

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Татјана И. Ђукић

**ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА И
ЕКСПРЕСИЈЕ ГЛУТАТИОН
ТРАНСФЕРАЗА КЛАСЕ ОМЕГА СА
НАСТАНКОМ И ПРОГРЕСИЈОМ
КАРЦИНОМА ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА
МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ**

докторска дисертација

Београд, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Tatjana I. Đukić

**POLYMORPHISMS AND EXPRESSION OF
GLUTATHIONE TRANSFERASE OMEGA
IN DEVELOPMENT AND PROGRESSION
OF URINARY BLADDER TRANSITIONAL
CELL CARCINOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

МЕНТОР:

Проф. др Ана Савић-Радојевић, ванредни професор Медицинског факултета,
Универзитет у Београду

КОМЕНТОР:

Проф. др Дејан Драгичевић, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитет
у Београду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Проф. др Татјана Пекмезовић, редовни професор Медицинског факултета,
Универзитет у Београду
2. Проф. др Марија Пљеша-Ерцеговац, ванредни професор Медицинског факултета,
Универзитет у Београду
3. Проф. др Кармен Станков, ванредни професор Медицинског факултета,
Универзитет у Новом Саду

Датум одбране:

Захваљујем проф. др Татјани Симић на пруженој прилици да учим и радим оно што волим, као и на корисним саветима и помоћи током писања дисертације.

Захваљујем свом ментору, проф. др Ани Савић-Радојевић на свесрдној подршци, правилном усмеравању, мотивацији и стрпљењу током рада на овој докторској тези.

Значајну захвалност изражавам свом коментору, проф. др Дејану Драгичевићу за истрајну личну и стручну подршку, као и помоћ приликом скупљања научне грађе.

Желела бих да захвалим члановима комисије, проф. др Татјани Пекмезовић, проф. др Марији Пљеши-Ерцеговац и проф. др Кармен Станков, на корисним сугестијама које су допринеле квалитету тезе.

Захвалност изражавам и својим драгим колегицама доц. др Марији Матић, асистентима др Соњи Шуваков и др Весни Ђорић, MSc Тањи Радић, медицинском техничару Сањи Секулић на несебичној помоћи приликом експерименталног рада и уобличавања тезе.

Захваљујем др Биљани Драгичевић на помоћи приликом скупљања клиничког материјала.

Захвалност изражавам и др Емини Милошевић за честе и корисне консултације и сарадњу.

Посебну захвалност упућујем својој породици који ме је подржавала и веровала у мене.

Мојој породици

**ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА И ЕКСПРЕСИЈЕ ГЛУТАТИОН
ТРАНСФЕРАЗА КЛАСЕ ОМЕГА СА НАСТАНОМ И ПРОГРЕСИЈОМ
КАРЦИНОМА ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ**

РЕЗИМЕ

Циљ: Циљ ове студије је био да се разјасни улога генског полиморфизма *GSTO1* (rs4925) и *GSTO2* (rs156697) у индивидуалној подложности за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике, заједно са њиховим модификујућим ефектом на укупно преживљавање и/или хемотерапију код ових болесника. Такође је испитивана и експресија *GSTO1-1* у туморском и околном морфолошки неизмењеном епителу болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике.

Материјал и методе: Полиморфизам *GSTO1* и *GSTO2* је одређиван анализом производа рестрикционе дигестије ДНК фрагмената насталих реакцијом ланчаног умножавања (*PCR-RFLP*). Предиктивна вредност различитих *GSTO* генотипова је процењивана Коксовим регресионим хазардним моделима, док су Каплан-Мајерове криве коришћене за приказивање вероватноће испитиваних догађаја, а лог-ранк тест за утврђивање разлика у вероватноћи преживљавања. *GSTO1-1* експресија је одређивана методом Вестерн блота и реакцијом ланчаног умножавања у реалном времену (*RT-PCR*), док је за испитивање укупне S-глутатионилације изведена електрофореза под нередукујућим условима. Концентрација укупног и оксидованог глутатиона је одређена спектрофотометријски. Концентрација интерлеукина-8 (IL-8) у цитосолу и уринарни 8-хидрокси-2'-деоксигуанозин (8-OHdG) су одређени методом ензимског имуноесеја.

Резултати: Носиоци варијантног *GSTO2**G/G генотипа су били под повећаним ризиком за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике (OR=2,6, 95% CI=1,2-5,8, p=0,041), који је био још израженији када је овај генотип био удружен са пушењем (OR-odds ratio =4,3, 95%CI-confidence interval =1,6-11,2, p=0,003). Даље, добијени резултати указују да су носиоци хаплотипа *GSTO1**C/*GSTO2**G (*GSTO1* референтни алел/*GSTO2* варијантни алел) под највећим ризиком за настанак

карцинома мокраћне бешике (OR=2,8, 95% CI=1,5-5,2, p=0,002). Мада је концентрација уринарног 8-OHdG код пацијената са карциномом прелазног епитела била знатно виша у односу на контроле, није уочен ефекат удруженог *GSTO1/GSTO2* генотипа на степен оксидативног оштећења ДНК. Показано је да су варијантни, *GSTO1**A/A или *GSTO2**G/G генотипови били независни предиктори укупног ризика за смртни исход код болесника са карциномом мокраћне бешике (HR-hazard ratio =2,9, p=0,022; HR=3,9, p=0,001) и значајно су утицали на укупно преживљавање ових болесника. С друге стране, значајан утицај на преживљавање пацијента који су примали хемотерапију је показан једино за *GSTO2* полиморфизам (p=0,006). Садржај редукованог глутатиона, заједно са *GSTO1*-1 активношћу и експресијом је био статистички значајно виши у туморском ткиву у односу на околни неизмењени уроепителијум. Посматрајући *GSTO1*-1 тиолтрансферазну активност, као и концентрацију цитосолног IL-8, уочена је јасна корелација са градусом и стадијумом тумора. Насупрот томе, укупна протеинска глутатионилација је била интензивнија у нетуморском у односу на туморско ткиво.

Закључци: Резултати указују да је *GSTO1**C/*GSTO2**G хаплотип повезан са повећаним ризиком за настанак карцинома мокраћне бешике, а најизраженији је код пушача, носилаца варијантног *GSTO2**G/G генотипа. Поред тога, функционални *GSTO1* и *GSTO2* полиморфизми могу имати прогностичку и/или фармакогеномску улогу код болесника са инвазивним карциномом прелазног епитела мокраћне бешике. Новооткривена деглутатионилишућа активност *GSTO1*-1 указује да повећана активност овог ензима може имати важну улогу у поремећају редокс равнотеже у карциному прелазног епитела, као и у прогресији болести.

Кључне речи: карцином прелазног епитела мокраћне бешике, *GSTO1*, *GSTO2*, полиморфизам, ризик, преживљавање, глутатион, IL-8, 8-OHdG

Научна област: Медицина

Ужа научна област: Медицинска и клиничка биохемија

**POLYMORPHISMS AND EXPRESSION OF GLUTATHIONE TRANSFERASE
OMEGA IN DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF URINARY BLADDER
TRANSITIONAL CELL CARCINOMA**

SUMMARY

Purpose: The aim of the study was to clarify the role of *GSTO1* (rs4925) and *GSTO2* (rs156697) genetic polymorphisms in individual susceptibility to transitional cell carcinoma (TCC) of urinary bladder, together with their modifying effect on the overall survival and/or chemotherapy treatment in these patients. We also examined the *GSTO1* expression pattern in tumor and non-tumor tissue of TCC patients.

Methods: *GSTO1* and *GSTO2* genotyping was performed by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The effect of *GSTOs* polymorphisms on predicting mortality was analyzed by the *Cox* proportional hazard models, while *Kaplan-Meier* curves with log-rank tests were used to assess differences in survival probability. *GSTO1-1* expression was determined by Western blot and real time-PCR, while for the total S-glutathionylation electrophoresis under non-reducing conditions was performed. The total and oxidized glutathione content was measured by an enzymatic recycling method. Tumor cytosolic interleukin-8 (IL-8) and urine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) concentrations were estimated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: Carriers of the variant *GSTO2**G/G genotype were at increased risk of TCC development (OR-odds ratio =2.6, 95% CI-confidence interval =1.2-5.8, p=0.041), which was more pronounced, when associated with smoking (OR=4.3, 95%CI=1.6-11.2, p=0.003). Furthermore, these results indicate that *GSTO1**C/*GSTO2**G (*GSTO1* wild type/*GSTO2* variant) haplotype carriers were at the highest risk for the TCC development (OR=2.8, 95%CI=1.5-5.2, p=0.002). Although urinary 8-OHdG in TCC patients was significantly higher than in controls, the effect of combined *GSTO1*/*GSTO2* genotype on the extent of oxidative damage was not found. *GSTO1**A/A or *GSTO2**G/G variant genotypes were

independent predictors of the higher risk of death among TCC patients (HR-hazard ratio =2.9, $p=0.022$; HR=3.9, $p=0.001$; respectively) and significantly influenced the overall survival. Only *GSTO2* polymorphism showed a significant effect on the survival in the subgroup of patients who received chemotherapy ($p=0.006$). The content of reduced glutathione, together with GSTO1-1 activity and expression were significantly higher in tumor compared to surrounding non-tumor TCC tissue. Moreover, GSTO1 thioltransferase activity, as well as cytosolic IL-8 showed clear correlation with tumor grade and stage. In contrast, total protein glutathionylation was more intense in non-tumor in comparison with the corresponding tumor samples.

Conclusions: These results indicate that *GSTO1**C/*GSTO2**G haplotype is associated with increased TCC risk, which is more pronounced in smokers carriers of variant *GSTO2**G/G. Furthermore, *GSTO1**A/A and *GSTO2**G/G genotypes may have a prognostic/pharmacogenomic role in patients with muscle invasive TCC. Newly discovered deglutathionylase activity of GSTO1-1 suggests its potential important role in redox perturbations present in TCC, which might contribute to progression of TCC.

