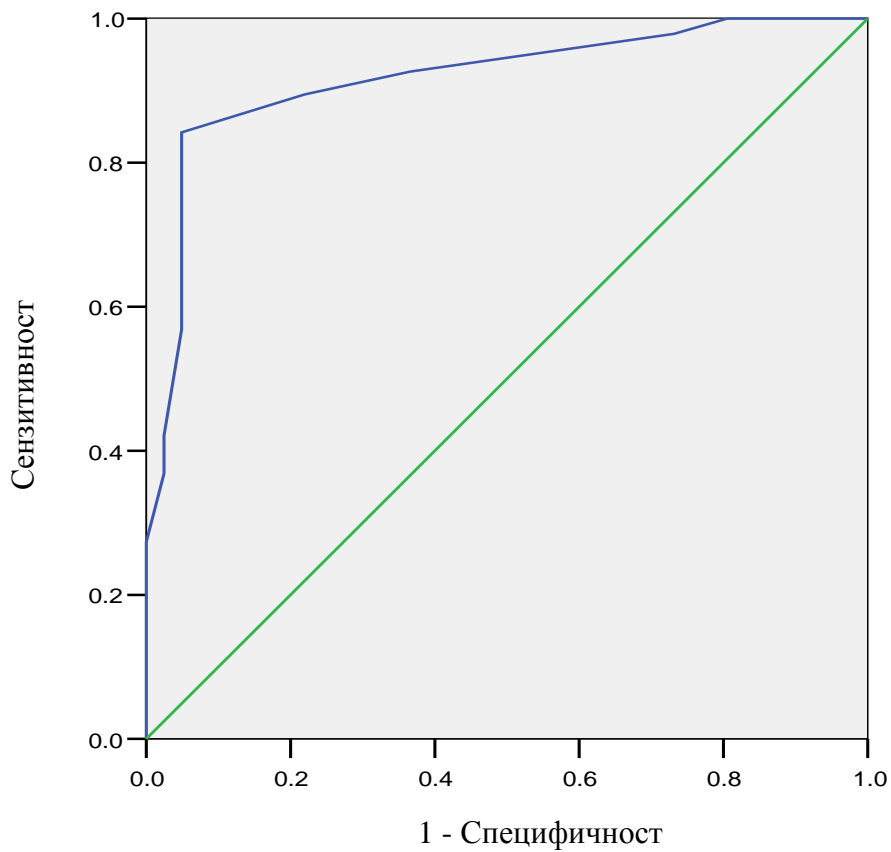


График 22 – Резултати ROC (Receiver Operating Characteristic) анализе

Резултати дистрибуције анализираних гена у популацији здравих особа и пацијенткиња са дијагностикованим интрацервикалним лезија на грлићу материце приказане су у Табели 9.

Незначајно већа фреквенца GSTT1 нултог генотипа забележена је код здравих жена (40,0% у односу на 38,5%; $p>0,05$). Супротно, значајно већа фреквенца GSTM1 нултог генотипа забележена је у групи пацијенткиња (74,0% у односу на 56,0%; $p<0,05$). Пацијенткиње са GSTM1 нултим генотипом имале су више од 2 пута повећан ризик да развију интрацервикалне лезије у односу на особе са GSTM1 позитивним генотипом (OR=2,24 95% CI=1,10-4,56, $p<0,05$).

Поред анализе дистрибуције појединачних генотипова, у Табели 9 приказане су и дистрибуције различитих комбинација ова два гена. Забележене разлике у дистрибуцији између пацијенткиња и контрола нису биле статистички значајне ($p>0,05$).

Приликом процене ризика за развој интрацервикалних лезија, референтну групу чиниле су жене са GSTT1+/GSTM1+ комбинацијом. Резултати анализе показали су да комбинације GSTT1+/GSTM1-, GSTT1-/GSTM1+ и GSTT1-/GSTM1- нису повезане са ризиком за развој лезија ($p>0,05$).

Табела 9 – Дистрибуција GSTT1 и GSTM1 генотипа код пацијенткиња са цервикалним лезијама и контрола са количником шансе (OR) и 95% интервалом поверења (CI)

	Контроле (%)	Пацијенткиње ¹ (%)	р	OR	CI (95%)	р
Тотално	50	104				
Генотип						
<i>GSTT1</i>						
+ ²	30 (60,0)	64 (61,5)		1 (реф)		
- ³	20 (40,0)	40 (38,5)	0,86	0,94	0,47-1,87	0,86
<i>GSTM1</i>						
+	22 (44,0)	27 (26,0)		1 (реф)		
-	28 (56,0)	77 (74,0)	0,02	2,24	1,10-4,56	0,03
<i>GSTT1/GSTM1</i>						
+/+	11 (22,0)	18 (17,3)		1 (реф)		
+/-	19 (38,0)	46 (44,2)	0,40	1,48	0,59-3,72	0,40
-/+	11(22,0)	9 (8,7)	0,24	0,5	0,16-1,59	0,24
-/-	9(18,0)	31 (29,8)	0,16	2,10	0,73-6,05	0,17

¹LSIL (Low grade squamous intraepithelial lesions) + HSIL (High grade squamous intraepithelial lesions) + CC (Ca in situ/Ca invasivum); ²укључује и хомозиготе и хетерозиготе; ³укључује хомозиготну делецију (нулти генотип)

Дистрибуција генотипова као и резултати процене ризика у зависности од степена интрацервикалне лезије приказани су у Табели 10.

Пацијенткиње са LSIL дијагнозом имале су већу фреквенцу GSTT1 нултог и GSTM1 нултог генотипа у односу на контролну групу жена (43,8 % у односу на 40,0%; 78,1% у односу на 56,0%), али је само за GSTM1 разлика била статистички значајна ($p < 0,05$). Разлике у дистрибуцији различитих комбинација генотипова између контроле и LSIL нису статистички значајно различите ($p > 0,05$).

Особе са нултим GSTM1 генотипом имале су скоро 3 пута већи ризик за развој LSIL у односу на особе са позитивним генотипом ($OR = 2,81$ 95% $CI = 1,03-7,68$; $p < 0,05$). У односу на референтну групу (GSTT1+/GSTM1+), остале GSTT1/GSTM1 комбинације нису имале повећан ризик за развој интрацервикалних лезија ($p > 0,05$).

Пацијенткиње са HSIL дијагнозом имале су већу фреквенцу GSTM1 нултог генотипа у односу на контролну групу здравих жена (75,8% у односу на 56,0%), док је фреквенца GSTT1 нултог генотипа била незначајно мања код пацијенткиња (36,4% у односу на 40,0%, $p > 0,05$). Такође, разлике у дистрибуцији различитих комбинација генотипова нису биле статистички значајне ($p > 0,05$). Носиоци нултих генотипова (GSTT1 нулти и GSTM1 нулти генотип) нису имале ризик за развој лезија ($p > 0,05$). У односу на референтну групу GSTT1+/GSTM1+, остале комбинације нису у релацији са ризиком за развој лезија ($p > 0,05$).

Пацијенткиње са дијагнозом Ca in situ и Ca invasivum имале су незначајно мању фреквенцу GSTT1 нултог генотипа у односу на контроле, док је GSTM1 нулти генотип незначајно заступљенији у групи пацијенткиња, са вероватноћом $p > 0,05$. Слично, разлике у дистрибуцији различитих комбинација генотипова нису се разликовале између пацијенткиња и контрола ($p > 0,05$). GSTT1 нулти генотип и GSTM1 нулти генотип нису повезани са ризиком за развој Ca in situ и Ca invasivum ($p > 0,05$). Такође, у односу на референтну групу, комбинације различитих GSTT1 и GSTM1 комбинација нису у релацији са ризиком ($p > 0,05$).

Табела 10 – Дистрибуција GSTT1 и GSTM1 генотипа код пацијенткиња у зависности од степена интрацервикалне лезије са количником шансе (OR) и 95% интервалом поверења (CI)

	Контроле (%)	Пацијенткиње (%)														
		<i>LSIL</i> ¹	p	OR	CI (95%)	p	<i>HSIL</i> ²	p	OR	CI (95%)	p	<i>CC</i> ³	p	OR	CI (95%)	p
Тотално	50	32					33					39				
Генотип																
<i>GSTT1</i>																
+ ⁴	30 (60,0)	18 (56,3)		1 (реф)			21 (63,6)		1 (реф)			25 (64,1)		1 (реф)		
- ⁵	20 (40,0)	14 (43,8)	0,74	1,17	0,48-2,87	0,74	12 (36,4)	0,74	0,86	0,35-2,12	0,74	14 (35,9)	0,69	0,84	0,35-1,99	0,69
<i>GSTM1</i>																
+	22 (44,0)	7 (21,9)		1 (реф)			8 (24,2)		1 (реф)			12 (30,8)		1 (реф)		
-	28 (56,0)	25 (78,1)	0,04	2,81	1,03-7,68	0,04	25 (75,8)	0,07	2,46	0,93-6,49	0,07	27 (69,2)	0,20	1,77	0,73-4,26	0,20
<i>GSTT1/GSTM1</i>																
+/+	11 (22,0)	3 (9,4)		1 (реф)			5 (15,1)		1 (реф)			10 (25,6)		1 (реф)		
+/-	19 (38,0)	15 (46,9)	0,14	2,89	0,68-12,28	0,15	16 (48,5)	0,33	1,85	0,53-6,46	0,33	15 (38,5)	0,80	0,87	0,29-2,59	0,80
-/+	11 (22,0)	4 (12,5)	1,0	1,33	0,24-7,40	0,74	3 (9,1)	0,69	0,60	0,11-3,15	0,55	2 (5,1)	0,07	0,20	0,04-1,13	0,07
-/-	9 (18,0)	10 (31,3)	0,07	4,07	0,85-19,43	0,08	9 (27,3)	0,27	2,20	0,54-8,96	0,27	12 (30,8)	0,54	1,47	0,43-4,95	0,54

¹Low grade squamous intraepithelial lesions; ² High grade squamous intraepithelial lesions; ³Ca in situ/Ca invasivum; ⁴укључује и хомозиготе и хетерозиготе; ⁵укључује хомозиготну делецију (нулти генотип)

Поред степена лезија, анализирана је дистрибуција гена и ризик у односу на још два фактора, године старости и пушачке навике (Табела 11).

Узимајући у обзир године старости пацијенткиње и контроле су подељене у две групе; једну групу чиниле су жене ≤ 45 година, док су другу групу чиниле жене преко 45 година старости. У групи ≤ 45 година, GSTM1 нулти генотип је био заступљенији у групи пацијенткиња, док је GSTT1 нулти генотип био заступљенији у контролној групи, али без статистичке значајности ($p > 0,05$). Разлике у дистрибуцији нису биле статистички значајне ни у погледу различитих GSTT1/GSTM1 комбинација ($p > 0,05$). Ризик за развој лезија није био повећан са нултим T1 и M1 генотиповима и различитим њиховим комбинацијама ($p > 0,05$).

За разлику од млађе групе, пацијенткиње > 45 година старости имале су већу фреквенцу GSTT1 нултог и GSTM1 нултог генотипа у односу на контролну групу жена. Разлика у дистрибуцији GSTM1 нултог генотипа између контроле и пацијенткиња била је на граници статистичке значајности (74,5% у односу на 50,0%; $p = 0,052$), а ризик за развој лезије скоро је три пута био већи код ових особа (OR=2,93 95% CI=0,97-8,84; $p = 0,057$). У погледу комбинација генотипова, статистички значајна разлика у дистрибуцији није уочена између контрола и пацијенткиња ($p > 0,05$).

Пацијенткиње и контроле су подељене на основу пушачких навика. У групи пушача GSTT1 нулти генотип и GSTM1 нулти генотип су незначајно заступљенији у групи пацијенткиња ($p > 0,05$). Већа фреквенца GSTM1 нултог генотипа била је и у групи пацијенткиња непушача док је фреквенца GSTT1 нултог генотипа била незначајно мања у овој групи ($p > 0,05$). Уочене разлике у дистрибуцији GSTT1/GSTM1 комбинација нису биле статистички значајне у групи пушача ни у групи непушача ($p > 0,05$). Ризик за развој лезија није био у релацији са GSTT1 и GSTM1 нултим генотиповима и различитим комбинацијама генотипова ни у групи пушача ни у групи непушача ($p > 0,05$).

Табела 11 - Дистрибуција GSTT1 и GSTM1 генотипа код пацијенткиња са дијагностикованим интрацервикалним лезијама и контроле у зависности од фактора ризика – година и пушења са количником шансе (OR) и 95% интервалом поверења (CI)

Фактори ризика												
Године												
	≤45						>45					
	Контроле (%)	Пацијенткиње ¹ (%)	р	OR	CI (95%)	р	Контроле (%)	Пацијенткиње (%)	р	OR	CI (95%)	р
<i>GSTT1</i>												
+ ²	18 (56,3)	37 (75,5)		1 (реф)			12 (66,7)	27 (49,1)		1 (реф)		
- ³	14 (43,8)	12 (24,5)	0,07	0,42	0,16-1,08	0,07	6 (33,3)	28 (50,9)	0,19	2,07	0,68-6,32	0,19
<i>GSTM1</i>												
+	13 (40,6)	13 (26,5)		1 (реф)			9 (50,0)	14 (25,5)		1 (реф)		
-	19 (59,4)	36 (73,5)	0,18	1,89	0,73-4,89	0,19	9 (50,0)	41 (74,5)	0,052	2,93	0,97-8,84	0,057
<i>GSTT1/GSTM1</i>												
+/+	6 (18,8)	9 (18,4)		1 (реф)			5 (27,8)	9 (16,4)		1 (реф)		
+/-	12 (37,5)	28 (57,1)	0,53	1,56	0,45-5,35	0,48	7 (38,9)	18 (32,7)	0,62	1,43	0,35-5,79	0,62
-/+	7 (21,9)	4 (8,2)	0,23	0,38	0,08-1,89	0,24	4 (22,2)	5 (9,1)	1,0	0,69	0,13-3,84	0,68
-/-	7 (21,9)	8 (16,3)	0,71	0,76	0,18-3,24	0,71	2 (11,1)	23 (41,8)	0,07	6,39	1,04-39,12	0,045

Наставак Табела 11												
<i>Пушачке навике</i>												
	Пушачи						Непушачи					
	Контроле (%)	Пацијенткиње ¹ (%)	р	OR	CI (95%)	р	Контроле (%)	Пацијенткиње (%)	р	OR	CI (95%)	р
<i>GSTT1</i>												
+ ²	18 (66,7)	33 (57,9)		1 (реф)			12 (52,2)	31 (66,0)		1 (реф)		
- ³	9 (33,3)	24 (42,1)	0,44	1,45	0,56-3,79	0,44	11 (47,8)	16 (34,0)	0,27	0,56	0,20-1,55	0,27
<i>GSTM1</i>												
+	11 (40,7)	15 (26,3)					11 (47,8)	12 (25,5)				
-	16 (59,3)	42 (73,7)	0,18	1,92	0,73-5,07	0,18	12 (52,2)	35 (74,5)	0,06	2,67	0,93-7,63	0,07
<i>GSTT1/GSTM1</i>												
+/+	7 (25,9)	9 (15,8)		1 (реф)			4 (17,4)	9 (19,1)		1 (реф)		
+/-	11 (40,7)	24 (42,1)	0,39	1,70	0,50-5,74	0,39	8 (34,8)	22 (46,8)	1,0	1,22	0,29-5,10	0,78
-/+	4 (14,8)	6 (10,5)	1,0	1,17	0,23-5,81	0,85	7 (30,4)	3 (6,4)	0,10	0,19	0,03-1,14	0,07
-/-	5 (18,5)	18 (31,5)	0,17	2,8	0,69-11,34	0,15	4 (17,4)	13 (27,7)	0,70	1,44	0,28-7,34	0,66

¹LSIL (low grade squamous intraepithelial lesions) + HSIL (high grade squamous intraepithelial lesions) + CC (Ca in situ/Ca invasivum); ²укључује и хомозиготе и хетерозиготе; ³укључује хомозиготну делецију (нулти генотип)

У Табели 12 и Графицима 5 и 6 приказане су средње вредности за МН фреквенцу у лимфоцитима периферне крви у зависности од GST статуса.