Key words: transitional cell carcinoma of urinary bladder, GSTO1, GSTO2, polymorphism, risk, survival, glutathione, IL-8, 8-OHdG

Research area: Medicine

Research field: Medical and clinical biochemistry

Садржај

1	УВОД	1
1.1	КАРЦИНОМ МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ	1
1.1.1	Епидемиологија и терапијски приступи у лечењу.....	1
1.1.2	Етиологија карцинома мокраћне бешике.....	3
1.1.2.1	Пушење.....	4
1.1.2.2	Професионална изложеност.....	5
1.1.2.3	Радиотерапија.....	6
1.1.2.4	Пол.....	6
1.1.2.5	Генетски фактори.....	7
1.2	ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗЕ	8
1.3	ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗЕ КЛАСЕ ОМЕГА (GSTO)	10
1.3.1	Полиморфизам глутатион трансферазе класе омега	11
1.3.2	Значај полиморфизма глутатион трансферазе класе омега у осетљивости за настанак немалигних и малигних обољења.....	12
1.3.3	Особине GSTO1 и GSTO2 протеина.....	13
1.3.4	Ткивна и ћелијска дистрибуција глутатион трансфераза класе омега.....	15
1.3.5	Каталитичке и некаталитичке улоге глутатион трансфераза класе омега.....	15
1.3.5.1	Глутатионилација/деглутатионилација протеина.....	17
1.3.5.2	Регулација посттранслационе обраде интерлеукина-1 β	19
1.3.5.3	Модулација калцијумских канала.....	21
1.3.5.4	Регенерација дехидроаскорбата.....	22
1.3.6	Значај глутатион трансфераза класе омега у карциному мокраћне бешике.....	23
2	ЦИЉЕВИ	26
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	27
3.1	ИСПИТАНИЦИ	27
3.2	ОДРЕЂИВАЊЕ ГЕНСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА GSTO	29
3.2.1	Изолација деоксирибонуклеинске киселине (ДНК).....	29
3.2.2	Одређивање GSTO1 полиморфизма.....	30
3.2.3	Одређивање GSTO2 полиморфизма.....	31
3.3	ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ GSTO1 НА НИВОУ иРНК	32
3.3.1	Изолација РНК.....	32
3.3.2	Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR).....	32
3.4	ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ GSTO1 НА НИВОУ ПРОТЕИНА	32
3.4.1	Припрема цитосола ткива мокраћне бешике.....	32
3.4.2	Имуноблот.....	33
3.5	ОДРЕЂИВАЊЕ ТИОЛТРАНСФЕРАЗНЕ АКТИВНОСТИ	34
3.6	ОДРЕЂИВАЊЕ УКУПНЕ S-ГЛУТАТИОНИЛАЦИЈЕ	34
3.6.1	Припрема цитосола ткива мокраћне бешике.....	34
3.6.2	Имуноблот.....	34

3.7	ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ УКУПНОГ И ОКСИДОВАНОГ ГЛУТАТИОНА.....	35
3.7.1	Припрема ткива мокраћне бешике.....	35
3.7.2	Одређивање концентрације укупног и оксидованог глутатиона.....	35
3.8	ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ЦИТОСОЛНОГ ИНТЕРЛЕУКИНА-8 И УРИНАРНОГ 8-ХИДРОКСИ-2'-ДЕОКСИГУАНОЗИНА.....	36
3.9	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА.....	37
4	РЕЗУЛТАТИ.....	39
4.1	ЗНАЧАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА <i>GSTO</i> У ПРОЦЕНИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРЦИНОМА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ.....	39
4.1.1	Демографске и клиничке карактеристике болесника и контрола.....	39
4.1.2	Повезаност полиморфизама <i>GSTO1</i> rs4925 и <i>GSTO2</i> rs156697 са ризиком за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.....	41
4.1.3	Ефекат <i>GSTO1/GSTO2</i> хаплотипа на ризик за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.....	43
4.1.4	Удружени ефекат полиморфизма <i>GSTO1</i> rs4925 и <i>GSTO2</i> rs156697 и познатих фактора ризика у настанку карцинома мокраћне бешике.....	44
4.2	ПРОЦЕНА ОКСИДАТИВНОГ ОШТЕЋЕЊА ДНК КОД БОЛЕСНИКА СА КАРЦИНОМОМ ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ.....	48
4.3	ЗНАЧАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА <i>GSTO</i> У ПРОГНОЗИ БОЛЕСНИКА СА ИНВАЗИВНИМ КАРЦИНОМОМ МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ.....	50
4.3.1	Модулирајући ефекат <i>GSTO1</i> rs 4925 полиморфизма на преживљавање болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике.....	51
4.3.2	Модулирајући ефекат <i>GSTO2</i> rs156697 полиморфизма на преживљавање болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике.....	53
4.4	ЕКСПРЕСИЈА И АКТИВНОСТ <i>GSTO1</i> У КАРЦИНОМУ ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ.....	56
4.4.1	Експресија <i>GSTO1</i> на нивоу иРНК и протеина.....	56
4.4.2	Тиолтрансферазна активност <i>GSTO1</i>	58
4.4.3	Експресија интерлеукина-8 (IL-8) у карциному прелазног епитела мокраћне бешике.....	61
4.5	САДРЖАЈ ГЛУТАТИОНА У КАРЦИНОМУ ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ.....	63
4.5.1	Укупна глутатионилација протеина.....	64
5	ДИСКУСИЈА.....	66
6	ЗАКЉУЧЦИ.....	79
7	СПИСАК СКРАЋЕНИЦА.....	81
8	ЛИТЕРАТУРА.....	84
9	БИОГРАФИЈА.....
10	ПРИЛОЗИ.....

1 УВОД

1.1 КАРЦИНОМ МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ

1.1.1 Епидемиологија и терапијски приступи у лечењу

Карцином мокраћне бешике је девети најчешће дијагностиковани тумор у светској популацији са преко 380000 новооткривених случајева сваке године и са више од 150000 смртних исхода (Siegel R. и сар, 2013). У сваком тренутку чак 2,7 милиона људи има историју овог карцинома (Ploeg M. и сар, 2009). У Сједињеним Америчким Државама стопа смртности од карцинома мокраћне бешике се у последњих тридесет година није значајно променила, тиме наглашавајући зјап који постоји у дијагнози, праћењу и терапији ових пацијената (Abdollah F. и сар, 2013). Према последњим подацима из 2012. године број новооболелих од карцинома мокраћне бешике у Републици Србији је износио 1472, од чега су 1090 оболелих били мушкарци, а 382 жене. Стандардизована стопа инциденције је износила 15,7/100000 за мушкарце и 4,6/100000 за жене. Када говоримо о узрасно специфичним стопама инциденције, највише узрасно специфичне стопе за мушкарце су регистроване у старијем узрасту, од 65. до 75. године и касније и континуирано расту. Код жена, узрасно специфична стопа инциденције почиње да расте већ од 60. године и одржава се до 75. године и касније. Током исте године од карцинома мокраћне бешике је преминуло 708 особа, од чега 550 мушкараца и 158 жена. Стандардизована стопа морталитета за мушкарце износи 7,0/100000, а за жене 1,5/100000 (Необјављени подаци Института за јавно здравље Србије “Др Милан Јовановић Батут”)

У око деведесет процената случајева карцинома мокраћне бешике ради се о карциному прелазног епитела, који води порекло из уроепителних ћелија које су најизложеније дејству крајњих производа метаболизма различитих једињења, укључујући и канцерогене. Велике епидемиолошке студије су показале да је у 60-70% случајева настанак карцинома мокраћне бешике удружен са изложеношћу хемијским

канцерогенима (Filiadis I. и сар, 2000; Thier R. и сар, 2002). Наиме, ови тумори се чешће јављају код особа изложених дуванском диму, као и код особа професионално изложених штетним једињењима. Сматра се да је пушење одговорно за 40-50% случајева карцинома мокраћне бешике код мушкараца и 30% код жена (Filiadis I. и сар, 2000). С друге стране, професионална изложеност штетним једињењима се сматра узроком настанка карцинома мокраћне бешике у 19% случајева код мушкараца и 6% жена (Filiadis I. и сар, 2000).

Иако је стопа преживљавања за карциноме мокраћне бешике релативно висока, код две трећине болесника тумор се поново јавља у року од пет година (Schrier В. и сар, 2004). Врло често су рекурентни тумори агресивнији и имају лошу прогнозу. Терапија избора карцинома прелазног епитела мокраћне бешике је најчешће хируршка интервенција, која се може комбиновати са хемотерапијом, зрачењем и/или имунотерапијом. Наиме, узимајући у обзир да је код више од 65% новооткривених болесника са овим карциномом тумор ограничен само на површински сегмент уроепителијума и не захвата мишићни слој зида бешике (Chopin DK. и Gattegno В, 2002), за њихово лечење се најчешће примењује трансуретрална ресекција. Међутим, велики проблем у терапији ових суперфицијалних карцинома представља веома честа поновна појава тумора након хируршке ресекције. У више од половине болесника лечених трансуретралном ресекцијом карциноми се поново јављају, па се појава рецидива сматра карактеристичним обележјем ових тумора (Schrier В. и сар, 2004). Осим тога, код 20-30% рекурентних тумора запажа се прогресија ка вишем стадијуму и степену малигнитета (Cote RJ и Datar RH, 2003; Schrier В. и сар, 2004). За лечење узнапредовале болести примењују се радикални хируршки захвати у комбинацији са хемотерапијом, зрачењем и/или имунотерапијом (Cote RJ и Datar RH, 2003). Поред тога, све више се истиче значај неoadјувантне терапије. У мета анализи из 2005. године (Sherif А. и сар, 2004), која је обухватила податке о болесницима из 11 студија (3005 болесника) истиче се значајно дуже преживљавање ових болесника управо коришћењем неoadјувантне терапије. Показано је да само протокол хемотерапије који садржи цисплатину и макар један додатни хемотерапеутски лек даје значајно

терапијско побољшање. Протоколи који су били анализирани су били MVA(E)C (метотрексат, винбластин, адриаамин (епирубицин), цисплатина), CMV (цисплатина, метотрексат, винбластин), CM (цисплатина, метотрексат), цисплатина/адриаамин, цисплатина/5-флуороурацил, и CarboMV (карбоплатина, метотрексат, винбластин). Модернији хемотерапијски протокол као гемцитабин/цисплатина је показао сличне резултате као MVAC у најновијим анализама, али није био део контролисаних студија (Yuh BE. и сар, 2013; Dash A. и сар, 2008). Примена адјувантне хемотерапије након радикалне цистектомије код болесника са стадијумом болести T3/4 и/или позитивним лимфним нодусима на присуство тумора (N+), а без клинички видљивих метастаза (M0) је још увек предмет научне расправе (Cohen SM. и сар, 2006; Sylvester R. и Sternberg C, 2000) и ређе се примењује у клиничкој пракси (David KA. и сар, 2007).