Пацијенткиње са GSTT1 нултим генотипом као и GSTM1 нултим генотипом имале су веће фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви у односу на особе са позитивним генотиповима ($15,08 \pm 4,71$ у односу на $13,88 \pm 3,66$; $14,47 \pm 4,31$ у односу на $14,00 \pm 3,57$), али без статистичке значајности ($p > 0,05$). Највећа фреквенца МН уочена је код пацијенткиња са GSTT1-/GSTM1- комбинацијом, док је најмања фреквенца уочена код пацијенткиња са GSTT1+/GSTM1+ комбинацијом. Разлике у фреквенцама МН између носиоца различитих комбинација није забележена ($p > 0,05$).

У контролној групи нису уочене значајне разлике у МН фреквенцама у односу на GSTT1 и GSTM1 статус. Највећа фреквенца МН била је код носиоца GSTT1-/GSTM1- комбинације ($9,50 \pm 3,11$), али без статистичке значајности у односу на остале комбинације. Најмања МН фреквенца уочена је код особа са GSTT1+/GSTM1- комбинацијом и она је била значајно мања у односу МН фреквенцу особа са GSTT1+/GSTM1+ комбинацијом ($p < 0,05$).

Табела 12 - Фреквенца микронуклеуса (МН) у лимфоцитима периферне крви у испитиваној популацији у зависности од GSTT1 и GSTM1 статуса

Генотип/МН фреквенца (ранг)								
Фактори	GSTT1		GSTM1		GSTT1/GSTM1			
	+	-	+	-	+/+	+/-	-/+	-/-
Пацијенткиње (95)								
	13,88±3,66 (7-24)	15,08±4,71 (6-26)	14,00±3,57 (6-20)	14,47±4,31 (6-26)	13,50±2,78 (9-20)	14,02±3,96 (7-24)	14,89±4,73 (6-20)	15,14±4,79 (6-26)
<i>p</i>	0,105		0,626			0,631 ¹	0,437 ² ;0,568 ³	0,217 ⁴ ;0,291 ⁵ ;0,890 ⁶
Контроле (41)								
Тотално	7,59±2,78 (3-16)	8,08±2,15 (6-14)	8,05±1,73 (5-10)	7,48±3,13 (3-16)	8,60±1,95 (5-10)	7,05±3,04 (3-16)	7,37±1,19 (6-10)	9,50±3,11 (7-14)
<i>p</i>	0,851		0,248			0,031 ¹	0,147 ² ;0,747 ³	1,0 ⁴ ;0,188 ⁵ ;0,102 ⁶

¹ +/+ у односу на +/-; ² +/+ у односу на -/+; ³ +/- у односу на -/+; ⁴ +/+ у односу на -/-; ⁵ +/- у односу на -/-; ⁶ -/+ у односу на -/-

Поред анализе повезаности GST статуса и МН фреквенце у лимфоцитима, урађена је и анализа повезаности GST статуса и NDI вредности, а резултати су приказани у Табели 13 и Графицима 20 и 21.

У групи пацијенткиња и контрола није уочена статистички значајна разлика у вредностима овог параметра у односу на GST статус ($p>0,05$). Слично, разлике у NDI вредностима нису уочене између носиоца различитих комбинација ($p>0,05$).

Табела 13 - Индекс нуклеусне деобе (NDI) у испитиваној популацији у зависности од GSTT1 и GSTM1 статуса

Генотип/NDI (ранг)								
Фактори	GSTT1		GSTM1		GSTT1/GSTM1			
	+	-	+	-	+/+	+/-	-/+	-/-
Пацијенткиње (101)								
	1,68±0,11 (1,24-1,86)	1,67±0,13 (1,30-1,83)	1,66±0,12 (1,26-1,83)	1,68±0,12 (1,24-1,86)	1,66±0,13 (1,26-1,83)	1,70±0,11 (1,24-1,86)	1,66±0,10 (1,48-1,81)	1,67±0,14 (1,30-1,83)
<i>p</i>	0,762		0,243			0,224 ¹	0,829 ² ;0,484 ³	0,503 ⁴ ;0,598 ⁵ ;0,650 ⁶
Контроле (45)								
	1,73±0,09 (1,50-1,89)	1,70±0,13 (1,45-1,84)	1,73±0,09 (1,53-1,84)	1,71±0,11 (1,45-1,89)	1,74±0,09 (1,53-1,84)	1,72±0,09 (1,50-1,89)	1,72±0,1 (1,53-1,84)	1,66±0,16 (1,45-1,84)
<i>p</i>	0,506		0,475			0,534 ¹	0,587 ² ;0,980 ³	0,254 ⁴ ;0,391 ⁵ ;0,391 ⁶

¹ +/+ у односу на +/-; ² +/+ у односу на -/+; ³ +/- у односу на -/+; ⁴ +/+ у односу на -/-; ⁵ +/- у односу на -/-; ⁶ -/+ у односу на -/-

Резултати мултипле линеарне регресионе анализе на узорку пацијенткиња приказани су у Табели 14. На фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви значајан утицај су имале године ($p < 0,05$), док остали фактори (пушење, спонтани/намерни побачаји, степен лезије, GSTT1 и GSTM1 статус) нису утицали на МН фреквенцу ($p > 0,05$). Од анализираних фактора, само је степен лезија значајно утицао на вредности NDI ($p < 0,05$).

На фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви здравих контрола и на NDI није утицао ниједан од анализираних фактора (године, пушење, спонтани/намерни побачаји, GSTT1 и GSTM1 статус) ($p > 0,05$) (Табела 15).

Табела 14 – Резултати мултипле линеарне регресионе анализе за МН фреквенцу у лимфоцитима периферне крви и NDI код пацијенткиња

Маркер	Нестандардизовани коэффициент		Стандардизовани коэффициент	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
<i>MH</i>					
Константа	7,510	1,88		3,995	0,000
Године	0,133	0,038	0,391	3,484	0,001
Пушење	0,180	0,852	0,022	0,211	0,833
Спонтани побачаји	0,532	0,861	0,059	0,618	0,539
Намерни побачаји	0,941	0,836	0,114	1,126	0,263
Степен лезије	0,351	0,558	0,07	0,630	0,530
GSTT1	-0,607	0,849	-0,072	-0,716	0,476
GSTM1	-0,778	0,892	-0,084	-0,872	0,386
<i>NDI</i>					
Константа	1,762	0,058		30,447	0,000
Године	0,00	0,001	0,032	0,278	0,781
Пушење	-0,031	0,026	-0,127	-1,202	0,232
Спонтани побачаји	-0,009	0,026	-0,034	-0,344	0,731
Намерни побачаји	-0,009	0,026	-0,036	-0,341	0,734
Степен лезије	-0,040	0,017	-0,275	-2,432	0,017
GSTT1	0,024	0,026	0,095	0,921	0,359
GSTM1	-0,020	0,027	-0,071	-0,721	0,473

Табела 15 – Резултати мултипле линеарне регресионе анализе за МН фреквенцу у лимфоцитима периферне крви и NDI код здравих контрола

Маркер	Нестандардизовани коэффицијент		Стандардизовани коэффицијент	t	p
	B	Стандардна грешка	Beta		
<i>MH</i>					
Константа	5,138	2,364		2,174	0,037
Године	0,062	0,060	0,189	1,031	0,310
Пушење	0,288	0,928	0,056	0,311	0,758
Спонтани побачаји	0,993	1,159	0,160	0,857	0,397
Намерни побачаји	-0,151	0,977	-0,027	-0,155	0,878
GSTT1	-0,838	1,040	-0,149	-0,806	0,426
GSTM1	0,592	0,964	0,115	0,614	0,543
<i>NDI</i>					
Константа	1,576	0,086		18,410	0,000
Године	0,002	0,002	0,187	1,159	0,254
Пушење	-0,042	0,033	-0,203	-1,279	0,209
Спонтани побачаји	0,051	0,043	0,196	1,176	0,247
Намерни побачаји	0,022	0,034	0,103	0,662	0,512
GSTT1	0,035	0,035	0,159	0,995	0,36
GSTM1	0,048	0,034	0,229	1,417	0,165

5. ДИСКУСИЈА

У свету са око 14,1 милиона нових случајева и 8,2 милиона смртних случајева у 2012. години, канцер представља велики глобални проблем (*Ferlay u cap., 2013*). У Централној Србији канцер грлића материце је по заступљености трећи облик малигнитета код жена, а четврти узрок смртности од малигних тумора код жена (*Регистар за рак у централној Србији, 2013*). Према подацима за 2011. годину (*Регистар за рак у централној Србији, 2013*), највећи број новооболелих од канцера грлића материце је у старосној групи 60-64 године живота (120 жена, инциденца 62,1/100000 жена). У нашој студији највећи број жена са карциномом био је управо у овој старосној групи. Највећи број жена са LSIL забележили смо у групи 50-54 година, док је HSIL дијагноза била најзаступљенија у групи 35-39 година.

HPV инфекција као и инфекција другим вирусима, број сексуалних партнера, раније ступање у сексуалне односе и паритет, као и пушење сматрају се најзначајнијим факторима ризика за развој лезија. Иако је HPV анализа урађена на малом узорку (21 пацијенткиња), резултати ове студије потврђују чињеницу да је већина жена са дијагностикованим интрацервикалним лезијама HPV позитивно (приближно 67%).

Хромозомска нестабилност се сматра једном од карактеристика премалигних и малигних стања. У циљу превенције, уложени су велики напори у проналажењу релевантних биомаркера хромозомских оштећења, а који би имали примену у процени ризика за развој и у дијагнози канцера. Досадашња цитогенетичка истраживања утврдила су велики број маркера за праћење хромозомске нестабилности у различитим типовима ћелија. Међутим, због једноставности и брзине извођења теста, испитивање фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви је ефикасан и ефективан начин процене хромозомске нестабилности у анализираним ћелијама. Микронуклеуси се у бинуклеусним лимфоцитима виде као мала екстрануклеусна телашца која су јасно одвојена од главног једра. Имајући у виду карактеристике лимфоцита (рецикулација и контакт са органима и ткивима), праћење фреквенце МН може рефлектовати реално стање организма. Тако су до сада бројне студије показале постојање везе између патолошких стања и фреквенце МН у лимфоцитима (*Migliore u cap., 1997; Trkova u cap., 2001; Yesilda u cap., 2006; Guven u cap., 2007; Milošević-Đorđević u cap., 2010*). Такође, анализе МН фреквенце у здравој популацији показале су да МН фреквенца

може бити поуздани предиктивни биомаркер за развој канцера (*Bonassi u cap., 2007*) и кардиоваскуларних болести (*Murgia u cap., 2007*).

Почетком осамдесетих година XX века, анализа спонтаних оштећења наследног материјала жена са преканцерогеним и канцерогеним лезијама грлића материце била је предмет истраживања цитогенетичких студија. Прелиминарна студија спроведена на 13 пацијенткиња са цервикалним карциномом и 11 контрола, показала је значајно повећану фреквенцу SCE особа са дијагностикованим цервикалним карциномом (*Mitra u cap., 1982*). Ове резултате потврдила је и студија Sou и сарадника (*1986*), која је показала да и пацијенткиње са различитим стадијумима цервикалног карцинома (0-III) имају значајно веће SCE у лимфоцитима у односу на контролну групу жена. Користећи исти биомаркер (SCE) за оштећење наследног материјала у лимфоцитима жена са дијагностикованим карциномом грлића материце до истог закључка дошла је и друга група аутора (*Murty u cap., 1986; Lukovic u Milasin, 1992; Dhillon u cap., 1996; Cortés-Gutiérrez u cap., 2000*). Значајно већа фреквенца хромозомских аберација у лимфоцитима жена са дијагностикованим малигним лезијама грлића материце потврђена је у студији Murty и сарадника (*1985*). Изузев веће хромозомске нестабилности у лимфоцитима периферне крви, студије су показале да особе са дијагностикованим интрацервикалним лезијама имају и већу фреквенцу МН у епителним ћелијама цервикса (*Guzmán u cap., 2003; Samanta u cap., 2011*).

Како су промене у генетичком материјалу претеча свих догађања у канцерогенези, претпостављало се да ће повећана фреквенца цитогенетичких маркера бити присутна код жена са дијагностикованим преканцерогеним лезијама грлића материце. Тако је у једном броју студија, применом различитих цитогенетичких тестова као што су SCE (*Murty u cap., 1986*), СА (*Murty u cap., 1985*) и МН (*Leal-Garza u cap., 2002*) потврђено да су код жена са преканцерогеним цервикалним лезијама присутна повећана хромозомска оштећења у лимфоцитима периферне крви. Такође, значајно већа фреквенца МН забележена је у ћелијама цервикса пацијенткиња са преканцерогеним лезијама грлића материце (*Olaharski u cap., 2006*).

Резултати наше студије показали су веће фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња, што потврђује да пацијенткиње са интрацервикалним лезијама стадијума LSIL, HSIL и Ca in situ/Ca invasivum имају значајно већа хромозомска оштећења у односу на контролну групу здравих жена. Ови резултати су у сагласности са резултатима студије Leal-Garza и сарадника (*2002*).

Имајући у виду различите стадијуме интрацервикалних лезија, у нашој студији, фреквенца МН упоредо је расла са степеном лезија. Најнижа фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви забележена је код жена са дијагнозом LSIL, затим са дијагнозом HSIL, а највећа фреквенца забележена је код жена са дијагностикованим Ca in situ/Ca invasivum. Међутим, иако је примећена ова тенденција, статистички значајна разлика у МН фреквенцама није забележена. Слично, Leal-Garza и сарадници (2002) нису уочили значајне разлике у МН фреквенцама између LSIL и HSIL пацијенткиња, док је разлика између ових стадијума и инвазивне форме Ca постојала у епителним ћелијама цервикса и у лимфоцитима.

Повећана фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња се може приписати многим факторима. Према Leal-Garza и сарадника (2002) неколико је могућности којима се може објаснити повећање хромозомске нестабилности: метаболички стрес услед раста тумора, кластогени продукти из туморских ћелија, недостататак фолата или витамина B12, а као један од разлога наводи се и присуство HPV-а. Познато је да је већина жена са дијагностикованим интрацервикалним лезијама HPV позитивно, а две студије су и показале да HPV16 E7 онкогени протеин доводи до центрозомалне абнормалности у *in vitro* условима (Duensing *u cap.*, 2000, 2001). Alvarez-Rosero и сарадници (2008) указали су на корелацију између присуства високо ризичних HPV у цервикалним ћелијама и геномске нестабилности у лимфоцитима. Такође, показано је да фреквенца МН у цервикалним ћелијама значајно расте од HPV негативних контролних жена, преко жена са лезијама и присуством нискоризичних HPV до жена са лезијама и присуством високоризичних HPV (Cortes-Gutierrez *u cap.*, 2010).

Предност ЦБМН теста огледа се и у могућности праћења других цитогенетичких маркера – нуклеоплазматских мостова и нуклеусних пупољака. Анализирајући ове маркере у испитиваној популацији, показано је да је фреквенца НПМ била значајно већа у LSIL и HSIL групи пацијенткиња у односу на контролну групу здравих жена. Имајући ово у виду, може се претпоставити да је поред хромозомских прекида или губитка хромозома овај вид хромозомске нестабилности карактеристика раних стадијума цервикалне канцерогенезе.

Број микронуклеуса у БН ћелији рефлектује ниво оштећења тако да су ћелије са већим бројем МН претрпеле већа генетичка оштећења. У нашој студији највећи број БН са МН забележен је у узорку пацијенткиња са карциномом. Број БН ћелија са МН расте са порастом степена лезије. Најмања заступљеност ових ћелија забележена је у

узорку LSIL (1,24%), а највећа у узорку пацијенткиња са дијагнозом Ca in situ/Ca invasivum (1,41%). БН ћелије са већим бројем МН (2, 3 и 4 МН) забележене су у већој мери код пацијенткиња у односу на здраве жене. Бинуклеусна ћелија са највећим оштећењем (5МН) забележена је само у LSIL групи. Ови резултати још једном потврђују претпоставку о повећаној хромозомској нестабилности у лимфоцитима периферне крви особа са интрацервикалним лезијама.

У циљу утврђивања релевантности овог маркера у дијагностичке сврхе и оптималне cut off вредности за МН у лимфоцитима периферне крви, урађена је ROC анализа, која се често користи за утврђивање значаја различитих маркера у дијагностици. Резултати наше студије су потврдили да је МН добар биомаркер за дијагностиковање лезија (AUC=0,917; p<0,0005). Оптимална cut off вредност за МН фреквенцу у лимфоцитима износила је 10,5 МН/1000 БН (са сензитивношћу од 84,2% и специфичношћу од 95,1%) на основу чега је она изабрана за идентификацију жена са лезијама од здравих жена.

Интериндивидуалне варијације у фреквенци МН примећене су у испитиваним групама ове студије. На основу досадашњих радова може се претпоставити да су потенцијални фактори ових разлика стил живота (пушачке навике, начин исхране), демографске карактеристике, медицинска историја или генетска конституција. Утицај ових фактора на фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви анализиран је у бројним ранијим цитогенетичким студијама, али су резултати контрадикторни.

Анализирајући пушачке навике један број студија показао је да пушачке навике не утичу на фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви (*Hessel u cap., 2001; Costa u cap., 2006*). Међутим, HUMAN MicroNucleus пројектом и реанализом студија, Bonassi и сарадници (*2003*) показали су да пушење има ефекта на фреквенцу МН, али само у групи тешких пушача (≥ 30 цигарета на дан) који нису професионално изложени генотоксичним агенсима. Анализом пушачких навика у групи пацијенткиња и контролној групи здравих жена у нашој студији показано је да пушење није фактор који утиче на фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви. Могуће објашњење за овакве резултате је просечан број конзумираних цигарета код анализираних жена (<20 цигарета на дан). Интересантно је да су Bonassi и сарадници (*2003*) закључили у својој студији да особе које конзумирају мањи број цигарета (мање од 20 цигарета на дан) имају чак и мању фреквенцу МН у односу на непушаче. Исти аутори наводе да се овакав резултат може објаснити различитим механизмима, а адаптивни одговор ћелије је један од објашњења. Стално излагање токсинима из цигарета може стимулисати

адаптивни одговор ћелије, што може да доведе до смањења МН фреквенце. Са друге стране могуће је да због великих оштећења ћелије нису преживеле култивацију или се нису делиле због чега нису могле да настану БН ћелије на којима се броје МН (*Bonassi u cap. 2003*) и да само ћелије са мањом количином генетичког оштећења могу да преживе и да се деле у култури. У нашој студији није било разлике у заступљености БНМН ћелија, као ни разлике у дистрибуцији МН између пушача и непушача. Такође, слично резултатима студије Coskun и сарадника (*2013*), резултати нашег рада су показали да пушење не утиче на фреквенцу НПМ и НМ.

Године старости се сматрају потенцијалним фактором који може да модулира фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви. Fenech (*1998*) наводи године као фактор који утиче на фреквенцу МН у лимфоцитима, односно да са годинама старости долази до повећања МН фреквенце. Са овим закључком у сагласности су и резултати других студија (*Bolognesi u cap., 1997; Bolognesi u cap., 1999*). Са друге стране, позитивна корелација између година старости и МН фреквенце није забележена у студији Тркова и сарадника (*2000*). Слично, Lewinska и сарадници (*2005*) су закључили да године старости нису значајан фактор који утиче на МН фреквенцу.

Према резултатима наше студије, а упоређујући две старосне групе (≤ 45 у односу на >45 године), старије жене у групи пацијенткиња и у контролној групи жена су имале више фреквенце МН у лимфоцитима, указујући на то да су године значајан фактор који може да утиче на фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви. Како наводе Fenech и Bonassi (*2011*) повећање МН фреквенце са годинама највероватније је резултат комбинације фактора: нумеричке и структурне аберације које су последица дугогодишњег излагања ендогеним и екзогеним генотоксинима као и нездравих животних навика; кумулативни ефекат мутација гена укључених у ДНК репарацију, сегрегација хромозома и контрола ћелијског циклуса. Иако је ранијим радовима показано да постоји корелација између година и НП (*Nefic u Handzic, 2013; Coskun u cap., 2013*), у нашој студији то није потврђено.

Анализом података из репродуктивне историје (спонтани и намерни побачаји) као потенцијалних модулирајућих фактора МН фреквенце, показали смо да наведени фактори нису утицали на МН фреквенцу у узорку пацијенткиња и у контролној групи здравих жена. Такође, ови фактори нису имали ефекта ни на остале цитогенетичке маркере (НПМ и НП).

Поред наведених фактора, велико интересовање је усмерено и на анализу утицаја генске конституције на ниво генетичких оштећења (*Ishikawa u cap., 2004; Liu u cap., 2006; Zijno u cap., 2006; Kumar u cap., 2011; Singh u cap., 2012*).

Познато је да ензими GST фамилије учествују у метаболизму ендогених и екзогених агенаса и да ензими ове фамилије штите ћелију од оксидативних оштећења (*Hayes u McLellan, 1999*). Хомозиготна делеција описана је за два гена из ове фамилије GSTT1 и GSTM1, а резултат делеција је одсуство ензима. Због недостатка функционално активних ензима, смањена способност детоксификације може довести до оштећења ДНК молекула, која се могу детектовати као повећане фреквенце цитогенетичких биомаркера. Због поузданости и валидности методе, анализа фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви је примењена у овој студији за анализу корелације између генског полиморфизма и нивоа генетичког оштећења код пацијенткиња и здравих жена.

Пацијенткиње са нултим GSTT1 и GSTM1 генотиповима, имале незначајно веће фреквенце МН у лимфоцитима у односу на особе са присутним генима. Особе са комбинацијом оба нулта генотипа су без статистичке значајности имале већу фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви у поређењу са осталим комбинацијама генотипова (GSTT1 позитивни/GSTM1 позитивни, GSTT1 позитивни/GSTM1 негативни и GSTT1 негативни/GSTM1негативни). Слично, у студији у којој су били укључени пацијенти са дијагностикованим тироидним канцером, генска конституција GSTT1 нулта и GSTM1 нулта генотип није утицала на фреквенцу микронуклеусних БН ћелија (*Hernandez u cap., 2006*).

У узорку здравих жена, фреквенце МН у лимфоцитима су биле сличне између особа са нултим генотиповима и позитивним генотиповима. Анализирајући различите комбинације генотипова, особе са оба нулта генотипа су имале највећу фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви, али без статистичке значајности. Значајно мању фреквенцу МН у односу на особе са оба позитивна генотипа имале су особе са комбинацијом GSTT1 позитивни/GSTM1негативни генотип. Већи део доступних студија показале су да GSTT1 и/или GSTM1 гени не утичу на биомаркере генетичких оштећења као што су СА, SCE, комет тест, фреквенца МН, код особа које су биле изложене дејству мутагена и у контролним групама (*Scarpato u cap., 1997; Wu u cap., 2000; Texeira u cap., 2004; Ishikawa u cap., 2004; Liu u cap., 2006; Villarini u cap., 2008; Singh u cap., 2012*). Штавише недавна pooled анализа на узорку од 644 особа (301 особа које нису биле професионално изложене генотоксичним агенсима и 343 особе које су

биле изложене генотоксичним агенсима) показала је да особе са GSTT1 нултим генотипом имају мању фреквенцу МН у лимфоцитима у односу на носиоце овог гена (*Kirsch-Volders u cap., 2006*). Међутим, студија Kumar и сарадника (*2011*) показала је да особе са GSTT1 нултим и GSTM1 нултим генотиповима имају значајно већу фреквенцу цитогенетичких биомаркера као што су SCE и МН у лимфоцитима периферне крви у односу на особе са позитивним генотиповима. Слично, применом алкалног комет теста показано је да особе које су изложене пестицидима, а који су носиоци GSTM1 нултог генотипа имају већа ДНК оштећења у односу на особе са позитивним GSTM1 генотипом (*Singh u cap., 2012*).

Узимајући у обзир степен лезије, године, пушачке навике, спонтане и намерне побачаје и GSTT1 и GSTM1 статус, мултипла регресиона анализа на узорку пацијенткиња показала је да су једино године старости утицале на МН фреквенцу у лимфоцитима периферне крви ($p < 0,05$). Иста анализа у узорку здравих жена није показала утицај анализираних фактора на фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви.

У овој студији индекс нуклеусне деобе (NDI) узет је као параметар пролиферационог статуса ћелијске фракције. Изузев за пацијенткиње са карциномом, није било разлике у пролиферационом параметру између контрола и пацијената. Иако није била значајна разлика, примећен је пад пролиферационог индекса са порастом степена лезије. Ниже вредности овог параметра код пацијената са неопластичним колоректалним лезијама приказани су у студији Ionescu и сарадника (*2011*). Аутори су закључили да због већих генетичких оштећења лимфоцити вероватно умиру пре ћелијске деобе, подложнији су апоптози или некрози или имају мању вероватноћу за улазак у ћелијску деобу, чиме се смањује број деоба, а самим тим NDI вредности.

Анализом корелације генске конституције и NDI вредности, показано је да генска GST конституција (T1 и M1) нема ефекта на ћелијску кинетику у обе испитиване групе, пацијенткиње и контроле.

Мултипла регресиона анализа је показала да је само степен лезије значајно утицао на NDI вредности, док остали фактори (године, пушачке навике, спонтани и намерни побачаји и GSTT1 и M1 статус гена) нису значајно утицали у групи пацијенткиња и здравих контрола.

Поред егзогених фактора који представљају факторе ризика за развој малигнух обољења, генетска основа појединца може имати веома значајну улогу у канцерогенези. Тако, поред осталих, варијације у генима T1 и M1 GST фамилије могу

представљати потенцијалне факторе ризика. Продукти ове класе припадају ензимима друге фазе детоксификације и учествују у ћелијском метаболизму и детоксификацији организма. Велики број досадашњих студија био је усмерен на анализу полиморфизма GSTT1 и GSTM1 гена и ризика за развој различитих обољења. Хомозиготна делеција описана је код оба ова гена, а резултира недостатком функционално активног продукта. Претпоставља се да ће услед недостатка функционално активног ензима, ове особе имати повећани ризик за развој различитих обољења. Међутим, у доступној литератури постоје опречни резултати када је у питању повезаност између полиморфизма ових гена и патолошких стања. Наиме, постоје студије у којима није запажена асоцијација између делеције GSTT1 и GSTM1 гена и различитих облика малигнитета као што су канцер плућа (*Saarikoski u cap., 1998*), орални карцином (*Losi-Guembarovski u cap., 2008*) и канцер простате (*Lavender u cap., 2009*). Међутим, постоје и студије које су показале да постоји повезаност између овог GSTT1 генског полиморфизма и повећаног ризика за развој канцера желуца (*Palli u cap. 2005*) и мијелоидне леукемије (*Taspinar u cap., 2008*), односно GSTT1 и GSTM1 делеције и канцера главе и врата (*Singh u cap., 2008*).

Карцином грлића материце је био предмет проучавања генетичких студија. Поред GST полиморфизма, анализирана је повезаност и других гена са преканцерогеним и канцерогеним лезијама грлића материце: CYP1A1 (*Taskiran u cap., 2006; Juarez-Cedilloa u cap., 2007*), FAS/FASL (*Lai u cap., 2005*) NQO1 (*Niwa u cap., 2005*), CYP2E1 и mEH (*Sierra-Torres u cap., 2003*).

Једна од првих студија која је анализирала повезаност GSTT1 и GSTM1 нултог полиморфизма и лезија грлића материце урађена је на популацији белкиња и показала је да не постоји корелација између GSTT1 нултог, GSTM1 нултог генотипа као и комбинацију ова два нулта генотипа и цервикалних лезија (*Warwick u cap., 1994a, Warwick u cap., 1994b*).

Каснија студија на мултиетничкој популацији показала је да запажени повећани ризик за развој лезија код носилаца GSTM1 нултог генотипа није статистички значајан. У истој студији није запажена корелација између GSTT1 нултог генотипа и цервикалних лезија (*Goodman u cap., 2001*). Иако је фреквенца GSTT1 нултог генотипа била виша у групи жена са цервикалним карциномом, GSTT1 нулти генотип није имао утицаја на развој лезија (*Sharma u cap., 2004*). Ниједан од GSTT1 и GSTM1 нултих генотипова није повећао ризик за развој сквамозног цервикалног канцера у популацији жена североисточног Тајланда (*Settheetham-Ishida u cap., 2009*), а слични резултати су

добијени и анализом истих генотипова у популацији Туркиња (*Kiran u cap., 2010*) и Гркиња (*Agorastos u cap., 2007*).

Иако је један број студија показао да не постоји повећани ризик за развој лезија, у другим студијама је ипак уочена корелација. Тако је 2,5 пута био повећан ризик за развој лезија код жена из Индије које су имале GSTM1 нулти генотип (*Sharma u cap., 2004*). Присуство GSTT1 нултог генотипа повећао је ризик за развој аденокарцинома грлића материце (*de Carvalho u cap., 2008*), HSIL и цервикалног канцера (*Ueda u cap., 2010*), док је присуство GSTM1 нултог генотипа повећавао ризик за развој цервикалних неоплазија (*Sierra – Torres u cap., 2003*). Значајно већа фреквенца GSTM1 и GSTT1 нултих генотипова и повећани ризик за развој преканцерогених лезија био је у популацији белкиња са присутним високо ризичним HPV, а ризик је био знатно већи код особа са оба нулта генотипа (*Cseh u cap., 2011*).

Због опречних резултата о улози ових гена у развоју лезија грлића материце, недавно је урађено неколико мета студија (*Economopoulos u cap., 2010; Gao u cap., 2011; Wang u cap., 2011; Sui u cap., 2011; Zhang u cap., 2012*). Анализом укупне испитиване популације, показано је да присуство GSTM1 нултог генотипа повећава ризик за развој цервикалних неоплазија, док је GSTT1 нулти генотип значајно повећавао ризик само у студији Гао и сарадника (*2011*). Међутим, и у самим мета анализама и између анализа било је разлика у улогама наведених полиморфизама у развоју лезија, нарочито када су анализе рађене на основу етничке припадности и стадијума лезија. Због оваквих резултата, а у циљу бољег разумевања улоге ових гена у цервикалној канцерогенези, било је потребно да се спроведу додатна истраживања.

Наша студија показала је да су пацијенткиње имале значајно већу фреквенцу GSTM1 нултог генотипа у односу на здраве жене (74% у односу на 56%, $p < 0,05$). Носиоци GSTM1 нултог генотипа имале су више од два пута повећани ризик за развој лезија у односу на жене са позитивним GSTM1 генотипом ($OR=2,24$ $CI=1,10-4,56$ $p < 0,05$). Добијени резултати указују на потенцијалну протективну улогу GSTM1 гена. У нашој студији GSTT1 нулти генотип није био повезан са повећаним ризиком за развој интрацервикалних лезија ($OR=0,94$ $CI=0,47-1,86$ $p > 0,05$). У односу на референтну групу (GSTT1 позитивни /GSTM1 позитивни генотип), незнатно већи ризик за развој лезија био је код носилаца оба нулта генотипа, али без статистичке значајности.