На крају, неопходно је напоменути да у терапији болесника са карциномима бешике, у свим стадијумима туморске болести, може постојати резистенција на хемотерапију (Chopin DK. и Gattegno B, 2002).

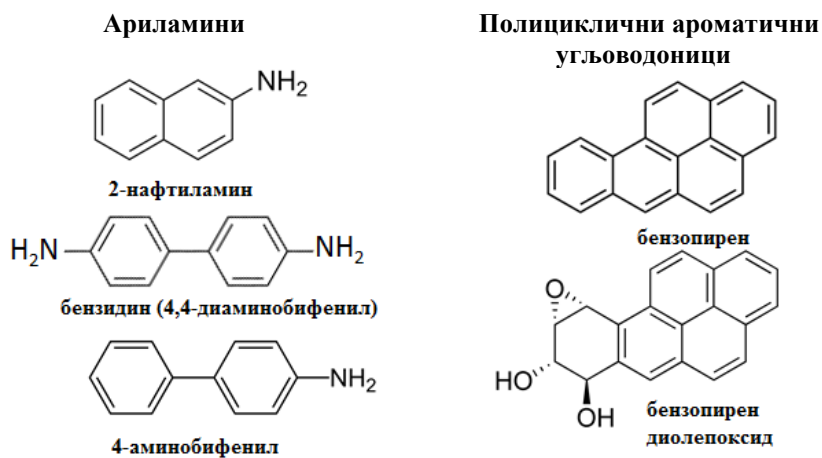
1.1.2 Етиологија карцинома мокраћне бешике

Штетне хемикалије присутне у спољашњој средини играју важну улогу у настанку карцинома мокраћне бешике. Канцерогени присутни током професионалне изложености, пушење и запаљенска стања повезана са дуготрајно пласираним катетером (Stonehill WH и сар., 1996) су најважнији фактори у иницијацији карцинома мокраћне бешике. Поред тога, показано је да претходно излагање карлице радиолошкој терапији током лечења неког другог карцинома (Kaldor JM и сар., 1995; Kleinerman RA и сар., 1995; Neugut AI и сар., 1997), као и употреба циклофосамида (Tuttle TM и сар., 1988) такође представљају значајне факторе ризика, вероватно због директног мутагеног дејства. Сви ови фактори могу довести до генских мутација, које имају за крајњу последицу ирверзибилни прелазак нормалне уроепителне ћелије у малигну.

1.1.2.1 Пушење: најзначајнији фактор ризика за настанак карцинома мокраћне бешике

Пушење представља најважнији фактор ризика за настанак карцинома мокраћне бешике и сматра се одговорним за настанак карцинома код 50-65% мушкараца и 20-30% жена (Freedman ND. и сар, 2011). Узрочна веза између изложености дуванском диму и настанку карцинома мокраћне бешике је успостављена у научним студијама у којима се могу искључити постојање случајности, пристрасност и постојање неког другог фактора ризика (*IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans*, 2004).

Наиме, недвосмислено је показано да је инциденција карцинома мокраћне бешике директно повезана како са дужином пушачког стажа, тако и са бројем цигарета (Brennan P. и сар, 2000). Штавише, једна од мета анализа, која је обухватила 216 студија од 1961. до 2003. године, јасно је показала повећани ризик за настанак овог карцинома, и код садашњих и код бивших пушача (Gandini S. и сар, 2008). С друге стране, код особа које су престале да пуше ризик се смањује за око 40% током прве четири године и чак 60% након 25 година од престанка пушења (Brennan P. и сар, 2000). У дуванском диму је присутно око 3800 једињења, од којих је око 60 канцерогено (Karağas MR. и сар, 2005).



Слика 1. Уроепителни канцерогени

Најважнији уроепителни канцерогени присутни у дуванском диму, по хемијском саставу, припадају ароматичним аминима (ариламинима) и полицикличним ароматичним угљоводоницима (енг. *polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH*) (Karagas MR. и сар, 2005) (Слика 1).

За једињење из групе полицикличних ароматичних угљоводоника, бенз(а)пирен потврђено је канцерогено дејство на уроепителне ћелије. Међутим, битно је напоменути да пушење не представља једини извор *PAH*-а, с обзиром на чињеницу да њихове комплексне смеше настају и у току сагоревања фосилних горива (Boffetta P. и сар, 1997). Тако је показано да су полицикличним ароматичним угљоводоницима нарочито изложени радници у индустрији алуминијума, рудари, као и професионални возачи.

Најпознатији ариламини, чије је канцерогено деловање на уротелијум потврђено, су 2-нафтиламин, бензидин и 4-аминобифенил (Lower GM, 1982). Иако се раније сматрало да су ариламинима углавном изложени радници у индустрији боја и лакова, присуство ових једињења је крајем прошлог века потврђено и у дуванском диму (Wallace L и сар, 1987).

1.1.2.2 Професионална изложеност хемијским канцерогенима

Професионална изложеност представља други по важности фактор ризика за настанак овог карцинома. Случајеви карцинома мокраћне бешике, који су забележени су у 20 до 25% случајева, довођени у везу са самим послом којим се особа бави. Наиме, карцином мокраћне бешике се чешће среће код особа које су изложене дериватима бензена и ариламинима (2-нафтиламин, 4-аминобифенил, 4,4'-метилендианилин, о-толуидин), у пословима који укључују употребу боја, гуме, текстила, сликарских боја, коже и хемикалија (Pashos CL. и сар, 2002).

Ризик за настанак карцинома услед професионалне изложености канцерогеним ароматичним аминима значајно расте након 10 година и дуже изложености, а средњи

латентни период обично премашује 30 година (Harling M. и сар, 2010; Weistenhofer W. и сар, 2008).

Данас, због строгих прописа и закона који су на снази, горе поменуте хемикалије минимално доприносе настанку карцинома мокраћне бешике. Оно што је значајно споменути је да се последњих година сам степен и начин професионалне изложености променио, јер се промеила свест о штетном дејству хемикалија на радном месту. Појачане су мере заштите на раду, а новија истраживања показују да професионална изложеност канцерогенима доприноси настанку карцинома мокраћне бешике код 7,1% мушкараца, док у женској популацији та веза није успостављена (Burger M. и сар, 2013; Rushton L. и сар, 2010).

1.1.2.3 Радиотерапија

Показано је да радиолошка терапија као део терапијског протокола у лечењу гинеколошких малигнитета повећава стопу секундарних малигнитета мокраћне бешике (Chrouser и сар, 2006). Наиме, излагање карлице радиолошкој терапији током лечења карцинома јајника (Kaldor JM и сар, 1995), грлића материце (Kleinerman RA и сар, 1995) и простате (Neugut AI и сар, 1997) представља значајан фактор ризика. Одговор вероватно лежи у директном мутагеном дејству радиотерапије што води настанку генетских мутација и за крајњу последицу има иреверзибилни прелазак нормалне уроепителне ћелије у малигну.

1.1.2.4 Пол

Однос обољевања мушкараца и жена од карцинома мокраћне бешике износи 3,8:1 (Siegel R. и сар, 2013). Међутим, код жена је често овај карцином у тренутку постављана дијагнозе већ узнатрествовао и преживљавање је лошије (Fajkovic H. и сар, 2011). Једно од објашњења овог лошијег преживљавања може лежати и у чињеници да се женама овај карцином дијагностикује у каснијој животној доби што има директан

утицај на преживљавање. Додатно, сматра се да хематурија, као један од симптома карцинома, обично укључује ширу диференцијалну дијагностику болести које се код жена чешће јављају него карцином мокраћне бешике. Полне разлике у погледу преваленције карцинома мокраћне бешике могу бити и услед неких других разлога који нису пушење и професионална изложеност. Наиме, велика кохортна студија, је показала да постменопаузални статус жена повећава ризик за настанак овог карцинома. На основу ових резултата може се претпоставити да разлике у нивоу естрогена и андрогена између мушкараца и жена представљају још један могући узрок разлике у преваленцији карцинома мокраћне бешике међу половима (McGrath M. и сар, 2006; Scosyrev E. и сар, 2009; Stenzl A. и сар, 2010).

1.1.2.5 Генетски фактори

Све више података означава генетску предиспозицију као фактор који би могао утицати на инциденцију карцинома мокраћне бешике. Повезаност између присуства тумора у породици и ризика за његов настанак, уз означене факторе спољне средине је испитивана у великој шпанској студији о карциному мокраћне бешике (Murta-Nascimento C. и сар, 2007). Показано је да је присуство тумора у првој линији родбине било удружено са значајно већим ризиком за настанак и код деце, а ова повезаност је била још израженија међу млађим болесницима.