Компарацијом фреквенци нултих генотипова код пацијенткиња са дијагностикованим различитим стадијумима лезија и здравих жена потврђена је

значајна улога GSTM1 нултог генотипа једино у развоју LSIL, док овај генотип није представљао фактор ризика за развој HSIL и Ca in situ/Ca invasivum, указујући да нулти генотип има значајну улогу у раним фазама развоја лезија. Носиоци GSTM1 делеције имали су скоро три пута већи ризик за развој LSIL у односу на носиоце позитивног генотипа (OR=2,81 CI=1,03-7,86 p<0,05). Добијени резултати у сагласности су са резултатима мета анализе (*Sui u cap., 2011*), који су показали да присуство GSTM1 нултог генотипа има значајну улогу у развоју раних стадијума лезија. Овакви резултати могу указивати да је делеција GSTM1 гена фактор ризика за почетне стадијуме, али да није довољан за развој виших стадијума лезија и да вероватно постоје и додатни кофактори ризика као што су животне навике и HPV инфекција. Међутим, у мета анализи Gao и сарадника (*2011*) показано је да GSTM1 нулти генотип нема улогу у развоју LSIL, HSIL, сквамозног, адено и аденоквамозног карцинома.

GSTT1 нулти генотип није имао значајну улогу у развоју LSIL, HSIL и CC, што је потврђено и у мета анализама (*Sui u cap., 2011; Gao u cap., 2011*). У односу на референтну групу (GSTT1 позитивни и GSTM1 позитивни генотип) носиоци оба нулта генотипа имали су већи ризик за развој свих стадијума лезија, ипак овај ризик није био статистички значајан.

Сматра се да је HPV инфекција један од главних фактора ризика за развој лезија, показано је да он није довољан фактор и да је пушење један битан кофактор. Дим цигарете је сложеног хемијског састава и садржи више од 5600 супстанци (*Perfetti u Rodgman, 2011*), од којих је један број са канцерогеним ефектом (*Fowles u Dybing, 2003*). Имајући у виду да су раније студије показале присуство ових једињења у цервикалном мукусу код пушача (*McCann u cap., 1992; Prokopczyk u cap., 1997*) и да су поједина једињења супстрат за GST ензиме, поставља се питање да ли услед недостатка функционалног ензима пушачи имају већи ризик за развој лезија. Palma и сарадници (*2010*) показали су да не постоји интеракција између пушења и GSTT1 и GSTM1 полморфизама у развоју цервикалних лезија. Међутим аутори ове студије наглашавају да мали узорак може бити узрок оваквих резултата. Слично, Settheetham – Ishida и сарадници (*2009*) нису утврдили већи ризик за развој лезија код пушача са GSTM1 нултим и GSTT1 нултим генотипом. Међутим, супротно овим резултатима, пасивни пушачи носиоци нултих GSTT1 и GSTM1 генотипова имали су значајно већи ризик за развој канцера грлића материце (*Sobti u cap., 2006*). У нашој студији пушачи су имали већу фреквенцу GSTT1 нултог генотипа и GSTM1 нултог генотипа у односу на пушаче са истим генотиповима из контролне групе и већи ризик за развој лезије, али

без статистички значајности. Иако су у односу на референтну групу пушачи са оба нулта генотипа имали скоро три пута већи ризик за развој лезија, разлика у дистрибуцији није била значајна, што се у овом случају може објаснити малим узорком (само 18 пацијената и 5 контрола је било са наведеним карактеристикама). Такође, ензимима GST фамилије супстрати се преклапају (*Hayes u cap., 2005*), тако да недостатак једног од ензима може бити надокнађен другим ензимом.

Недостатак ензима који учествују у детоксификацији и дужа изложеност егзо и ендотоксинима може да повећа ризик за развој болести. Претпоставка да старије особе имају већи ризик за развој лезија потврђена је и у овој студији. Наиме, пацијенткиње >45 година имале су већу фреквенцу GSTM1 нултог генотипа у односу на здраве жене исте старосне категорије, а разлика је била на граници статистичке значајности. Резултати раније објављене студије показала је да особе које су старије од 45 година и имају GSTM1 делецију имају већи ризик за развој лезија (*Sharma u cap., 2004*). У нашој студији ризик за развој лезија није био у асоцијацији са годинама старости и полиморфизмом GSTT1 гена, што је показала и студија Sharma и сарадника (*2004*).

Иако је студија Cseh и сарадника (*2011*) показала да особе са HPV инфекцијом и нултим генотиповима имају већи ризик за развој лезија, услед недостатка података о HPV инфекцији (доступни само за 21 пацијенткињу и ниједну жену из контролне групе), у овој студији анализа о интеракцији није рађена.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата добијених применом микронуклеус теста и мултиплекс PCR-а могу да се изведу следећи закључци:

1. Особе са дијагностикованим интрацервикалним лезијама грлића материце (LSIL, HSIL и Ca in situ/Ca invasivum) имају значајно већу фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви у односу на контролну групу здравих жена, што указује да је хромозомска нестабилност (прекиди хромозома или губитак хромозома) у лимфоцитима периферне значајна карактеристика ових пацијенткиња. Повећана нестабилност може бити повезана са молекуларном основом болести,
2. Додатном применом ROC анализе потврђено је да се МН фреквенца у лимфоцитима периферне крви може применити као релевантан биомаркер за дијагностиковање лезија. Оптимална cut off вредност за МН фреквенцу у лимфоцитима за идентификацију жена са лезијама од здравих жена била је 10,5 МН/1000 БН (сензитивност 84,2% и специфичност 95,1%),
3. Хромозомска нестабилност у лимфоцитима периферне крви се повећавала са прогресијом интрацервикалних лезија (LSIL<HSIL<Ca in situ/Ca invasivum), али разлике у МН фреквенцама нису статистички значајне ($p>0,05$),
4. У лимфоцитима периферне крви жена са интрацервикалним лезијама хромозомска нестабилност је потврђена и већом затупљеношћу БНМН (1,41% Ca in situ/Ca invasivum, 1,35% HSIL, 1,24% LSIL, 0,72% контрола),
5. Једна од карактеристика раних стадијума интрацервикалних лезија (LSIL и HSIL) је и већа фреквенца НПМ у лимфоцитима периферне крви у односу на здраве жене ($p<0,05$),
6. Фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви, није условљена статусом GSTT1 као и GSTM1 гена код пацијенткиња и здравих жена,
7. Индекс нуклеусне деобе (NDI) је значајно мањи код особа са дијагностикованим карциномом грлића материце у односу на контролну групу здравих жена, што указује на смањену кинетику лимфоцита периферне крви код пацијенткиња. Добијени резултати наводе на закључак да услед повећане количине хромозомских оштећења ћелије улазе у апоптозу што се региструје као смањене NDI вредности,
8. Резултати мултипле регресионе анализе на узорку пацијенткиња показали су да једино године старости утичу на фреквенцу МН у лимфоцитима периферне крви ($p<0,05$), док остали фактори, као што су степен лезије, пушење, спонтани и

намерни побачаји, статус GSTT1 и GSTM1 гена нису утицали на МН фреквенцу. Резултати исте анализе показали су да степен лезије утиче на вредности NDI,

9. У узорку здравих жена, мултипла регресиона анализа показала је да ниједан од анализираних фактора (године старости, пушење, спонтани и намерни побачаји, статус GSTT1 и GSTM1 гена) није утицао на МН фреквенцу и NDI вредности.
10. Фреквенца GSTM1 нултог генотипа била је значајно већа код пацијенткиња са интрацервикалним лезијама у односу на здраве жене ($p < 0,05$), док разлика у фреквенцама GSTT1 нултог генотипа између пацијенткиња са интрацервикалним лезијама и здравих жена није била значајна ($p > 0,05$),
11. Носиоци нултог GSTM1 генотипа имале су преко 2 пута већи ризик за развој лезија, а ризик је био већи код особа >45 старости (на граници статистичке значајности). GSTM1 нулти генотип имао је значајну улогу само у развоју раних фаза лезија (LSIL). Резултати указују на протективну улогу GSTM1 гена у развоју лезија,
12. Носиоци нултог GSTT1 генотипа нису имали значајно већи ризик за развој интрацервикалних лезија, узимајући у обзир стадијум лезија, године старости и пушење цигарета.

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996;107:229-233.
2. Agorastos T, Papadopoulos N, Lambropoulos AF, Chrisafi S, Mikos T, Goulis DG, Constantinidis TC, Kotsis A, Bontis JN. Glutathione-S-transferase M1 and T1 and cytochrome P1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to cervical intraepithelial neoplasia in Greek women. *Eur. J. Cancer Prev.* 2007;16: 498-504.
3. Alexandria AK, Nyberg F, Warholm M, Rannug A. Influence of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, and NQO1 genotypes and cumulative smoking dose on lung cancer risk in a Swedish population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004;13:908-914.
4. Alexandria AK, Rannug A, Juronen E, Tasa G, Warholm M. Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the GSTT1 gene. *Pharmacogenetics* 2002;12:613-619.
5. Alvarez-Rosero RE, Rodriguez-Argote J, Arboleda-Moreno YY, Munoz-Benitez SL, Sierra-Torres CH. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of high-risk HPV-infected women with HGSIL. *Environ. Mol. Mutagen.* 2008;49:688–694.
6. Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, Fares MY, Stone A, Kadlubar FF, Hutchins LF. Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* 2001 1;61:7130-7135.
7. Antonucci GA, de Syllos Cólus IM. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2000;20:265-272.
8. Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998;31:228-242.
9. Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, Dos Santos CE, Dias JF, da Silva J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat. Res.* 2013;752:28-33.
10. Binici DN, Karaman A, Coşkun M, Oğlu AU, Uçar F. Genomic damage in patients with type-2 diabetes mellitus. *Genet. Couns.* 2013;24:149-156.
11. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830:3267-3288.
12. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalprà L, De Ferrari M, Degrossi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister

- chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1997;6:249-256.
13. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, Bonassi S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing.* 1999;28:393–397.
 14. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001;37:31-45.
 15. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M; HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat. Res.* 2003;543:155-166.
 16. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarffi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28:625-631.
 17. Cavallo D, Ursini CL, Omodeo-Salè E, Iavicoli S. Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. *Mutat. Res.* 2007;628:11-18.
 18. Cefle K, Ucur A, Guney N, Ozturk S, Palanduz S, Tas F, Asoglu O, Bayrak A, Muslumanoglu M, Aydiner A. Increased sister chromatid exchange frequency in young women with breast cancer and in their first-degree relatives. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2006;171:65-67.
 19. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14:1157-1164.
 20. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 2003;89 :101-105.
 21. Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P. Structure and organization of the human Theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem. J.* 1998;334:617-623.

22. Coles BF, Kadlubar FF. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: Determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors*. 2003;17:115-130.
23. Cortés-Gutiérrez EI, Cerda-Flores RM, Leal-Garza CH. Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes from women with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000;122:121-123.
24. Cortes-Gutierrez EI, Davila-Rodriguez MI, Vargas-Villarreal J, Hernandez-Garza F, Cerda-Flores RM. Association between human papilloma virus-type infections with micronuclei frequencies. *Prague Med. Rep.* 2010;111:35-41.
25. Coskun M, Cayir A, Coşkun M, Tok H. Evaluation of background DNA damage in a Turkish population measured by means of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat. Res.* 2013;757:23-27.
26. Costa C, Teixeira JP, Silva S, Roma-Torres J, Coelho P, Gaspar J, Alves M, Laffon B, Rueff J, Mayan O. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* 2006;21:343-350.
27. Cseh J, Pázsit E, Orsós Z, Marek E, Huszár A, Balogh S, Ember I, Kiss I. Effect of glutathione-S-transferase M1 and T1 allelic polymorphisms on HPV-induced cervical precancer formation. *Anticancer Res.* 2011;31:3051-3055.
28. da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, Emmel V, Rohr P, Bordin DL, Andreazza AC, Salvador M, Henriques JA, Erdtmann B. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 2008;23:415-422.
29. De Boeck M, Lardau S, Buchet JP, Kirsch-Volders M, Lison D. Absence of significant genotoxicity in lymphocytes and urine from workers exposed to moderate levels of cobalt-containing dust: a cross-sectional study. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 36:151-160.
30. de Bruin WC, Wagenmans MJ, Peters WH. Expression of Glutathione S-Transferase α , P1-1 and T1-1 in the Human Gastrointestinal Tract. *Jpn. J. Cancer Res.* 2000;91:310-316.
31. de Carvalho CR, da Silva ID, Pereira JS, de Souza NC, Focchi GR, Ribalta JC. Polymorphisms of p53, GSTM1 and GSTT1, and HPV in uterine cervix adenocarcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2008;29:590-593.
32. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
33. Dhillon VS, Kler RS, Dhillon IK. Chromosome instability and sister chromatid exchange (SCE) studies in patients with carcinoma of cervix uteri. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1996;86:54-57.
34. Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Fenech M. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence

- micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011;26:33-42.
35. Duensing S, Duensing A, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* 2001;61:2356–2360.
 36. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:10002–10007.
 37. Economopoulos KP, Choussein S, Vlahos NF, Sergentanis TN. GSTM1 polymorphism, GSTT1 polymorphism, and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2010; 20:1576-1580.
 38. Eklund BI, Moberg M, Bergquist J, Mannervik B. Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol. Pharmacol.* 2006;70:747-754.
 39. Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of Human Papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer.* 2006;106:1054–1064.
 40. Falck GC, Hirvonen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* 1999; 441:225-237.
 41. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011;26:43-49.
 42. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E, HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 2003;534:65-75.
 43. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 1999;428:271-283.
 44. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011;26:125-132.
 45. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 1985; 147: 29–36.
 46. Fenech M, Rinaldi J. A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians *Carcinogenesis.* 1995;16:223-230.

47. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2007;2:1084-1104.
48. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 2006; 600:58-66.
49. Fenech M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations. *Mut. Res.* 1998;404:155–165.
50. Fenech M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis.* 2005, 20:255-269.
51. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 2000; 455: 81-95.
52. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, 17. decembar 2013.
53. Fowles J, Dybing E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of tobacco smoke. *Tob. Control.* 2003;12:424-430.
54. Galas A, Cebulska-Wasilewska A. Can consumption of raw vegetables decrease the count of sister chromatid exchange? Results from a cross-sectional study in Krakow, Poland. DOI 10.1007/s00394-014-0697-9
55. Gao LB, Pan XM, Li LJ, Liang WB, Bai P, Rao L, Su XW, Wang T, Zhou B, Wei YG, Zhang L. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to risk of cervical neoplasia: an evidence-based meta-analysis. *PLoS One* 2011;6:e20157.
56. Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. The alkaline Comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis.* 2003;18:265-271.
57. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001;10:1239-1248.

58. Gómez-Arroyo S, Díaz-Sánchez Y, Meneses-Pérez MA, Villalobos-Pietrini R, De León-Rodríguez J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 2000;466:117-124.
59. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Bertram CC, Wilkens LR, Guo C, Seifried A, Killeen J, Le Marchand L. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol. Oncol.* 2001; 81:263-269.
60. Guven M, Guven GS, Oz E, Ozaydin A, Batar B, Ulutin T, Hacihanefioglu S, Domanic N. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and their association with coronary artery disease risks and micronucleus frequency. *Heart Vessels.* 2007;22:355-360.
61. Guzmán P, Sotelo-Regil RC, Mohar A, Gonsebatt ME. Positive Correlation Between the Frequency of Micronucleated Cells and Dysplasia in Papanicolaou Smears. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003;41:339-343.
62. Hagmar L1, Bonassi S, Strömberg U, Brøgger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 1998 15;58:4117-4121.
63. Hagmar L1, Brøgger A, Hansteen IL, Heim S, Høgstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, Reuterwall C, Salomaa S, Skerfving S, Sorsa M. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 1994;54:2919-2922.
64. Hardisson D, Alvarez-Marcos C, Salas-Bustamante A, Alonso-Guervós M, Sastre N, Sampedro A. Numerical aberrations of chromosomes 8, 9, 11, and 17 in squamous cell carcinoma of the pharynx and larynx: a fluorescence in situ hybridization and DNA flow cytometric analysis of 50 cases. *Oral Oncol.* 2004;40:409-417.
65. Haveric A, Haveric S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicol. Mech. Methods* 2010; 20:260-266.
66. Hawes SE, Critchlow CW, Faye Niang MA, Diouf MB, Diop A, Touré P, Aziz Kasse A, Dembele B, Salif Sow P, Coll-Seck AM, Kuypers JM, Kiviat NB. Increased risk of high-grade cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical cancer among African women with human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections. *J. Infect. Dis.* 2003;188:555-63.
67. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:51-88.
68. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999; 31:273-300.

69. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995;30:445–600.
70. Hernández A, Xamena N, Gutiérrez S, Velázquez A, Creus A, Surrallés J, Galofré P, Marcos R. Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different GST and NAT2 genetic backgrounds. *Mutat. Res.* 2006;606:12-20.
71. Hessel H, Radon K, Pethran A, Maisch B, Grobmair S, Sautter I, Fruhmann G. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs--evaluation by the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2001;497:101-109.
72. Huang P, Huang B, Weng H, Nakayama K, Morimoto K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Prev. Med.* 2009; 48:383-388.
73. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 2006a;118:1481–1495.
74. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 2006b;119:1108-1124.
75. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical Carcinoma and Sexual Behavior: Collaborative Reanalysis of Individual Data on 15,461 Women with Cervical Carcinoma and 29,164 Women without Cervical Carcinoma from 21 Epidemiological Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:1060-1069.
76. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007a;370:1609 - 1621.
77. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 2007b;120:885-891.
78. Ionescu ME, Ciocirlan M, Becheanu G, Nicolaie T, Ditescu C, Teiusanu AG, Gologan SI, Arbanas T, Diculescu MM. Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions. *Maedica (Buchar).* 2011;6:173-178.
79. Ishikawa H, Yamamoto H, Tian Y, Kawano M, Yamauchi T, Yokoyama K. Evidence of association of the CYP2E1 genetic polymorphism with micronuclei frequency in human peripheral blood. *Mutat. Res.* 2004;546:45-53.
80. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherov E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap.* 2010; 154,103–116.

81. Juárez-Cedillo T, Vallejo M, Fragoso JM, Hernández-Hernández DM, Rodríguez-Pérez JM, Sánchez-García S, del Carmen García-Peña M, García-Carrancá A, Mohar-Betancourt A, Granados J, Vargas-Alarcón G. The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to CYP1A1 MspI polymorphism. *Eur. J. Cancer* 2007;43:1590-1595.
82. Juronen E, Tasa G, Uusküla M, Pooga M, Mikelsaar AV. Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione s-transferase T1-1. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996;39:21-29.
83. Karaman A, Aliğaoğlu C. Frequency of sister chromatid exchanges in the lymphocytes of patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 2006;33:596-602.
84. Kazimírová A, Barancoková M, Volkovová K, Staruchová M, Krajcovicová-Kudlácková M, Wsóllová L, Collins AR, Dusinská M. Does a vegetarian diet influence genomic stability? *Eur. J. Nutr.* 2004; 43:32-38.
85. Kiran B, Karkucak M, Ozan H, Yakut T, Ozerkan K, Sag S, Ture M. GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) polymorphisms in the genetic susceptibility of Turkish patients to cervical cancer. *J. Gynecol. Oncol.* 2010; 21:169-173.
86. Kirsch-Volders M, Mateuca RA, Roelants M, Tremp A, Zeiger E, Bonassi S, Holland N, Chang WP, Aka PV, Deboeck M, Godderis L, Haufroid V, Ishikawa H, Laffon B, Marcos R, Migliore L, Norppa H, Teixeira JP, Zijno A, Fenech M. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15:1038-1042.
87. Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, Gamulin M. Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clin. Exp. Med.* 2006;6:177-190.
88. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 2000; 455:155-166.
89. Kumar A, Yadav A, Giri SK, Dev K, Gautam SK, Gupta R, Aggarwal N. Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes and confounding factors on the frequency of sister chromatid exchange and micronucleus among road construction workers. *Chemosphere.* 2011;84:564-570.
90. Lai HC, Lin WY, Lin YW, Chang CC, Yu MH, Chen CC, Chu TY. Genetic polymorphisms of FAS and FASL (CD95/CD95L) genes in cervical carcinogenesis: An analysis of haplotype and gene-gene interaction. *Gynecol. Oncol.* 2005;99:113-118.
91. Lavender NA, Benford ML, VanCleave TT, Brock GN, Kittles RA, Moore JH, Hein DW, Kidd LC. Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and prostate cancer risk among Men of African Descent: A case-control study. *BMC Cancer.* 2009;9:397.
92. Leal-Garza CH, Cerda-Flores RM, Leal-Elizondo E, Cortes-Gutierrez EI. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. *Mutat. Res.* 2002;515:57-62.

93. Lewińska D, Palus J, Stepnik M, Dziubałtowska E, Beck J, Rydzyński K, Natarajan AT, Nilsson R. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2007;80:371-380.
94. Lewińska D, Stepnik M, Krajewski W, Arkusz J, Stańczyk M, Wrońska-Nofer T. Increased incidence of micronuclei assessed with the micronucleus assay and the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in peripheral blood lymphocytes of nurses exposed to nitrous oxide. *Mutat. Res.* 2005;581:1-9.
95. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int. J. Cancer.* 2011;128:927-935.
96. Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat. Res.* 2007; 617: 33-45.
97. Liu YJ, Huang PL, Chang YF, Chen YH, Chiou YH, Xu ZL, Wong RH. GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006;15:659-666.
98. Lo HW, Ali-Osman F. Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2007;7:367-374.
99. Losi-Guembarovski R, Cólus IM, De Menezes RP, Poliseli F, Chaves VN, Kuasne H, Leichsenring A, Guembarovski AL, Oliveira BW, Ramos G, Cavalcanti TC, Mizuno LT, Cavalli IJ, Ribeiro EM. Lack of Association among Polymorphic Xenobiotic-metabolizing Enzyme Genotypes and the Occurrence and Progression of oral carcinoma in a Brazilian population. *Anticancer Res.* 2008;28:1023-1028.
100. Lukovic L, Milasin J. Sister chromatid exchanges in patients with carcinoma in situ of cervix uteri. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1992;59:84-85.
101. Maffei F, Fimognari C, Castelli E, Stefanini GF, Forti GC, Hrelia P. Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis* 2000;15:517-523.
102. Maffei F, Forti GC, Castelli E, Stefanini GF, Mattioli S, Hrelia P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 2002;514:49-58.
103. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 2006;88:1515-31.
104. McCann MF, Irwin DE, Walton LA, Hulka BS, Morton JL, Axelrad CM. Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 1992;1:125-129.

105. McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegård J, Evans DA, Rannug A, Ingelman-Sundberg M. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol. Pharmacol.* 1997;52:958-965.
106. Migliore L, Testa A, Scarpato R, Pavese N, Petrozzi L, Bonuccelli U. Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 1997;101:299-305.
107. Milosevic-Djordjevic O, Grujicic D, Novakovic T, Arsenijevic S, Marinkovic D. Micronuclei and ageing in a sample of Yugoslavian population. *Genetika* 2002;38:264-267.
108. Milošević-Djordjević O, Grujičić D, Vasković Z, Marinković D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tohoku J. Exp. Med.* 2010;220:115-120.
109. Milošević-Djordjević O, Stošić I, Grujičić D, Banković D, Arsenijević S. Cervical precancerous lesions--chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes in relation to lesion stage, age and smoking habits. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2011;90:1082-1087.
110. Milošević-Djordjević O, Stošić I, Grujičić D, Zelen I, Sazdanović P. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2012; 63:367-375.
111. Milošević-Djordjević O, Grujičić D, Marinković D. The lack of sex differences in the micronuclei frequency in umbilical cord blood lymphocytes. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007; 29: 51-56.
112. Milošević-Đorđević O. Grujičić D. Mikronukleusi kao pokazatelji opšteg genetičkog zdravlja ljudi. *Ginekologija i perinatologija* 2004; 1: 31-43.
113. Mitra AB, Murty VV, Luthra UK. Sister chromatid exchanges in leukocytes of patients with cancer of cervix uteri. *Hum. Genet.* 1982;60:214-215.
114. Morel F, Rauch C, Petit E, Piton A, Theret N, Coles B, Guillouzo A. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* 2004;279:16246-16253.
115. Mrdjanović J, Šolajić S, Dimitrijević S, Đan I, Nikolić I, Jurišić V. Assessment of micronuclei and sister chromatid exchange frequency in the petroleum industry workers in province of Vojvodina, Republic of Serbia. *Food Chem. Toxicol.* 2014;69:63-68.
116. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:518-527.
117. Murgia E, Maggini V, Barale R, Rossi AM. Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy. *Mutat. Res.* 2007;621:113-118.

118. Murty VV, Mitra AB, Luthra UK, Singh IP. Sister chromatid exchanges in patients with precancerous and cancerous lesions of cervix uteri. *Hum. Genet.* 1986;72:37-42.
119. Murty VV, Mitra AB, Luthra UK. Spontaneous chromosomal aberrations in patients with precancerous and cancerous lesions of the cervix uteri. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1985;17:347-353.
120. Naderi NJ, Farhadi S, Sarshar S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2012;55:433-438.
121. Nefic H, Handzic I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutat. Res.* 2013;753:1-11.
122. Niwa Y, Hirose K, Nakanishi T, Nawa A, Kuzuya K, Tajima K, Hamajima N. Association of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase C609T polymorphism and the risk of cervical cancer in Japanese subjects. *Gynecol. Oncol.* 2005;96:423-429.
123. Normann CABM, Moreira JCF, CardosoVV. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecotomus* exposed to potassium dichromate. *Afr. J. Biotech.* 2008; 7:853-896.
124. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulka-Wasilewska A, Fabiánová E, Srám RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat. Res.* 2006;600:37-45.
125. Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003;18:221-233.
126. Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.* 2004;149:309-334.
127. Nour NM. Cervical cancer: a preventable death. *Rev. Obstet. Gynecol.* 2009;2:240-244.
128. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 2011;43:138-151.
129. Olaharski AJ, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt ME, Guzman P, Mohar A, Eastmond DA. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2006;27:337-343.
130. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1993;12:186-192.
131. Palli D, Saieva C, Gemma S, Masala G, Gomez-Miguel MJ, Luzzi I, D'Errico M, Matullo G, Ozzola G, Manetti R, Nesi G, Sera F, Zanna I, Dogliotti E, Testai E. GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms and gastric cancer in a high-risk Italian population. *Int. J. Cancer.* 2005;115:284-289.

132. Palma S, Cornetta T, Padua L, Cozzi R, Appolloni M, Ievoli E, Testa A. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutat. Res.* 2007; 633:1-12.
133. Palma S, Novelli F, Padua L, Venuti A, Prignano G, Mariani L, Cozzi R, Tirindelli D, Testa A. Interaction between glutathione-S-transferase polymorphisms, smoking habit, and HPV infection in cervical cancer risk. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010;136:1101-1109.
134. Panani AD, Ferti AD, Raptis SA, Roussos C. Novel recurrent structural chromosomal aberrations in primary bladder cancer. *Anticancer Res.* 2004; 24:2967-2974.
135. Panani AD, Roussos C. Non-random structural chromosomal changes in primary gastric cancer. *Cancer Lett.* 2005; 225: 291-295.
136. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett.* 2005;221:123-129.
137. Perfetti TA, Rodgman A. The complexity of tobacco and tobacco smoke. *Beitraege zur Tabakforschung International* 2011;24:215–232.
138. Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, Gambaccini G, Trippi F, Bernardini S, Del Dotto P, Migliore L, Bonuccelli U. Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. *Neurol. Sci.* 2002;23 Suppl 2:S97-8.
139. Prasad MH, Devi GS, Prabhavathi PA, Padmavathi P, Rao MS, Reddy PP. Analysis of chromosomal aberrations in the peripheral blood lymphocytes of aluminium foundry workers. *Int. J. Hum. Genet.* 2002; 2: 73-75.
140. Primavera A, Fustinoni S, Biroccio A, Ballerini S, Urbani A, Bernardini S, Federici G, Capucci E, Manno M, Lo Bello M. Glutathione transferases and glutathionylated hemoglobin in workers exposed to low doses of 1,3-butadiene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008;17:3004-30012.
141. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997;89: 868-873.
142. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2000, Beograd, 2004.
143. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2001, Beograd, 2005a.
144. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2002, Beograd, 2005b.

145. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2003, Beograd, 2006.
146. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2004, Beograd, 2007.
147. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2005, Beograd, 2008.
148. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2006, Beograd, 2009.
149. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2007, Beograd, 2010a.
150. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2008, Beograd, 2010b.
151. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2009, Beograd, 2011.
152. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2010, Beograd, 2012.
153. Registar za rak centralne Srbije. Institut za zaštitu zdravlja Srbije dr Milan Jovanović-Batut, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih oboljenja, Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji, 2011, Beograd, 2013.
154. Rowe JD, Nieves E, Listowsky I. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases : interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem. J.* 1997;325:481-486.
155. Saarikoski ST, Voho A, Reinikainen M, Anttila S, Karjalainen A, Malaveille C, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K, Hirvonen A. Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. *Int. J. Cancer.* 1998;77:516-521.
156. Samanta S, Dey P, Nijhawan R. Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma. *Acta Cytol.* 2011;55:42-47.
157. Santovito A, Cervella P, Delpero M. Increased frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of radiology technicians chronically exposed to low levels of ionizing radiations. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014;37:396-403.

158. Scarpato R, Hirvonen A, Migliore L, Falck G, Norppa H. Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* 1997;389:227-235.
159. Schroder KR, Wiebel FA, Reich S, Dannappel D, Bolt HM, Hallier E. Glutathione-S-transferase (GST) theta polymorphism influences background SCE rate. *Arch. Toxicol.* 1995, 69:5057.
160. Sellors J, Sankaranarayanan R. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: A beginners' manual. Lyon: IARC Press; 2003.
161. Settheetham-Ishida W, Yuenyao P, Kularbkaew C, Settheetham D, Ishida T. Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) polymorphisms in cervical cancer in Northeastern Thailand. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2009; 10:365-368.
162. Sharma A, Sharma JK, Murthy NS, Mitra AB. Polymorphisms at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Neoplasma* 2004; 51:12-16.
163. Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl G M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell Biol.* 1998; 140: 1307–1320.
164. Shimizu N, Shimura T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res.* 2000; 448: 81-90.
165. Sierra-Torres CH, Au WW, Arrastia CD, Cajas-Salazar N, Robazetti SC, Payne DA, Tying SK. Polymorphisms for chemical metabolizing genes and risk for cervical neoplasia. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003;41:69-76.
166. Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, Parmar D. Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat. Res.* 2008;638:184-194.
167. Singh S, Kumar V, Singh P, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Rai A. Influence of CYP2C9, GSTM1, GSTT1 and NAT2 genetic polymorphisms on DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutat. Res.* 2012;741:101-108.
168. Slonina D, Spekl K, Panteleeva A, Brankovic K, Hoinkis C, Dörr W. Induction of micronuclei in human fibroblasts and keratinocytes by 25 kV x-rays. *Radiat. Environ. Biophys.* 2003;42:55-61.
169. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, Van Den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW; IARC multicentric case-control study. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int. J. Cancer* 2004;111:431-439.
170. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsagué X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R; International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Herpes simplex

- virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002;94:1604-1613.
171. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer.* 2007;121:621-632.
 172. Sobti RC, Kaur S, Kaur P, Singh J, Gupta I, Jain V, Nakahara A. Interaction of passive smoking with GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) genotypes in the risk of cervical cancer in India. *Cancer Genet. Cytogenet* 2006;166:117-123.
 173. Sou S, Takabayashi T, Ozawa N, Sho K, Sasamoto K, Yajima A, Suzuki M. Spontaneous and MMC induced SCE in lymphocytes from patients with cervical cancer. *Tohoku J. Exp. Med.* 1986;149:417-423.
 174. Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmüller J, Roots I, Brinkmann U. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 2000;10:557-565.
 175. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res.* 2001;482:21-26.
 176. Stults DM, Killen MW, Pierce AJ. The sister chromatid exchange (SCE) assay. *Methods Mol. Biol.* 2014;1105:439-455.
 177. Sui Y, Han W, Yang Z, Jiang M, Li J. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 null polymorphisms with the development of cervical lesions: a meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2011;159:443-448.
 178. Sviracevic B, Cuk D, Vuleta D, Sedlar S. Premaligne i maligne lezije grlica materice - nasa iskustva (1993 - 1997). *Med. Pregl.* 2000;53:378-383.
 179. Tan KL, Webb GC, Baker RT, Board PG. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *Genomics.* 1995;25:381-387.
 180. Taskiran C, Aktas D, Yigit-Celik N, Alikasifoglu M, Yuce K, Tunçbilek E, Ayhan A. CYP1A1 gene polymorphism as a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2006;101:503-506.
 181. Taspinar M, Aydos SE, Comez O, Elhan AH, Karabulut HG, Sunguroglu A. CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukaemia. *Swiss Med. Wkly.* 2008;138:12-17.
 182. Teixeira JP, Gaspar J, Silva S, Torres J, Silva SN, Azevedo MC, Neves P, Laffon B, Méndez J, Gonçalves C, Mayan O, Farmer PB, Rueff J. Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Toxicology* 2004;195:231-242.

183. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol Mutagen.* 2000;35:206-221.
184. Tiltman AJ. The pathology of cervical tumours. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2005;19:485-500.
185. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev. Cancer* 2002;2:59-65.
186. Tomanin R, Ballarin C, Nardini B, Mastrangelo G, Sarto F. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis* 1991; 6:123-126.
187. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Buonaguro FM. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.* 2011;121:32-42.
188. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 2003;57:145-155.
189. Trková M, Kapras J, Bobková K, Stanková J, Mejsnarová B. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reprod. Toxicol.* 2000;14:331-335.
190. Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 1996; 365:147-159.
191. Ueda M, Toji E, Nunobiki O, Sato N, Izuma S, Torii K, Okamoto Y, Noda S. Germline polymorphisms of glutathione-S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 in cervical carcinogenesis. *Hum. Cell* 2010; 23:119-125.
192. Villarini M, Moretti M, Fatigoni C, Agea E, Dominici L, Mattioli A, Volpi R, Pasquini R. Evaluation of primary DNA damage, cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms for CYP1A1 and GSTM1 in road tunnel construction workers. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2008;71:1430-1439.
193. Vinod V, Tiwari PK, Meshram GP. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the in vitro Ames Salmonella/microsome assay and in vivo mouse bone marrow micronucleus test. *J. Ethnopharmacol.* 2011;134:931-937.
194. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Borras J, Parkin DM. International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2000;86:429-435.
195. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 1998;75:536-545.
196. Vodicka P, Polivkova Z, Sytarova S, Demova H, Kucerova M, Vodickova L, Polakova V, Naccarati A, Smerhovsky Z, Ambrus M, Cerna M, Hemminki K. Chromosomal

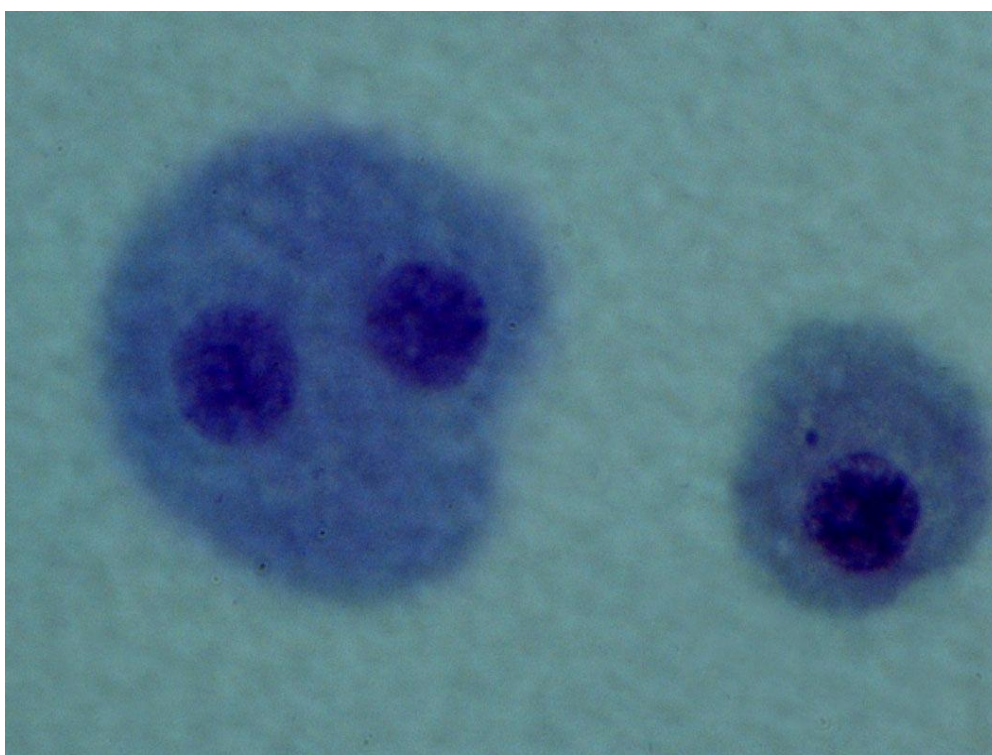
- damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis*. 2010;31:1238-1241.
197. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999;189:12-19.
 198. Wang D, Wang B, Zhai JX, Liu DW, Sun GG. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Neoplasma* 2011;58:352-359.
 199. Wang L, Groves MJ, Hepburn MD, Bowen DT. Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages. *Haematologica*. 2000;85:573-579.
 200. Wang M, Li Y, Lin L, Song G, Deng T. GSTM1 Null Genotype and GSTP1 Ile105Val polymorphism are associated with Alzheimer's disease: a Meta-Analysis. *Mol. Neurobiol.* 2015. DOI 10.1007/s12035-015-9092-7.
 201. Warwick A, Sarhanis P, Redman C, Pemble S, Taylor JB, Ketterer B, Jones P, Alldersea J, Gilford J, Yengi L, Fryer A, Strange RC. Theta class glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking. *Carcinogenesis* 1994a;15: 2841-2845.
 202. Warwick AP, Redman CW, Jones PW, Fryer AA, Gilford J, Alldersea J, Strange RC. Progression of cervical intraepithelial neoplasia to cervical cancer: interactions of cytochrome P450 CYP2D6 EM and glutathione S-transferase GSTM1 null genotypes and cigarette smoking. *Br. J. Cancer* 1994b;70: 704-708.
 203. Webb G, Vaska V, Coggan M, Board P. Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics*. 1996;33:121-123.
 204. Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012;33:656-668.
 205. Wu FY, Tsai FJ, Kuo HW, Tsai CH, Wu WY, Wang RY, Lai JS. Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutat. Res.* 2000;464:289-296.
 206. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J. Biol. Chem.* 1998;273:3517-3527.
 207. Yesilada E, Sahin I, Ozcan H, Yildirim IH, Yologlu S, Taskapan C. Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 2006;154:563-568.
 208. Yim EK, Park JS. Biomarkers in Cervical Cancer. *Biomark. Insights* 2006;1:215-225.
 209. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005;28:227-236.

210. Zhang B, Zhou AF, Zhu CC, Zhang L, Xiang B, Chen Z, Hu RH, Zhang YQ, Qiu L, Zhang YM, Xiong CD, Du YK, Shi YQ. Risk factors for cervical cancer in rural areas of Wuhan China: a matched case-control study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013;14:7595-7600.
211. Zhang ZY, Jin XY, Wu R, Wu LN, Xing R, Yang SJ, Xie Y. Meta-analysis of the analysis of the association between GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms and cervical cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012;13:815-819.
212. Zhong S, Huang M, Yang X, Liang L, Wang Y, Romkes M, Duan W, Chan E, Zhou SF. Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2006;62:457- 472.
213. Zijno A, Verdina A, Galati R, Leopardi P, Marcon F, Andreoli C, Rossi S, Crebelli R. Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects. *Mutat. Res.* 2006; 600:184-192.
214. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. *Mod. Pathol.* 2007;20:167–174.
215. Милошевић-Ђорђевић. Принципи клиничке цитогенетике, Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, 2010.

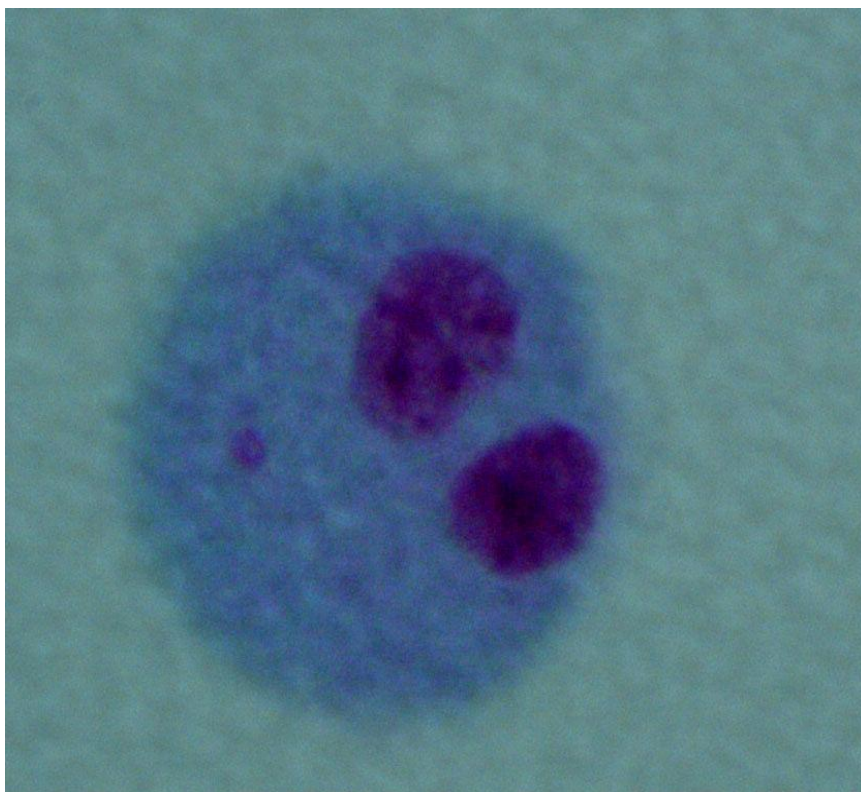
8. ПРИЛОГ



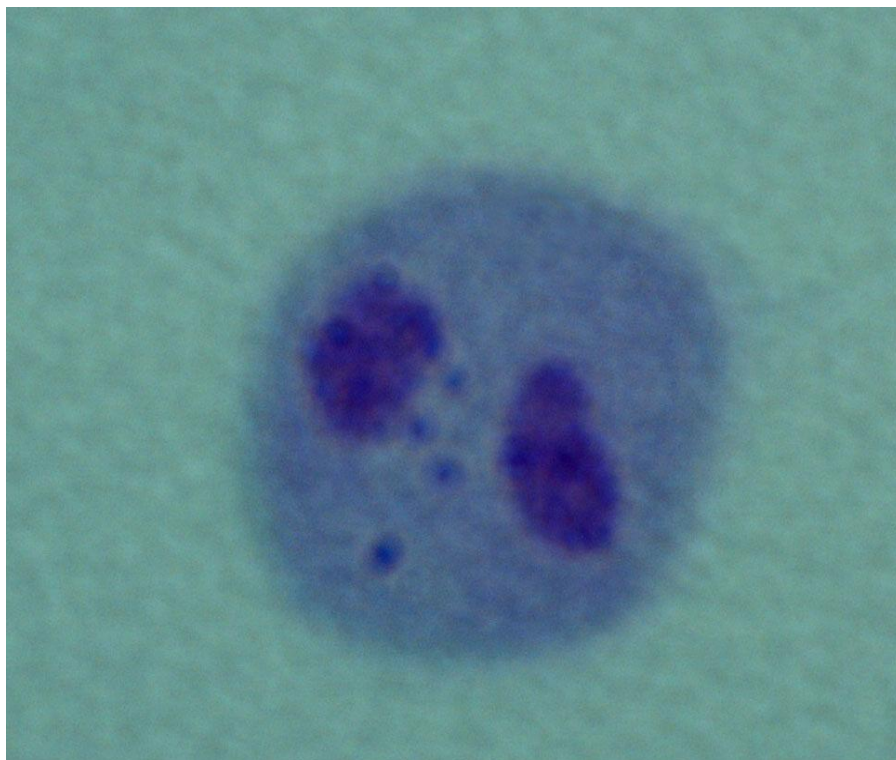
Слика 4 – Бинуклеусна (БН) ћелија



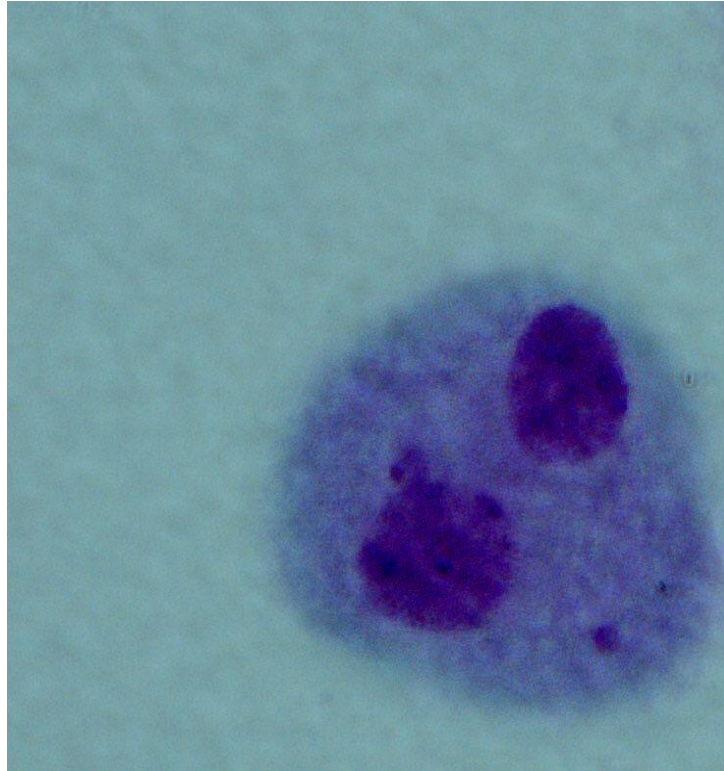
Слика 5 – Бинуклеусна (БН) ћелија (лево) и моноклеусна ћелија (десно) са
микронуклеусом (МН)



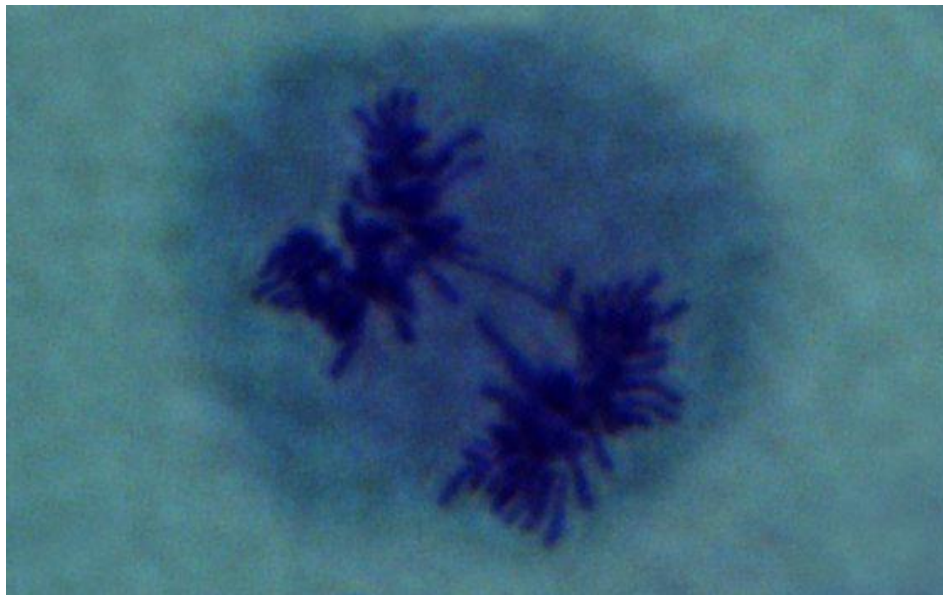
Слика 6 – Бинуклеусна (БН) ћелија са једним микронуклеусом (МН)