Недавно је на основу резултата неколико студија асоцијације у читавом геному (енг. *Genome-wide association studies, GWAS*) карцинома мокраћне бешике идентификовано неколико суспектних гена повезаних са ризиком за настанак овог карцинома (Rothman N. и сар, 2010, Kiemeny LA. и сар, 2008). Интересантно, међу кандидатима су и два гена укључена у метаболизам канцерогена, N-ацетилтрансфераза (NAT) и глутатион трансфераза M1 (*GSTM1*), за чији је делециони полиморфизам показано да повећава ризик за настанак карцинома мокраћне бешике (Garcia-Closas M. и сар, 2013).

1.2 ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗЕ

Подаци из литературе указују да у настанку и прогресији карцинома мокраћне бешике, као и у појави резистенције на хемиотерапију значајну улогу могу имати глутатион трансферазе (GST) (Simic T. и сар, 2009). Глутатион трансферазе су суперфамилија ензима које у ћелијама људског организма имају вишеструке улоге. Ова суперфамилија ензима се развила у најмање три структурно различите фамилије ензима: цитосолне GST, капа класа митохондријалних GST и мембрански протеини укључени у метаболизам еикосаноида и глутатиона (енг. *Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*, MAPEG). Цитосолне глутатион трансферазе (GST) су ензими најпознатији по својој улози коју имају у фази II детоксикације, где каталишу реакције коњугације редукованог глутатиона (GSH) и електрофилних супстрата. Combes B. и Stakelum GS. (1961), Booth J. и сар, (1961) и Boyland E. и Chasseaud LF. (1968) су били први који су описали коњугацију глутатиона са различитим спектром ксенобиотика. Касније, показано је да су протеини иницијално названи лигандини, због своје функције везивања великог броја лиганата као што су стероиди, билирубин, различити ксенобиотици, у ствари глутатион трансферазе (Litwack G. и сар, 1971; Ketterer V. и сар, 1974; Habig WH. и сар, 1974). Даље, пречишћавањем индивидуалних изоензима потврђена је претпоставка да постоји више глутатион трансфераза, чије се супстратне специфичности преклапају (Habig WH. и сар, 1974). Иако су почетна истраживања ове фамилије ензима рађена на ткиву јетре где глутатион трансферазе чине 10% солубилних протеина, присуство ових ензима је показано и у другим ткивима. Осим коњугације различитих ксенобитика са глутатионом, GST учествују и у детоксикацији ендогено насталих слободних радикала (Hayes JD. и сар, 2005). Последњих година, истраживања ове фамилије ензима показују да GST такође каталишу и друге реакције у којима учествује глутатион, као и да регулишу велики број ћелијских процеса протеин-протеинским интеракцијама.

Цитосолне глутатион трансферазе (GST) представљају једну од три познате фамилије GST која је даље подељена на неколико класа на основу аминокотерминалне секвенце и имунолошких особина (Mannervik В. и сар, 1992, 2005).

Табела 1. Цитосолне глутатион трансферазе, класе и хромозомска локализација њихових гена (модификовано из рада Board PG. и сар, 2013)

Ознака ензима	Класа	Ген	Хромозом	Број
GSTA1-1		<i>GSTA1</i>		NP_665683
GSTA2-2		<i>GSTA2</i>	6p12.2	NP_000837
GSTA3-3	Алфа	<i>GSTA3</i>		NP_000838
GSTA4-4		<i>GSTA4</i>		NP_001503
GSTA5-5		<i>GSTA5</i>		NP_714543
GST M1-1		<i>GSTM1</i>		
GST M2-2		<i>GSTM2</i>	1p13.3	NP_000839
GST M3-3	Ми	<i>GSTM3</i>		NP_000840
GST M4-4		<i>GSTM4</i>		NP_671489
GST M5-5		<i>GSTM5</i>		NP_000842
GST P1-1	Пи	<i>GSTP1</i>		11q13.3
GST T1-1	Тета	<i>GSTT1</i>	22q11.23	NP_000844
GST T2-2		<i>GSTT2</i>		NP_000845
GST Z1-1	Зета	<i>GSTZ1</i>	14q24.3	NP_665877
GST O1-1	Омега	<i>GSTO1</i>	10q24.3	NP_004823
GST O2-2		<i>GSTO2</i>		NP_899062
GST S1-1/ HPGDS	Сигма	<i>HPGDS</i>	4q22.3	NP_055300
CLIC 2	CLIC	<i>CLIC2</i>	Xq28	NP_001280

Код људи је до сада идентификовано седам класа цитосолних GST ензима, α (GSTA), μ (GSTM), π (GSTP), σ (GSTS), θ (GSTT), ζ (GSTZ), укључујући класу омега Ω (GSTO), која је последња идентификована. Протеини одговарајуће класе се обележавају почетним словом класе. На пример, GSTA1-1 је хомодимерни производ алфа класе *GSTA1* гена, а GSTA1-2 је хетеродимерни производ *GSTA1* и *GSTA2* гена. Фамилија цитосолних GST обухвата и хлоридне јонске канале (енг. *Chloride Intracellular Channel*), CLIC 1–5 (Dulhunty A. и сар, 2001). Ови протеини су структурно слични другим класама цитосолних GST, али не катализују коњугацију електрофилних метаболита са глутатионом. Класификација цитосолних GST је приказана на табели 1.

1.3 ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗЕ КЛАСЕ ОМЕГА

Омега класа глутатион трансфераза је последња описана класа цитосолних GST (Board PG. и сар, 2000). Код глутатион трансфераза класе омега само 20% секвенце аминокиселина се поклапа са осталим члановим GST класе, али је структуралним студијама потврђено да оне припадају овој суперфамилији (Board PG и сар, 2000). Два *GSTO* гена су идентификована у хуманој популацији, *GSTO1* и *GSTO2*. Ова два гена величине 12,5 и 24,5 кб налазе се на хромозому 10 међусобно удаљена 7,5 кб. У оба гена је показано присуство полиморфизма, од којих су три најчешће изучавана функционална полиморфизма, *GSTO1* rs 4925, *GSTO1* DelGlu155 и *GSTO2* rs156697 (Mukherjee B. и сар, 2006; Whitbread AK. и сар, 2005).

GST изоензими класе омега (*GSTO1-1* и *GSTO2-2*) немају заједничке супstrate са осталим GST класама, али поседују читав спектар специфичних активности. Новооткривена тиолтрансферазна активност ове класе се, због присуства функционалне групе цистеина у активном месту, све више повезује са процесом S-глутатионилације (посттранслациона модификација протеина додавањем глутатиона на специфичне цистеинске остатке). Такође, дехидроксиаскорбат-редуктазна (ДХАР) активност, посебно изоензима *GSTO2-2*, који се сматра ензимом са највећом ДХАР

активношћу у ћелијама сисара, указује на значај ових ензима у регулацији редокс баланса у ћелији. Поред тога, GSTO учествују и у метаболизму и биотрансформацији арсена својом монометиларсенат редуктазном активнишћу. GSTO1-1 поседује и некаталитичке улоге, као што су модулација посттранслационе обраде инфламаторног цитокина интерлеукина-1 β (IL-1 β) и модулација ријанодинских рецептора. GSTO1-1 и GSTO2-2 се разликују и по ткивној и ћелијској дистрибуцији, при чему је GSTO1-1 експримирана у готово свим ткивима (Zhou H. и сар, 2012; Whitbread AK. и сар, 2005).

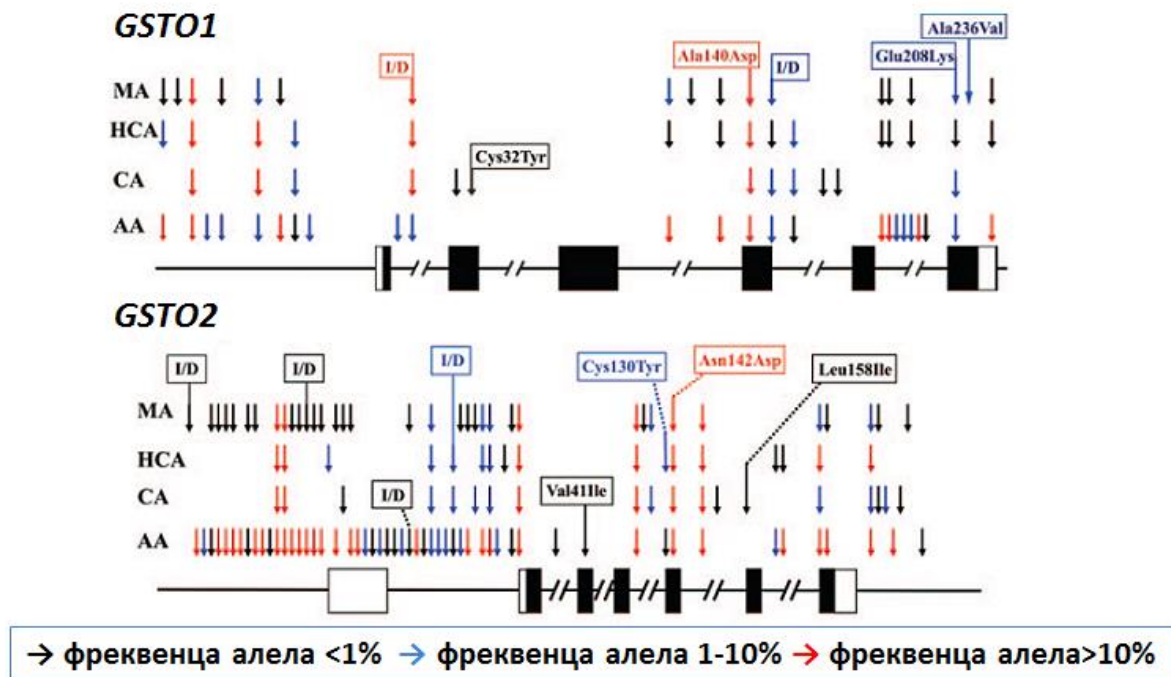
1.3.1 Полиморфизам глутатион трансферазе класе омега (GSTO)

Поред разлика које постоје између класа глутатион трансфераза и класе омега, присутна је и значајна генетска хетерогеност у оквиру саме омега класе која настаје као последица генских делеција, као и полиморфизма једног нуклеотида (енг. *Single nucleotide polymorphism*, SNP). Многе од ових варијација имају важне функционалне последице и различите научне студије процењују евентуалну везу која постоји између GSTO полиморфизама и клиничких обољења. Mukerjee B. и сарадници су описали 31 полиморфизам код GSTO1 и 66 полиморфизама у GSTO2 гену (Слика 2). По значајности и повезаности са различитим обољењима издвајају се полиморфизам једног нуклеотида GSTO1 rs 4925 и GSTO2 rs 156697 (Mukerjee B. и сар, 2006).

GSTO1 полиморфизам једног нуклеотида rs 4925 је, до сада, најчешће испитивани полиморфизам (Whitbread AK. и сар, 2003). Код овог полиморфизма промена настаје у оквиру егзона 4 на нуклеотиду 419 где цитозин (C) бива замењен аденином (A) што води супституцији аланина (Ala, A) аспаратом (Asp, D) у аминокиселини 140 (*A140D) (Marahatta SB. и сар, 2006).

Код GSTO2 полиморфизма једног нуклеотида, rs 156697, промена настаје такође у оквиру егзона 4 на нуклеотиду 424 где аденин (A) бива замењен гуанином (G) што води супституцији аспарагина (Asn, N) аспаратом (Asp, D) у аминокиселини 142

(*N142D). Генотип * A/A је присутан у око 59% популације, *A/G у око 37%, а *G/G у око 4% популације (Marahatta SB. и сар, 2006).



Слика 2. *GSTO1* и *GSTO2* полиморфизми у хуманој популацији (слика преузета из рада Mukerjee В.и сарадника, 2006)

1.3.2 Значај полиморфизма глутатион трансферазе класе омега у осетљивости за настанак немалигних и малигних обољења

Allen М. и сарадници су изучавали два полиморфизма S-трансфераза класе омега, полиморфизам rs 4925 (Ala140Asp) *GSTO1* и полиморфизам rs156697 (Asn142Asp) *GSTO2* и показали да *GSTO* варијанте могу смањити експресију *GSTO2* у мозгу, односно да су болесници, носиоци *GSTO2* варијантног алела под повећаним ризиком за настанак Алцхајмерове болести (Allen М. и сар, 2012). Piacentini S. и сарадници су пратили повезаност полиморфизма *GSTO2**N142D (rs156697) са ризиком за настанак хипотироидизма у италијанској популацији. Њихови резултати говоре о чак 4,56 пута већем ризику за настанак хипотироидизма код особа носиоца *GSTO2*

N142/D142 генотипа (Piacentini S. и сар, 2012). У студији Стаменковића и сарадника изучаван је утицај полиморфизма rs 4925 (Ala140Asp) *GSTO1* и полиморфизам *GSTO2*, rs 156697 (Asn142Asp) на ризик за настанак сенилне катаракте. Добијени резултати показују да је варијантни *GSTO2*Asp* генотип повезан са повећаним ризиком за настанак сенилне катаракте код пушача и професионално изложених болесника (Stamenkovic M. и сар, 2014).

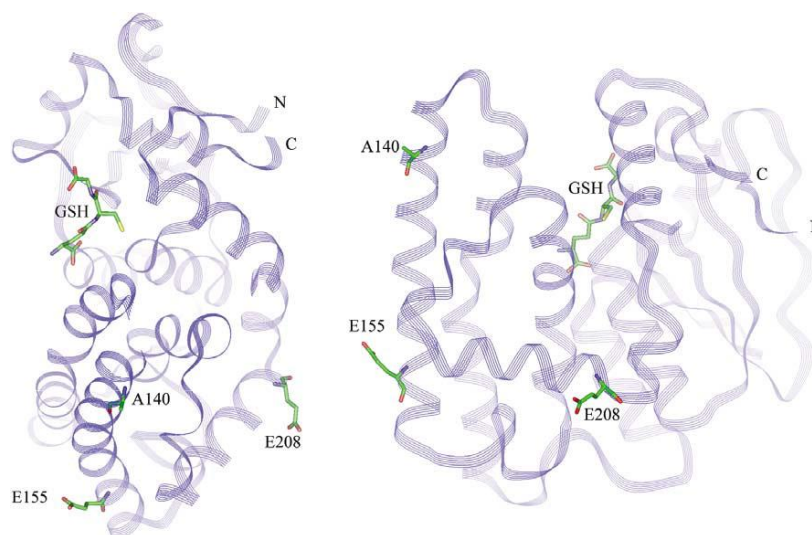
Даље, Marahatta и сарадници су показали да *GSTO1*A140D* полиморфизам може бити важан фактор ризика за настанак хепатоцелуларног карцинома, холангиокарцинома и тумора дојке (Marahatta SB. и сар, 2006).

1.3.3 Особине *GSTO1* и *GSTO2* протеина

Хумани *GSTO1* протеин са 241 аминокиселином и *GSTO2* са 243 аминокиселине имају веома велику сличност у структури, која показује 64% поклапања (Board PG. и сар, 2000; Whitbread AK. и сар, 2005). Иако је предвиђена величина хуманог *GSTO1* мономера 27,6 kDa, приликом електрофорезе протеина овај ензим се издваја на величини од 31 kDa (Board PG. и сар, 2000). Веома важна особина *GSTO2* субјединице је висок садржај цистеина. Постоји чак 11 цистеинских остатака у *GSTO2* протеину (4,5%) у поређењу са 5 (2,1%) у *GSTO1*. Као и већина цитосолних GST, *GSTO1* и *GSTO2* су хомодимери (*GSTO1-1*, *GSTO2-2*) (Board PG. и сар, 2000, Zhou H. и сар, 2012).

GSTO1-1 поседује N-терминални домен сличан домену тиоредоксина и C-терминални домен, који је састављен искључиво од α -хеликса. *GSTO1* има још неке специфичне одлике, као што је N-терминална екстензија од 19 аминокиселинских остатака, који је богат пролином и не налази се код осталих чланова GST фамилије (Whitbread AK. и сар, 2005) (Слика 3). Функционална група остатака цистеина у активном месту на позицији 32 (Cys-32) је друга специфична одлика *GSTO1* и *GSTO2*. Код других чланова GST фамилије у активном месту се налазе аминокиселински остаци тирозина и серина. Показано је да цистеин на овој позицији у активном месту

GSTO1-1 формира дисулфидне везе са глутатионом (Board PG. и сар, 2000). На основу података о осетљивости ензима на дејство алкилирајућих агенаса (Board PG. и сар, 2000), као и на основу губитка тиолтрансферазне активности експерименталном мутацијом цистеина у аланин на позицији 32, закључено је да цистеин на овој позицији представља функционалну аминокиселину и да формирање дисулфида представља део каталитичког механизма у преносу тиол група.



Слика 3. Мономерни облик глутатион трансферазе омега 1

На слици је обележено „G“ место у саставу активног места (заједно са молекулом глутатиона), као и позиције генетски варијабилних аминокиселина функционалних GSTO1 полиморфизама (слика преузета из рада Whitbread A. и сар, 2005)

С друге стране, GSTO1-1 поседује веома слабу глутатион-коњугујућу активност са класичним GST супстратом, 1-хлоро-2, 4 динитробензенем (Board PG. и сар, 2000), док мутацијом цистеина у аланин расте активност са овим супстратом. Наиме, за разлику од осталих GST класа, „H“ место, које се налази у активном месту ензима и служи за везивање хидрофобних супстрата, је у случају GSTO1-1 релативно велико и мање хидрофобно (Board PG. и сар, 2000). Ова особина, заједно са великим

местом за везивање супстрата, наводи на закључак да супстрат за GSTO1-1 не мора бити изразито хидрофобан и може бити чак и протеин. Чини се да разлика у активности коју испољавају два изоензима, GSTO1-1 и GSTO2-2, потиче управо од разлика које постоје у изгледу њиховог „Н“ места које је код GSTO2-2 уже, што је у сагласности са уоченом тежњом GSTO2-2 да каталише реакције са мањим супстратима у односу на GSTO1-1.

1.3.4 Ткивна и ћелијска дистрибуција омега класе глутатион трансфераза

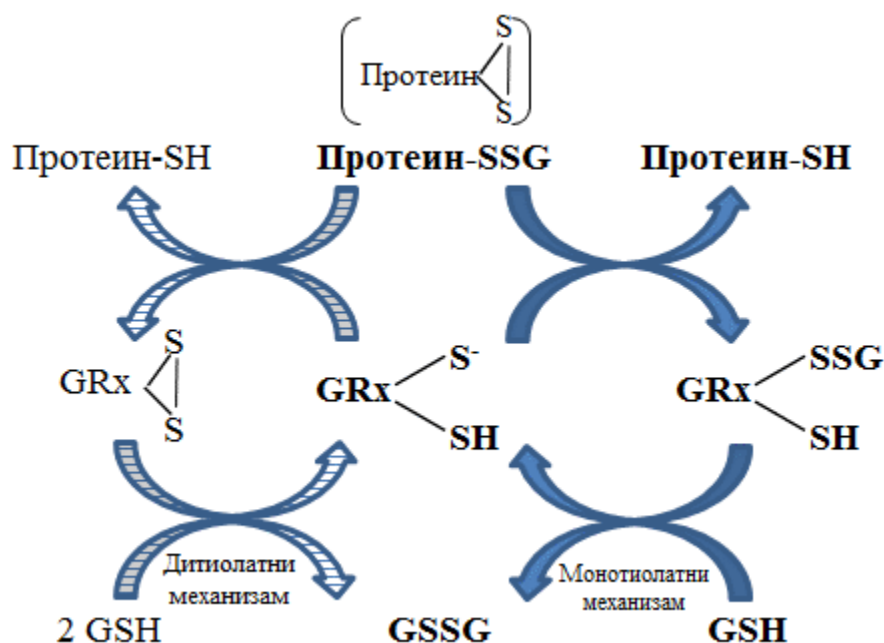
Northern блот анализом показано је да је GSTO1 експримирана у великом броју ткива (Whitbread АК. и сар, 2005). Релативно висок ниво експресије иРНК GSTO1 је запажен у јетри, срцу и скелетним мишићима. Анализом експресије GSTO2 показано је да је и овај ензим присутан у јетри, бубрегу и скелетним мишићима (Whitbread АК. и сар, 2005), а највиши ниво GSTO2 експресије је пронађен у тестисима.