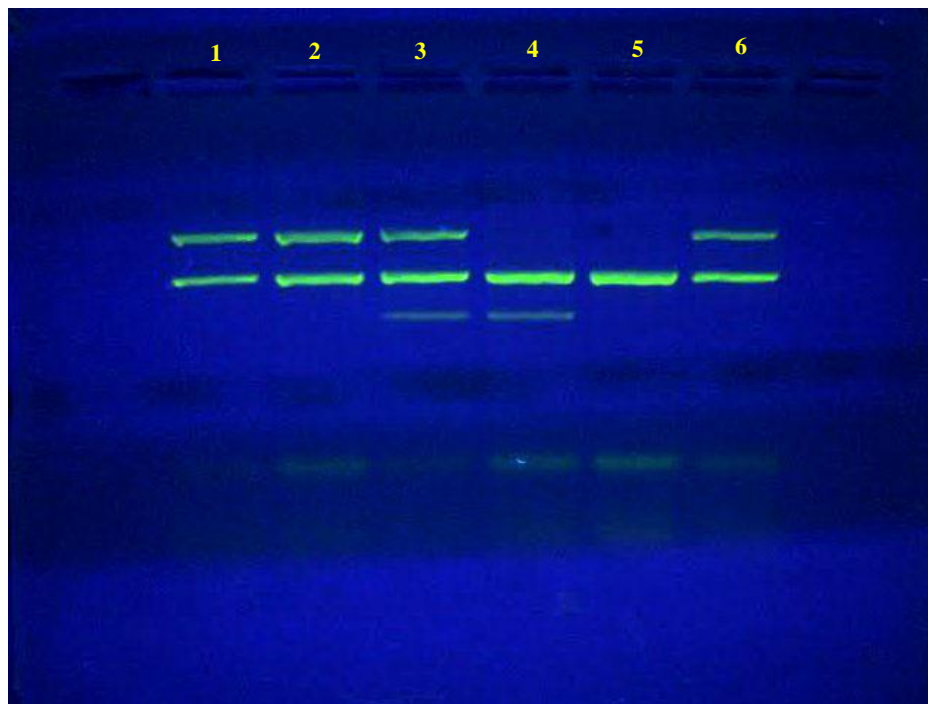
Слика 7 – Бинуклеусна (БН) ћелија са четири микронуклеуса (МН)



Слика 8 – Бинуклеусна (БН) ћелија са једним микронуклеусом (МН) и нуклеусним пупољком (НП)



Слика 9 – Формирање нуклеоплазматског моста (НПМ)



Слика 10 – PCR продукти раздвојени на 2% агарозном гелу: линије 1, 2, 6 особе са GSTT1 позитивним и GSTM1 нултим генотипом; линија 3 особа са GSTT1 позитивним и GSTM1 позитивним генотипом; линија 4 особа са GSTT1 нултим и GSTM1 позитивним генотипом; линија 5 особа са GSTT1 нултим и GSTM1 нултим генотипом

БИОГРАФИЈА

Ивана Стошић рођена је 16. августа 1983. године у Гњилану, општина Гњилане, Република Србија.

Основну школу и Гимназију "Бора Станковић" у Нишу, завршила је са одличним успехом. Школске 2002/2003. године уписала је Природно-математички факултет у Нишу, одсек Биологија са екологијом, смер дипломирани биолог. Дипломирала је 2007. године са оценом 10 и са просечном оценом током студија 9,11 стекла академско звање дипломирани биолог. Докторске академске студије биологије, смер Генетика, на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2007/2008. године.

У периоду од јуна 2008. године до јануара 2011. године као стипендиста Министарства за науку и технолошки развој била је ангажована на пројекту "*Студија генетички ризичних фактора у репродуктивној и развојној биологији*" – евиденциони број 143008, а који је финансиран од стране Министарства. Од јануара 2011. године до маја 2013. године засновала је радни однос на Природно-математичком факултету где је била ангажована на пројекту "*Преклиничка испитивања биоактивних супстанци*" (ПИБАС) – евиденциони број 41010, који је финансиран од стране Министарства за просвету, науку и технолошки развој.

У току школске 2010/2011, 2011/2012. и 2012/2013. године била је ангажована на извођењу вежби на предмету Цитогенетика на Дипломским академским студијама – Мастер, модул Биологија, на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Тренутно ради у Јавно комуналном предузећу за водовод и канализацију "Naissus" Ниш.

У 2009. години изабрана је у истраживачко звање *истраживач - приправник* за научну област Биологија у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, а 2011. године изабрана је у истраживачко звање *истраживач- сарадник* за научну област Биологија у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

У организацији Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије и Народне библиотеке Србије, као стипендиста Министарства, 2008. године је учествовала на курсу под називом ``Електронски извори информација у науци/претраживање електронских база података за научне публикације – Кобсон``.

БИБЛИОГРАФИЈА

Научни радови објављени у међународним часописима (M22)

1. Vrndić OB, Milošević-Djordjević OM, Mijatović Teodorović LC, Jeremić MZ, **Stošić IM**, Grujičić DV, Zivancević Simonović ST. Correlation between micronuclei Frequency in peripheral blood lymphocytes and retention of 131-I in thyroid cancer patients. Tohoku J. Exp. Med. 2013;229:115-124.
2. Milošević-Djordjević O, **Stošić I**, Grujičić D, Banković D, Arsenijević S. Cervical precancerous lesions-chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes in relation to lesion stage, age and smoking habits. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2011;90:1082-1087.

Научни радови објављени у међународним часописима (M23)

1. Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, **Stošić I**, Grujičić D, Milošević-Djordjević O. Lasallia pustulata lichen as possible natural antigenotoxic, antioxidant, antimicrobial and anticancer agent. Cytotechnology 2015. DOI 10.1007/s10616-015-9856-y.
2. Grujičić D, **Stošić I**, Kosanić M, Stanojković T, Ranković B, Milošević-Djordjević O. Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen Cetraria islandica. Cytotechnology 2014;66:803-813.
3. **Stošić I**, Grujičić D, Arsenijević S, Milošević-Dorđević O. Influence of Glutathione - S - Transferase (GSTT1 and GSTM1) polymorphism on baseline micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. Genetika-Belgrade 2014;46:649-659.
4. **Stošić I**, Grujičić D, Arsenijević S, Brkić M, Milošević-Djordjević O. Glutathione S-transferase T1 and M1 polymorphisms and risk of uterine cervical lesions in women from Central Serbia. Asian Pac. J. Cancer. Prev. 2014;15:3201-3205.
5. Milošević-Djordjević O, **Stošić I**, Stanković M, Grujičić D. Comparative study of genotoxicity and antimutagenicity of methanolic extracts from Teucrium chamaedrys and Teucrium montanum in human lymphocytes using micronucleus assay. Cytotechnology 2013;65:863-869.
6. Arsenijević S, Ljujić B, **Stošić I**, Grujičić D, Marinković D, Milošević-Djordjević O. Polymorphisms of the GSTT1 and GSTM1 genes in women of Central Serbia - absence of association with uterine myoma. Arch. Bio. Sci. 2013;65:415-420.
7. Milošević-Djordjević O, **Stošić I**, Grujičić D, Zelen I, Sazdanović P. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. Arh. Hig. Rada Toksikol. 2012;63:367-375.
8. Milošević-Djordjević O, **Stošić I**, Vučković M, Grujičić D, Marinković D. Baseline and therapy-induced chromosome damages in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients assessed by the micronucleus assay. J. Buon. 2011;16:437-443.

9. Grujicic D, *Stosic I*, Milosevic-Djordjevic O. The antibiotic erythromycin did not affect micronucleus frequency in human PHA-stimulated lymphocytes. Arch. Bio. Sci. 2009;61:179-185.

Саопштења на међународним научним скуповима (М34)

1. *Stošić I*, Grujičić D, Arsenijević S, Marinković D, Milošević-Đorđević O: High micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated women with cervical lesions. II Symposium of Population and Evolutionary Genetics PEG2012, Belgrade, 2012, Book of Abstracts, pp 09.
2. *Stošić I*, Ljujić B, Grujičić D, Marinković D, Milošević-Đorđević O: Glutathione S transferase (GSTT1 and GSTM1) polymorphism in women from central Serbia. II Symposium of Population and Evolutionary Genetics PEG2012, Belgrade, 2012, Book of Abstracts, pp 10.
3. Grujičić D, Milošević-Đorđević O, *Stošić I*, Arsenijević S, Marinković D: Evaluation of genotoxic effect of tocolytic ritodrine, antiarrhythmic verapamil and antibiotic erythromycin on the micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes. IV Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, 2009, Book of Abstract, pp 58.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Редни број:
Идентификациони број:
Тип документације: Монографска публикација
Тип записа: Текстуални штампани материјал
Врста рада: Докторска дисертација
Аутор: Ивана Стошић
Ментор: др Оливера Милошевић-Ђорђевић
Наслов рада: Фреквенца микронуклеуса и полиморфизам GSTT1 и GSTM1 гена у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од стадијума интрацервикалне лезије
Језик публикације: Српски (ћирилица)
Језик извода: Српски/Енглески
Земља публикавања: Србија
Година: 2015.
Издавач: Ауторски репринт
Место и адреса: Радоја Домановића 12, 34 000 Крагујевац
Физички опис рада: Дисертација има 125 страна, 8 поглавља, 10 слика, 13 шема, 15 табела, 22 графика и 215 референци
Научна област: Биологија
Научна дисциплина: Генетика
Предметна одредница / кључне речи: : микронуклеус, лимфоцити периферне крви, полиморфизам, GSTT1, GSTM1, цервикалне интраепителијалне лезије
УДК: 575
Чува се: У библиотеци Природно-математичког факултета, Радоја Домановића 12, 34 000 Крагујевац
Важна напомена:
Извод: <p>Карцином грлића материце представља велики глобални проблем, који је са 528000 нових случајева у 2012. години представљао четврти облик малигнитета код жена у свету. У Централној Србији карцином грлића материце представља трећи облик малигнитета код жена. Инвазивна форма овог карцинома развија се постепено кроз интраепителијалне лезије ниског степена (low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) и лезије високог степена (high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL).</p> <p>Нарушени хромозомски интегритет је карактеристика различитих патолошких стања. Повећана хромозомска оштећења, експримирана у виду микронуклеуса (МН), потврђена је у лимфоцитима периферне крви особа са дијагнозом канцера. МН представљају екстрануклеусна телашца унутар цитоплазме ћелија, а настају од ацентричних фрагмената или целих хромозома. Присуство МН у цитоплазми се повезује са хромозомским оштећењима и у директној је вези са нивоом хромозомских оштећења.</p> <p>Канцер је мултифакторијална болест и у етиологији канцера наводе се различити фактори. Повећани ризик за развој канцера приписује се различитим животним навикама. Поред егзогених фактора, генетска основа може имати улогу у канцерогенези. Нулти полиморфизми два гена из GST (Glutathione-S-</p>

transferase) фамилије, GSTT1 и GSTM1 гена, често су анализирани као потенцијални фактори ризика.

Циљеви ове докторске дисертације били су да се утврди ниво базалног оштећења наследног материјала у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња са дијагнозом интрацервикалних лезија и здравих жена као и корелација између генетичке нестабилности и здравственог стања, демографских карактеристика, животних навика, репродуктивне историје; процена утицаја полиморфизма GSTT1 и GSTM1 гена у развоју интрацервикалних лезија, при чему је анализом обухваћен појединачни ефекат гена, ефекат интеракције анализираних гена и ефекат интеракције гена са животним и демографским карактеристикама. И на крају, циљ је био да се утврди постојање корелације између нивоа базалних оштећења генетичког оштећења у лимфоцитима периферне крви и генског профила код испитане популације.

Узорак су чиниле жене са дијагностикованим интрацервикалним лезијама грлића материце (32 LSIL, 33 HSIL и 39 CC – Ca in situ/Ca invasivum) и 50 здравих жена. За утврђивање нивоа генетичких оштећења у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња и здравих контрола коришћен је цитокинезис блок микронуклеус (ЦБМН) тест. За анализу полиморфизма у GSTT1 и GSTM1 генима примењена мултиплекс PCR (Polymerase Chain Reaction) метода, производи PCR реакције су раздвојени на 2% агарозном гелу у присуству SYBR Safe DNA gel stain боје. Сви добијени подаци су статистички обрађени, а вредности $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$ су сматране статистички значајним.

Резултати докторске дисертације указују на то да жене са интрацервикалним лезијама грлића материце имају већи ниво хромозомских оштећења у лимфоцитима периферне крви у односу на здраве жене, што је регистровано значајно већом фреквенцом МН у лимфоцитима. Већа заступљеност бинуклеусних (БН) ћелија са МН забележена је у узорку пацијенткиња са дијагнозом Ca in situ/Ca invasivum, HSIL и LSIL у односу на контролу. Жене са дијагностикованим раним стадијумима лезија, LSIL и HSIL, имале су значајно веће фреквенце нуклеоплазматских мостова (НПМ) у односу на здраве жене. На основу резултата ROC (Receiver Operating Characteristic) анализе закључено је да је МН у лимфоцитима периферне крви добар биомаркер за дијагностиковање лезија, а оптимална cut off вредност износила је 10,5 МН/1000 БН са сензитивношћу 84,2% и специфичношћу 95,1%. Смањена кинетика лимфоцита периферне крви жена са дијагностикованим карциномом грлића материце регистрована је значајно мањим индексом нуклеусне деобе (NDI) у односу на контролну групу здравих жена. Узимајући у обзир степен лезије, године старости, пушење, спонтане и намерне побачаје, статус GSTT1 и GSTM1 гена као потенцијалне модулаторе МН фреквенце у лимфоцитима периферне крви, мултипла регресиона анализа на узорку пацијенткиња, показала је да су једино године старости утицале на фреквенцу МН. Резултати исте анализе показали су да степен лезије утиче на вредности NDI. У узорку здравих жена мултипла регресиона анализа показала је да ниједан од анализираних фактора није утицао на МН фреквенцу и NDI вредности. На основу добијених резултата може се закључити да GSTM1 нулти генотип представља фактор ризика за развој интрацервикалних лезија. Носиоци GSTM1 нултог генотипа имале су преко 2 пута већи ризик за развој лезија. Поделом пацијенткиња на основу степена интрацервикалне лезије, резултати су показали значајну улогу GSTM1 нултог генотипа само у развоју раних фаза лезија (LSIL). Носиоци нултог GSTT1 генотипа нису имали значајно већи ризик за развој

интрацервикалних лезија, узимајући у обзир стадијум лезија, године старости и пушење цигарета.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 24.10.2012.