Иако *Northern* блот анализа пружа податке о генској експресији у одговарајућим ткивима, остају прикривени подаци о значајним варијацијама у експресији у различитим ћелијама и деловима ћелије. Тако је имунохистохемијском анализом GSTO1-1 ткива мозга показано да, за разлику од неурона, у којима није показана експресија GSTO1-1, глијалне ћелије, у значајној мери поседују овај ензим (Yin ZL. и сар, 2001). Поред тога, имунохистохемијом је присуство GSTO1 у једру и једарној мембрани показано у бројним типовима ћелија (Yin ZL. и сар, 2001). Ова једарна локализација би могла указати на додатне потенцијалне улоге омега класе, невезане од метаболизма ксенобиотика.

1.3.5 Каталитичке и некаталитичке улоге глутатион трансфераза омега

С обзиром да је код омега класе глутатион трансфераза функционална група у активном месту остатак цистеина, оне поседују спектар каталитичких активности различитих у односу на друге GST представнике. Ове активности се могу сврстати у

групу глутатион-зависних измена тиол-група или реакција редукције. Наиме, показано је да оба изоензима, GSTO1-1 и GSTO2-2, каталишу превасходно тиолтрансферазне и дехидроаскорбат редуктазне реакције (Whitbread AK. и сар, 2005). Овакве каталитичке активности су различите од осталих GST класа, али су типичне за глутаредоксине (Grx), ензиме који припадају фамилији редоксина и имају структурно сличан N-терминални домен са цитосолним GST (Shelton MD. и сар, 2005). Каталитички механизам деглутатионилације мешовитог дисулфида протеина и глутатиона (протеин-SSG) посредован глутаредоксином је приказан на слици 4.



Слика 4. Каталитички механизам глутаредоксина

Десни део слике приказује реакцију катализе Grx путем монотиолатног, а леви део слике приказује дитиолатни механизам катализе (слика преузета из рада Mieleval JJ. и сар, 2008)

Централни део слике приказује реакцију катализе Grx путем монотиолног механизма у ком један од корака представља реакција селективне двоструке измене. Наиме, по овом предложеном моделу, тиолатни ањон ензима (Grx-S^-) напада глутатионилисани сумпор из протеин-SSG мешовитог дисулфида и настаје

интермедијер, ковалентно везан за ензим (GRx-SSG) уз отпуштање редукованог протеина (први производ). Други корак подразумева редуkcију GRx-SSG уз учешће редукованог глутатиона (GSH), при чему настаје глутатион дисулфид (GSSG), као други производ. На левој страни слике је приказан и други предложени, дитиолни механизам, иако монотиолни механизам каталитичке активности глутаредоксина шире прихваћен (Mieyeal JJ. и сар, 2008).

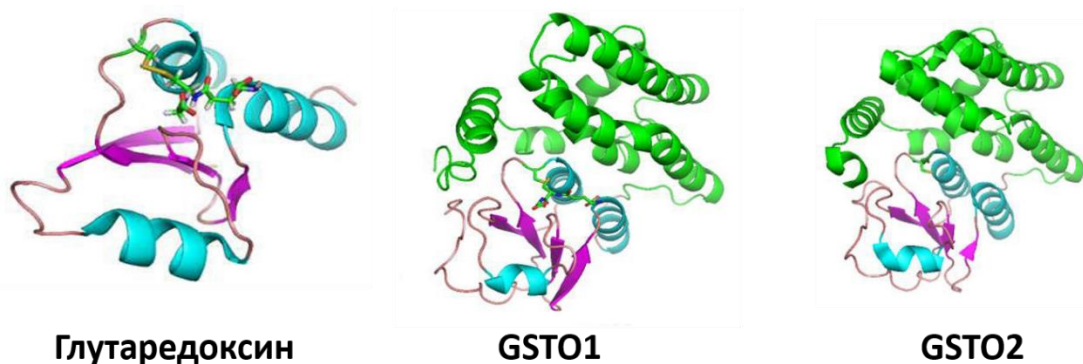
Такође, GSTO1-1 и GSTO2-2 учествују у реакцијама биотрансформације арсена (Schmuck EM. и сар, 2005).

1.3.5.1 Глутатионилација/деглутатионилација протеина

Глутатионилација представља настанак реверзибилних дисулфидних веза између протеинских тиола и глутатиона. Реакција глутатионилације је спонтана реакција, али све више истраживања говори о могућој каталитичкој улози глутатион трансферазе P1 (GSTP1) у процесу глутатионилације протеинских тиол група цистеина (Adler V, 1999; Townsend DM 2009; Castro-Caldas M, 2012). Реверзибилност реакције зависи од тренутне редокс средине и pK_a тиол група цистеина. Показано је да ниво укупне глутатионилације значајно расте као одговор на оксидативни стрес (Hill BG. и Bhatnagar A, 2012; Cooper AJL. и сар, 2011; Lock JT. и сар, 2011; Lind C. и сар, 2002; Gilge JL. и сар, 2008; Fratelli M. и сар, 2003; Dalle-Donne I. и сар, 2009). Са повратком физиолошког редокс стања, процес глутатионилације може сменити процес деглутатионилације, који каталише фамилија редоксина коју чине глутаредоксини, тиоредоксини и сулфаредоксини (Shelton MD. и сар, 2005; Findlay VJ. и сар, 2006; Greetham D. и сар, 2010; Hayano H. и сар, 1993). Иако је глутатионилација сматрана првом линијом одбране од оксидативног стреса, показано је да она утиче на функционални и структурни интегритет протеина.

Листа протеина који су на овај начин структурно и функционално модификовани чини оно што називамо дисулфидни протеом. Овај дисулфидни протеом чини велики број протеина, који су укључени у метаболизам, моделовање

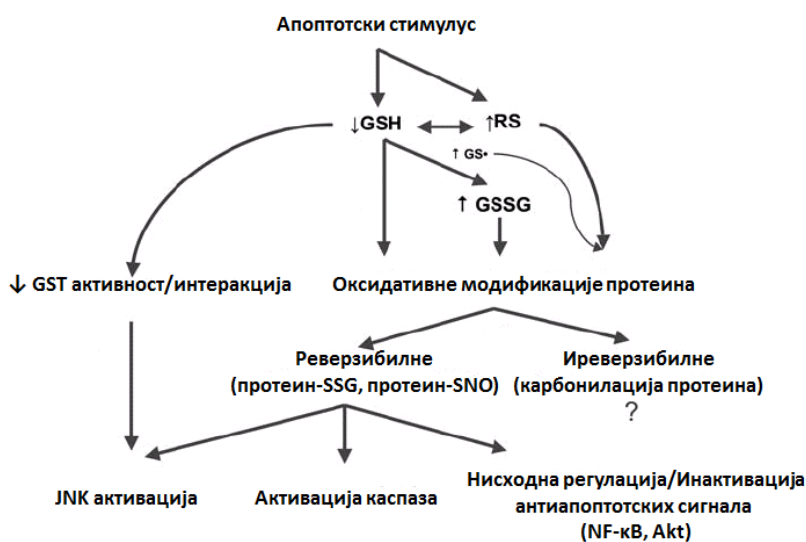
цитоскелета, модулацију јонских канала, апоптозу и епигенетске ДНК модификације (Cooper AJL. и сар, 2011; Lock JT. и сар, 2011; Lindahl M. и сар, 2011; Velu CS. и сар, 2007; Terentyev D. и сар, 2008; De Luca A. и сар, 2011). Због високог афинитета и високе специфичности ка глутатиону, глутатион тарнсферазе својом структуром одговарају ензимима, који могу у свом активном месту сместити различите супстрате везане за GSH, па и глутатионилисане протеине. До сада је показано да GSTP1 учествује директно у процесу глутатионилације. Додатно, поређењем структура глутаредоксина и GSTO1-1 и GSTO2-2, уочена је велика структурна сличност, па се поставило питање да ли и GSTO1-1 и GSTO2-2 учествују у реакцијама деглутатионилације. Најновије истраживање Menon D. и сарадника управо то и показује, али иако GSTO1-1 и GSTO2-2 имају велику сличност у структури и исту функционалну групу у активном месту (остатак цистеина на позицији 32), GSTO2-2 не каталише реакције деглутатионилације, већ то ради само GSTO1-1 (Menon D. и Board PG, 2013) (слика 5).



Слика 5. Структура активних места GSTO1-1, GSTO2-2 и глутаредоксина (слика преузета из рада Menon D. и сар, 2013)

Недавно је показано да је глутатионилација важан начин регулације и великог броја апоптотских сигналних протеина и транскрипционих фактора. Наиме, глутатионилацијом или деглутатионилацијом протеина мења се њихова активност и

модулира апоптотски одговор. Тако је показано да истовремена глутатионилиција проапоптотског транскрипционог фактора, JNK и анти-апоптотског, NF-кВ, као и деглутатионилација каспаза представљају важан механизам у активацији одређених апоптотских сигналних путева (слика 6)



Слика 6. Глутатион и глутатионилација – кључни регулатори апоптозе?
(слика преузета из рада Franco S. и сар, 2009)

1.3.5.2 Регулација посттранслационе обраде интерлеукина 1 β

Интерлеукин 1 β (IL-1 β) је проинфламаторни медијатор, који продукују активирани моноцити и макрофаги. IL-1 β се не ослобађа конститутивно и захтева посттранслациону обраду пре него што се секретује. За превођење IL-1 β у активну форму величине 17 kDa неопходно је присуство каспазе-1, која и сама подлеже обради како би се превела у активну форму. Активација каспазе-1 је посредована виско молекуларним протеинским комплексима који се називају инфламазоми. У самом инфламазому је смештена и GSTO1-1, али је још увек нејасна њена функција. Оно што

је познато то је да је глутатионилација цистеинских остатака (Cys 397 и Cys 362) каспазе-1, инхибира овај ензим (Coll R. и сар, 2011). Узимајући у обзир новоописану каталитичку улогу GSTO1-1 у деглутатионилацији, може се претпоставити да би њена улога у инфламазому управо била активација каспазе-1. Штавише, Laliberte R. и сарадници (2003) су показали да се ефекат неколико лекова из групе диарилсулфонилурае (енг. *cytokine release inhibitory drugs, CRIDS*), који инхибирају посттранслациону обраду IL-1 β у активираним хуманим моноцитима, остварује управо везивањем за GSTO1-1 у моноцитима. Могли бисмо претпоставити да инхибиција GSTO1-1, осим каспазе-1, регулише активност и неких других протеина у инфламазому, чиме се сврстава у групу анти-инфламаторних мета са потенцијалним тераписким значајем.

Интерлеукин-1 β је укључен и у регулацију експресије интерлеукина-8 (IL-8). IL-8 је проинфламаторни СХС хемокин укључен у започињање неутрофилне хемотаксе и дегранулације. Овај хемокин активира вишеструке интрацелуларне сигналне путеве нисходно од два рецептора повезана са G протеином која се налазе на ћелијској мембрани (CXCR1 и CXCR2). Његову експресију, поред IL-1 β , регулише велики број различитих стимулуса, укључујући инфламаторне сигнале (нпр. TNF- α), хемотерапијске агенсе, хипоксију, као и стероидне хормоне (Waugh DJ. и сар, 2008).

Различите научне студије су показале да IL-8 учествује у процесу ангиогенезе, и да његова експресија корелира са метастатским потенцијалом карцинома простате, оваријума, желуца и мокраћне бешике (Inoue K. и сар, 2000). Шта више, Escobar-García DM. и сарадници (2012) су показали да је полиморфизам *GSTO1* A140D (rs 4925) повезан са појачаном експресијом гена који кодирају IL-8 и Araf-1 углавном код хетерозигота, док је други функционални *GSTO1* E208K полиморфизам (rs 7077635) био повезан са повишеном експресијом IL-8 и TGF- β гена.

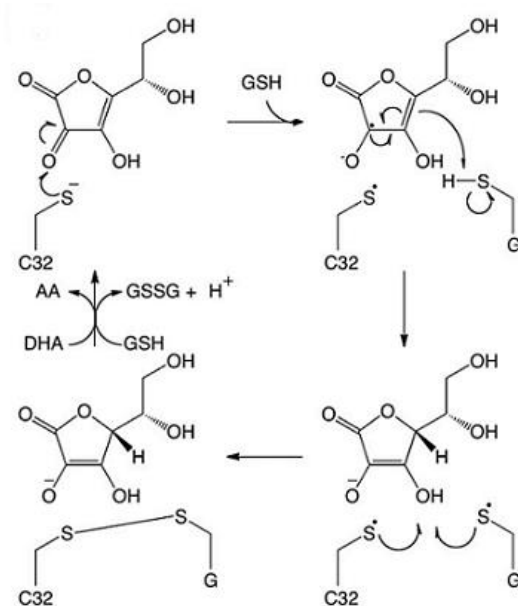
Ови резултати указују на значајну улогу коју GSTO1 има у инфламаторном одговору и апоптотским процесима.

1.3.5.3 Модулација калцијумских канала

Ријанодински рецептори (RyR) су класа Ca^{2+} јонских канала који се налазе на ендоплазматском ретикулуму глатких мишићних ћелија, немишићним ћелијама и на саркоплазматском ретикулуму попречно-пругастих мишића (Dulhunty AF. и сар, 2002; Meissner G. и сар, 2002). Улога ријанодинских рецептора је у ослобађању Ca^{2+} из интраћелијских депоа као одговор на различите стимулусе пореклом било из интраћелијског и/или екстраћелијског окружења. Три гена кодирају овај рецептор: „попречно-пругасти“ RyR1 је главни облик у скелетним мишићима, „срчани“ RyR2 је главна изоформа експримирана у срцу, док је RyR3 експримиран у другим ткивима. RyR су највећи до сада идентификовани јонски канали (Zhang J. и сар, 2003). Активност RyR модулирају различити лиганди и један број студија је показао да неколико GST протеина укључујући GSTO1-1, GSTA1-1, GSTM2-2 и CLIC-2 активирају RyR1 јонске канале у скелетним мишићима и инхибирају срчане RyR2 јонске канале (Dulhunty A. и сар, 2001; Board PG. и сар, 2004; Liu D. и сар, 2009). Ови ефекти су благи и GST модулира активност GST у оквиру физиолошких граница. Експериментом на липидном двослоју је показано да је ефекат који GST има на RyR реверзибилан. Брза реверзибилност указује да је ова веза GST и RyR слаба (Liu D. и сар, 2009). Показано је и да GSTO1-1 модулира ријанодински рецептор (Whitbread AK. и сар, 2005). Тачан механизам је непознат, али је значајно поменути да мутација којом се у активном месту ензима Cys-32 преводи у аланин поништава дејство које GSTO1-1 има на ријанодински рецептор. Мада се не зна тачна физиолошка улога овог дејства, претпоставља се да, с обзиром да је мишја GSTO1-1 појачано експримирана у ћелијској линији лимфома резистентној на радијацију, то може инхибирати апоптозу која се активира мобилизацијом Ca^{2+} кроз ријанодински рецептор (Whitbread AK. и сар, 2005). Слично, GSTO1-1 би могла штитити туморске ћелије од апоптозе настале мобилизацијом Ca^{2+} кроз ријанодински рецептор (Whitbread AK. и сар, 2005).

1.3.5.4 Регенерација дехидроаскорбата

GSTO1-1 и GSTO2-2 поред тиолтрансферазне поседују и дехидроаскорбат редуктазну (ДХАР) активност. Као што је већ претходно наведено, GSTO2-2 поседује значајно већу ДХАР активност у поређењу са GSTO1-1 и сматра се ензимом са најзначајнијом ДХАР активношћу. Самим тим, GSTO2-2 има кључну улогу у одржавању значајнијих концентрација аскорбинске киселине, нарочито у органима у којима је витамин С активно транспортује у форми дехидроаскорбата, а затим у ћелијама редукује до аскорбинске киселине (слика 7) (Zhou Н. и сар, 2012).



Слика 7. Предложени механизам дехидроаскорбат редуктазне активности GSTO2-2 (слика преузета из рада Zhou Н. и сар, 2012).

Аскорбинска киселина (витамин С) има важну улогу у борби против слободних кисеоничних радикала, а велике потребе мозга за кисеоником указују да у том органу мора постојати високо развијен систем за одбрану од слободних радикала како би се спречило оксидативно оштећење (Zhou Н. и сар, 2012). Такође, чини се да аскорбат који је у стакластом телу ока присутан у концентрацијама које су 20 пута веће него оне у

крви, има важну улогу у борби против хидроксил и супероксид анјона. Тиме је аскорбат укључен у превенцију оштећења катјонске пумпе сочива коју индукује UV радијација, као и у редукцији фотопероксидације у мембранама. Витамин С се активно транспортује у стакласто тело у својој оксидованој форми као дехидроаскорбат и даље се преводи до мање дифузибилне аскорбинске киселине, углавном у сочиву ока. Ензим дехидроаскорбат редуктаза, ензим укључен у редукцију и „рециклирање“ дехидроаскорбата на тај начин доприноси „ретенцији“ аскорбата у сочиву ока (Stamenkovic M. и сар, 2013).

На крају, узимајући у обзир бројне специфичне каталитичке и некаталитичке улоге ове класе, која се значајно разликују од осталих припадника цитосолне GST суперфамилије, као што су улоге у биотрансформацији арсена, деглутатионилацији (првенствено GSTO1-1), редукцији дехидроаскорбата (првенствено GSTO2-2), активацији проинфламаторног цитокина IL-1 β и модулацији ријанодинских рецептора на ендоплазматском ретикулуму, све се више указује на значај који ова класа има у процесима инфламације, апоптозе и настанку и прогресији различитих немалигних и малигних болести.

1.3.6 Значај глутатион трансфераза омега у карциному мокраћне бешике

У светлу података о значајној улози коју GSTO класе омега могу имати у регулацији редокс равнотеже у ћелијама, као и због чињенице да је поремећен баланс између редукованог и оксидованог стања кључних ћелијских молекула једно од фенотипских обележја карцинома мокраћне бешике, могуће је претпоставити да GSTO1 и GSTO2 протеини могу имати улогу у настанку и прогресији ових тумора.