Датум одбране:

Чланови комисије:

1. Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу;
2. Др Слободан Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу;
3. Др Дарко Грујичић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу;
4. Др Гордана Јоксић, научни саветник Института за нуклеарне науке Винча у Београду

KEY WORDS DOCUMENTATION
 UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
 FACULTY OF SCIENCE

Accession number:
Identification number:
Documentation type: Monograph publication
Type of record: Textual material, printed
Contents code: Ph.D. Thesis
Author: Ivana Stošić
Mentor: Dr Olivera Milošević-Đorđević
Title: Micronucleus frequency and polymorphism of GSTT1 and GSTM1 genes in peripheral blood lymphocytes of patients related to the stage of intracervical lesion
Language of text: Serbian (cyrilic)
Language of abstract: Serbian/English
Country of publication: Serbia
Publication year: 2015.
Publisher: Author reprint
Publication place: Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
Physical description: Thesis contains 125 pages, 8 chapters, 10 images, 13 schemes, 15 tables, 22 graphics and 215 literature references
Scientific field: Biology
Scientific discipline: Genetics
Subject/key words: micronuclei, peripheral blood lymphocytes, polymorphism, GSTT1, GSTM1, cervical intraepithelial lesion
UDC: 575
Holding data: In the library of Faculty of Sciences, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
Note:
<p>Abstract:</p> <p>Cervical cancer is major global problem, and with 528000 new cases in 2012. it represented the fourth form of malignancy in women worldwide. In the region of central Serbia cervical cancer is the third form of malignancy in women. The invasive form of this cancer develops gradually ranging from low-grade squamous intraepithelial lesion - LSIL to high-grade squamous intraepithelial lesion – HSIL.</p> <p>Disturbed chromosomal integrity is the characteristic of various pathological conditions. Increased chromosomal damages expressed in the form of micronuclei (MN) have been confirmed in peripheral blood lymphocytes in persons diagnosed with cancer. MN represents extranuclear small bodies within the cytoplasm of cells and arises from acentric fragments or whole chromosomes. The presence of MN in the cytoplasm is associated with chromosomal defects and is directly related to the level of chromosomal damage.</p> <p>Cancer is a multifactorial disease with diverse factor etiology. Increased risk for cancer development is attributed to the different life style habits. In addition to exogenous factors, genetic background may play a role in carcinogenesis. Null polymorphisms of two genes from GST (Glutathione-S-transferase) family, GSTM1 and GSTT1 genes, are often analyzed as potential risk factors.</p>

The aims of this doctoral dissertation were to determine the level of basal damage of the genetic material in peripheral blood lymphocytes of patients with a diagnosis of intracervical lesions and healthy women, as well as the correlation between genetic instability and health status, demographic characteristics, lifestyle habits, reproductive history; assessment of the impact of polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes in the development of intracervical lesions, whereby analysis included the individual effect of genes, the interaction of genes and the effect of the gene interaction with life and demographic characteristics. In addition, the aim was to determine correlation between the level of basal genetic damage in the peripheral blood lymphocytes and gene profiles in the sample population.

The study included women diagnosed with intracervical lesions (32 LSIL, HSIL 33 and 39 Ca in situ/Ca invasivum) and 50 healthy women. To determine the level of genetic damage in peripheral blood lymphocytes of patients and healthy controls cytokinesis block micronucleus (CBMN) test was used. For the analysis of polymorphism in GSTT1 and GSTM1 genes multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) method was used; PCR reaction products were separated on 2% agarose gel in the presence of SYBR Safe DNA gel stain. All data were statistically analyzed and the values of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ were considered statistically significant.

The results of the doctoral dissertation indicate that women with intracervical lesions have a higher level of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes compared to healthy women, which is registered by significantly higher frequency of MN in lymphocytes. Higher distribution of binuclear (BN) cells with MN was observed in the sample of patients diagnosed with Ca in situ/Ca invasivum, HSIL and LSIL compared to the control. Women diagnosed with early stage lesions, LSIL and HSIL had significantly higher frequency of nucleoplasmatic bridges (NPBs) compared to healthy women. Based on the results of ROC (Receiver Operating Characteristic) analysis it was concluded that MN in peripheral blood lymphocytes was a good biomarker for the diagnosis of lesions, and the optimal cut-off value was 10.5 MN/1000 BN with a sensitivity of 84.2% and specificity of 95.1%. Reduced kinetics of peripheral blood lymphocytes of women diagnosed with cervical cancer was registered by significantly lower nuclear division index (NDI) compared to the control group of healthy women. Taking into account degree of lesion, age, smoking, miscarriages and abortions, GSTM1 and GSTT1 status of genes as potential modulators of MN frequency in peripheral blood lymphocytes, multiple regression analysis on a sample of patients showed that the only parameter that affected the MN frequency was age. The results of the same analysis showed that the degree of lesion affected the value of NDI. In a sample of healthy women multiple regression analysis showed that none of the analyzed factors influenced the frequency of MN and NDI values. Based on the obtained results it may be concluded that GSTM1 null genotype represents risk factor for the development of intracervical lesions. Carriers of GSTM1 null genotype had twofold higher risk of developing lesions. By dividing the patients on the basis of the degree of intracervical lesions, the results showed a significant role of GSTM1 null genotype only in the early stages of developing lesions (LSIL). Carriers of null GSTT1 genotype had no significantly higher risk of developing intracervical lesions, taking into account the stage of the lesion, age and cigarette smoking.

Accepted by the Scientific Board on: 24.10.2012.

Defended on:

Thesis Commission

(Degree/name/surname/title/faculty):

1. Dr. Olivera Milošević-Đorđević, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, Serbia;
2. Dr. Slobodan Arsenijević, Full Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia;
3. Dr. Darko Grujičić, Assistant professor, Faculty of Sciences, University of Kragujevac, Serbia;
4. Dr. Gordana Joksić, Research Professors, Vinca Institute of Nuclear Sciences, Belgrade, Serbia

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: **Ивана Стошић**

број уписа : 22/07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Фреквенца микронуклеуса и полиморфизам GSTT1 и GSTM1 гена у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од стадијума интрацервикалне лезије

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

У Крагујевцу, 27. 04. 2015.

Потпис аутора

Ивана Стошић

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Ивана Стошић**

Број уписа: **22/07**

Студијски програм: **Докторске академске студије биологије**

Наслов рада: **Фреквенца микронуклеуса и полиморфизам GSTT1 и GSTM1 гена у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од стадијума интрацервикалне лезије**

Ментор: **Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу**

Потписани: **Ивана Стошић**

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

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

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, 27.04.2015.

Оливера Милошевић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Фреквенца микронуклеуса и полиморфизам GSTT1 и GSTM1 гена у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од стадијума интрацервикалне лезије

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат на обрасцу број 4).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 27.04.2015.

Милана Степановић

ОБРАЗАЦ 4.

1. Ауторство

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторсто – некомерцијално

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторсто – некомерцијално – без прераде

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторсто – некомерцијално – делити под истим условима

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторсто – без прераде

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторсто – делити под истим условима

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

MAIN RESEARCH ARTICLE

Cervical precancerous lesions – chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes in relation to lesion stage, age and smoking habits

OLIVERA MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ^{1,2}, IVANA STOŠIĆ¹, DARKO GRUJIČIĆ¹, DRAGIĆ BANKOVIĆ¹ & SLOBODAN ARSENIJEVIĆ²

¹Faculty of Science and ²Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Key words

cervical precancerous lesions, peripheral blood lymphocytes, lesion stage, micronuclei, chromosomal instability

Correspondence

Olivera Milošević-Djordjević, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, PO Box 60, 34 000 Kragujevac, Serbia.
E-mail: olivera@kg.ac.rs

Conflict of interest

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

Received: 9 December 2010

Accepted: 21 June 2011

DOI: 10.1111/j.1600-0412.2011.01230.x

Abstract

Objective. To evaluate chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes (PBL) of patients newly diagnosed with cervical precancerous lesions with respect to age, smoking habits, miscarriages, abortions and lesion stage. **Design.** Clinical study. **Setting.** Clinic of Gynecology and Obstetrics in Kragujevac, Serbia, during 2009–2010. **Population.** The analyzed samples included 41 untreated patients aged 24–65 years with a diagnosed low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL; 19 patients) or a high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL; 22 patients). Control samples were obtained from 40 healthy women aged 24–53 years. **Methods.** The frequency of micronuclei (MN) was estimated in circulating lymphocytes by using the cytokinesis-block micronucleus assay. **Main Outcome Measure.** The frequency of MN in PBL. **Results.** The mean MN frequencies of both LSIL and HSIL patients were significantly higher than the MN frequency of healthy control women. There was no significant difference in MN frequency between LSIL and HSIL patients, between smokers and nonsmokers in both patient and control samples, or between miscarriage groups and abortion groups of patients. Considering confounder factors, age and health status influenced MN frequency. **Conclusions.** The results suggest that MN frequency in PBL of patients with cervical precancerous lesions corresponds to an increase of chromosomal damage, irrespective of smoking habits, miscarriages, abortions and lesion stages.

Abbreviations: BN, binucleated; HPV, human papilloma virus; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesions; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions; MN, micronuclei; PBL, peripheral blood lymphocytes

Introduction

Cervical cancer is the second most common female malignancy. Cervical cancer develops through a multistep process that includes either three (cervical intraepithelial neoplasia or CIN I–III) or, according to the Bethesda system, two lesion stages [low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL)]. When the lesions do not progress, they either regress or persist at the same grade. Low-grade squamous intraepithelial lesions are likely to regress, while HSIL are more likely to progress towards cancer (1).

Chromosomal instability is a main characteristic of cancer (2–5). Considering that cancerogenesis is a complex stepwise

process and that the accumulation of genetic alterations allows growth of neoplastic cells, chromosomal instability is a possible event in the precancerous stages. This assumption has been confirmed through numerous studies showing that chromosomal instability occurs in precancerous lesions. Desai et al. (6) demonstrated that oral precancerous lesions are associated with an increased number of micronuclei (MN) both in circulating lymphocytes and in oral exfoliated cells. Likewise, Saran et al. (7) observed a significant stepwise increase of micronucleated cells and micronuclei in buccal epithelial cells from control to oral precancer patients. Increased baseline DNA damage was shown by applying the Comet assay in buccal cells and lymphocytes (7).

RESEARCH ARTICLE

Glutathione S-Transferase T1 and M1 Polymorphisms and Risk of Uterine Cervical Lesions in Women from Central Serbia

Ivana Stosic^{1*}, Darko Grujicic¹, Slobodan Arsenijevic², Marija Brkic³, Olivera Milosevic-Djordjevic^{1,2}

Abstract

The aim of this study was to investigate the frequencies of GSTT1 and GSTM1 deletion polymorphisms in newly-diagnosed patients with uterine cervical lesions from central Serbia. Polymorphisms of GST genes were genotyped in 97 patients with cervical lesions and 50 healthy women using a multiplex polymerase chain reaction (PCR). The GSTM1 null genotype was significantly more prominent among the patients than in controls (74.2% vs 56.0%), the risk associated with lesions being almost 2.3-fold increased (OR=2.26, 95% CI=1.10-4.65, p=0.03) and 3.17-fold higher in patients above >45 years old (95% CI=1.02-9.79, p=0.04). The analysis of the two genotypes demonstrated that GSTM1 null genotype significantly increased risk only for low grade squamous intraepithelial lesion-LSIL (OR=2.81, 95% CI=1.03-7.68, p=0.04). GSTT1 null genotype or different genotype combinations were not found to be risk factors, irrespective to lesion stages, age or smoking. We found that the risk of cervical lesions might be significantly related to the GSTM1 null genotype, especially in women aged above 45 years. Furthermore, the GSTM1 polymorphism might have greater role in development of early stage lesions.

Keywords: Cervical lesions - polymorphism - glutathione S - transferase T1 - glutathione S - transferase M1

Asian Pac J Cancer Prev, 15 (7), 3201-3205

Introduction

Cervical cancer is the third most common women cancer worldwide with ~530 000 new cases and 275 000 deaths in 2008 (Jemal et al., 2011). Invasive cervical cancer is developing gradually through the precancerous stages LSIL (Low squamous intraepithelial lesion) and HSIL (High squamous intraepithelial lesion).

So far, the Human Papilloma Virus (HPV) is the most well-established risk factor for cervical lesions development. Despite that the majority of diagnosed lesions are in the women with HPV (Evans et al., 2006; Zuna et al., 2007) a percent of women with cervical lesions is not HPV positive, suggesting that genetical and environmental factors may also play a role in the cervical lesions development.

Different individual susceptibility to the cancer may be due to polymorphism in genes involved into cellular metabolism and detoxification of carcinogenic products. The Glutathione S Transferases (GSTs) are a super family of polymorphic phase II enzymes involved in the metabolism of xenobiotics (Jancova et al., 2010). The deletion polymorphism of theta (GSTT1) and mu (GSTM1) gene has been described and the homozygous deletion resulting in null genotypes, leading to the absence

of enzyme activity. Since these enzymes protect the cell, it is assumed that GSTT1 and GSTM1 null genotype, alone or in combination, may lead to increased susceptibility to cancer. However, in the relevant literature data there are different results on association of GSTT1 and GSTM1 polymorphism and cancer risk (Ates et al., 2005; Singh et al., 2008; Taspinar et al. 2008; Ansari et al., 2009; Kondo et al., 2009; Sivonova et al., 2009; Piao et al., 2013; Peng et al., 2014).

In the present study we have evaluated the frequencies of GSTT1 and GSTM1 genotypes in the women with cervical lesions diagnoses (LSIL, HSIL and CC- cancer *in situ* or invasive cancer) and have compared them with the frequencies in the healthy women. Furthermore, we have evaluated the interaction of these genes with the risk factors (i.e. smoking, age) in modulating the susceptibility for cervical lesions development.

Materials and Methods

Patients

Our study has been approved by Ethics Committee of the Clinic of Kragujevac (No 2577) and Faculty of Medicine University of Nis (01-5518-1). The study population was composed of newly diagnosed 32 LSIL

¹Faculty of Science, University of Kragujevac, ²Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, ³Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center Kragujevac, Kragujevac, Serbia *For correspondence: stosicster@gmail.com

**INFLUENCE OF GLUTATHIONE – S – TRANSFERASE (GSTT1 AND GSTM1)
POLYMORPHISM ON BASELINE MICRONUCLEI FREQUENCY IN PERIPHERAL
BLOOD LYMPHOCYTES**

Ivana STOŠIĆ¹, Darko GRUJIČIĆ¹, Slobodan ARSENIJEVIĆ²,
Olivera MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ^{1,2}

¹Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Stošić I., D. Grujičić, S. Arsenijević, and O. Milošević-Djordjević (2014):
*Influence of glutathione – s – transferase (gstt1 and gstm1) polymorphism on baseline
micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes.* - Genetika, Vol 46, No. 3,649 -
659.

We have analyzed impact of polymorphism in GSTT1 and GSTM1 genes on the micronuclei (MN) frequency in peripheral blood lymphocytes (PBLs). A total 134 women from central Serbia were enrolled in the study. Polymorphisms of GST genes were genotyped by performing a multiplex polymerase chain reaction (PCR) and cytokinesis block micronucleus (CBMN) test was used to assess MN frequency. GSTT1 null and GSTM1 null genotype carriers had higher MN frequencies as compared to positive counterparts but without statistical significance. Carriers of dual GSTT1/GSTM1 null genotypes had significantly higher MN frequency than positive/positive, positive/null and null/positive. Smokers and women >45 years old with GSTT1 null genotype and GSTT1null/GSTM1null genotypes have statistically higher MN frequency than positive counterparts. Results suggest possible influence of dual null genotypes of GSTT1/GSTM1 on the baseline MN frequency, as well influence on the level of MN in smokers and in women age >45 years. GSTT1 null genotype may have the potential to influence the baseline MN frequency in PBLs of smokers, as well as in women age >45 years.

Key words: GSTT1, GSTM1, micronuclei, peripheral blood lymphocytes, polymorphism

INTRODUCTION

Interindividual variability in the frequency of micronuclei (MN) in human peripheral blood lymphocytes has been revealed (KOPJAR *et al.*, 2010; MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ *et al.*, 2011).

Corresponding author: Ivana Stošić, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P.O. Box 60, 34 000 Kragujevac, Serbia, e-mail: stosicster@gmail.com