Већина епидемиолошких студија које су испитивале ефекат GSTO1 rs4925 и GSTO2 rs156697 полиморфизама на ризик за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике, спроведена је на подручјима где су концентрације арсена у води за пиће изнад дозвољене границе. Међутим, добијени резултати су неконзистентни. Наиме, Wang и сарадници су показали модулирајући ефекат варијантног GSTO2*G/G

генотипа (полиморфизам rs2297235, који настаје као последица замене аденина (A) у гуанин (G) на позицији 183) код особа које живе на подручјама са високим концентрацијама арсена и при томе су биле професионално изложене неком хемијском канцерогену попут боје за косу, боје са кожу, одећу, фабричким бојама и пестицидима (Wang YH. и сар, 2009). С друге стране, Lesseur C. и сарадници су показали да су носици *GSTO2**G/G генотипа (полиморфизам rs156697) под повећаним ризиком за настанак карцинома мокраћне бешике неvezано од присуства арсена (Lesseur C. и сар, 2012). Насупрот томе, Chung CJ. и сарадници (2011) су проучавајући исту популациону групу као и Wang YH. и сарадници показали да је *GSTO2**G/G генотип инверзно повезан са ризиком за настанак карцинома мокраћне бешике у односу на носиоце оба референта алела и да је статистички значајно већи проценат монометиларсенитне киселине пронађен у носиоца *GSTO1**C/C генотипа. На основу наведених резултата, као и чињенице да *GSTO2* поседује дехидроаскорбат редуктазну активност, која може значајно доприносити антиоксидантној одбрани, недовољно је јасно да ли постоји веза између пушења као главног фактора ризика за настанак карцинома мокраћне бешике и полиморфне експресије припадника класе омега.

Поред могућности да модулирају ризик за настанак карцинома мокраћне бешике, *GSTO* класе омега могу значајно допринети напредовању ових тумора, утичући на капацитет ћелија за пролиферацију, али и на одговор на терапију. Наиме, досадашња истраживања су показала појачану експресију *GSTO1* у туморском ткиву попут карцинома панкреаса (Chen JH. и сар, 2009), а све више се указује на улогу *GSTO1-1* у резистенцији на хемиотерапијске агенсе. Наиме, према најновијим резултатима Piaggi S. и сарадника (2010), повећана експресија *GSTO1-1*, индукована трансфекцијом комплементарне ДНК у HeLa ћелијама, које иначе ниско експримирају овај протеин, је као последицу имала резистенцију на цисплатину. Иако тачан молекулски механизам резистенције није потпуно расветљен, верује се да је повећана експресија *GSTO1-1* удружена са активацијом сигналних путева укључених у преживљавање/пролиферацију (Akt и ERK1/2) и инхибицијом апоптог пута посредованог JNK1-MAPK сигналном каскадом.

Постоји само један мањи број истраживања чији је предмет рада било изучавање везе која постоји између оксидативних оштећења и карцинома мокраћне бешике. Коришћењем имуноцитохемијских анализа, Soini Y. и сарадници (2011) су показали да је ниво нитротирозина, показатеља оксидативног оштећења протеина и 8-хидроксидеооксигуанозина (8-OHdG), који је поуздан показатељ оксидативног оштећења ДНК, у туморском ткиву мокраћне бешике повезана са лошом прогнозом код ових пацијената (Soini Y. и сар, 2011). У раду Savic-Radojevic A. и сарадника (2013) је показано да је концентрација уринарног 8-OHdG била статистички виша код болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике који су били носиоци GSTM1-нултог генотипа у односу на носиоце GSTM1-активног генотипа, али није уочена статистички значајна разлика у концентрацији 8-OHdG код болесника са GSTA1 генотипом смањене активности у односу носиоце активнијег GSTA1 генотипа. Најизраженији ефекат у промени концентрације 8-OHdG је уочен код болесника који су истовремено били носиоци GSTM1-нултог генотипа и GSTA1 генотипа смањене активности. Код ових пацијената уринарна екскреција 8-OHdG је била два пута већа у односу на екскрецију код пацијената носиоца у потпуности активних GSTM1 и GSTA1 генотипова. Ови резултати су у сагласности са резултатим других истраживачких група који говоре о значају 8-OHdG као потенцијалног биомаркера ризика и прогнозе у неколико солидних тумора, укључујући тумор дојке и ситноћелијски тумор плућа (Matsui A. и сар, 2000; Shen J. и сар, 2007).

С обзиром да у настанку карцинома прелазног епитела мокраћне бешике веома значајну улогу има изложеност дуванском диму, веома је важно испитати утицај генског полиморфизма ензима омега класе GST, који су укључени у антиоксидативну одбрану и регулацију редокс равнотеже, на предиспозицију за настанак овог тумора. Поред тога, требало би испитати и повезаност експресије и активности GSTO са малигним фенотипом карцинома мокраћне бешике. У том смислу, функционални полиморфизми, описани у овој класи, могу утицати и на разлике у индивидуалном капацитету за биотрансформацију цитостатика који се користе у терапији карцинома мокраћне бешике.

2 ЦИЉЕВИ:

Овај рад има за циљ да:

1. Испита да ли постоји утицај генског полиморфизма *GSTO1* rs 4925 и *GSTO2* rs156697 на ризик за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике, као и да ли постоји удружени ефекат генотипа и пушења и/или изложености професионалним хемијским канцерогенима
2. Покаже да ли полиморфна експресија GST протеина класе омега има прогностички значај код болесника са инвазивним карциномима мокраћне бешике лечених хемотерапијом
3. Одреди да ли постоји промена експресије и активности GSTO у карциному прелазног епитела мокраћне бешике у односу на околно ткиво које није захваћено тумором
4. Установи да ли постоји веза између експресије и активности GSTO класе и малигног фенотипа карцинома мокраћне бешике

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 ИСПИТАНИЦИ

За одређивање полиморфизама *GSTO* изведена је студија случајева и контрола (engl. *case – control study*), у коју је било укључено 187 болесника (142 мушкарца и 45 жена, просечна старост $63,13 \pm 10,41$ година) са хистопатолошки потврђеном дијагнозом карцинома прелазног епитела мокраћне бешике који су били лечени на Клиници за урологију Клиничког центра Србије у Београду. Контролну групу је чинило 140 болесника (105 мушкараца и 35 жена, просечне старости $62,16 \pm 7,51$ година) који су у истом периоду примљени у ову установу због нефролитијазе, без верификованог малигног обољења. Критеријуми за укључивање су били новодијагностиковани болесници који пре почетка испитивања нису добијали хемотерапију. Услов за искључивање из истраживања је била жеља испитаника да више не учествују у истраживању.

За утврђивање да ли постоји веза између полиморфне експресија GST протеина класе омега и прогностичког значаја код болесника са инвазивним карциномима мокраћне бешике праћен је 101 болесник са инвазивним карциномом мокраћне бешике (77 мушкарца и 24 жене, просечне старости $64,04 \pm 9,37$ година) са хистопатолошки потврђеном дијагнозом карцинома прелазног епитела мокраћне бешике који су били лечени на Клиници за урологију Клиничког центра Србије у Београду. Праћење пацијената је отпочело оног тренутка кад им је дијагностикован карцином прелазног епитела мокраћне бешике и трајало до тренутка смрти болесника или до новембра 2012. године. Болесници су примали неoadјувантну *MVAC* терапију (метотрексат, винбластин, доксорубицин, цисплатина) или комбинацију гемцитабин и цисплатина (*GC/Cis*). *MVAC* терапију су примали следећим редоследом: метотрексат и винбластин 1, 8. и 15. дана, доксорубицин и цисплатина, 2. дана. Циклуси су понављани сваке две недеље. *GC/Cis* комбинацију су примали следећим редоследом: гемцитабин 1, 8. и 15. дана, а цисплатина 1. дана. Циклуси су понављани сваке две недеље. Клиничке,

хематолошке и биохемијске провере су рађене пре сваког циклуса хемотерапије. Критеријуми за искључивање са хемотерапије су били ослабљена бубрежна функција, вредности хемоглобина испод 100 mg/L, број леукоцита испод 3000 ћелија/ml и број тромбоцита испод 100000 ћелија/ml.

За одређивање нивоа експресије и активности GSTO истраживањем је обухваћено 50 болесника, који су због карцинома мокраћне бешике бити подвргнути оперативном лечењу трансуретралном ресекцијом или радикалном цистектомијом на Клиници за урологију Клиничког центра Србије, при чему су узорци околног нетуморског ткива бити доступни само за болеснике који су подвргнути радикалној цистектомији. Патохистолошка анализа карцинома прелазног епитела мокраћне бешике је изведена на основу стадијума болести коришћењем TNM клиничке класификације предложене од стране Интернационалне уније за борбу против рака (UICC) и патохистолошке класификације на основу степена малигнитета Светске здравствене организације (WHO). На основу цистоскопије, ТУР-а, и патохистолошког налаза, узорци су подељени у групу неинвазивних и инвазивних тумора.

Болесници од којих је узиман биолошки материјал, као и лични подаци, су потписали пристанак да су обавештени о циљевима и очекиваним исходима студије. Студија је урађена у складу са етичким стандардима датим у Хелсиншкој декларацији (према ревидираној верзији из 1983. године) и у складу са правилима Етичког комитета Медицинског факултета у Београду.

За прикупљање података о изложености претпостављеним срединским факторима ризика за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике, коришћен је структурисани епидемиолошки упитник направљен на Институту за епидемиологију Медицинског факултета у Београду, у циљу испитивања фактора ризика за настанак малигних болести. Овај упитник је претходно валидиран коришћењем одговарајућих процедура. Упитник је садржао питања о старости, полу, месту рођења и становања, пушењу, дужини пушачког стажа и професионалне изложености.

3.2 ОДРЕЂИВАЊЕ ГЕНСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА GST ОМЕГА КЛАСЕ

Полиморфизам једног нуклеотида (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) *GSTO1* и *GSTO2* гена је одређиван анализом производа рестрикционе дигестије ДНК фрагмената насталих реакцијом ланчаног умножавања (енгл. *polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP) (Табела 2). ДНК која је коришћена за PCR анализе је из узорака пуне крви која је узета у вакутајнере са EDTA. Узорци пуне крви су аликвотирани и до извиђења PCR анализа чувани на -20°C.

3.2.1 *Изолација деоксирибонуклеинске киселине (ДНК)*

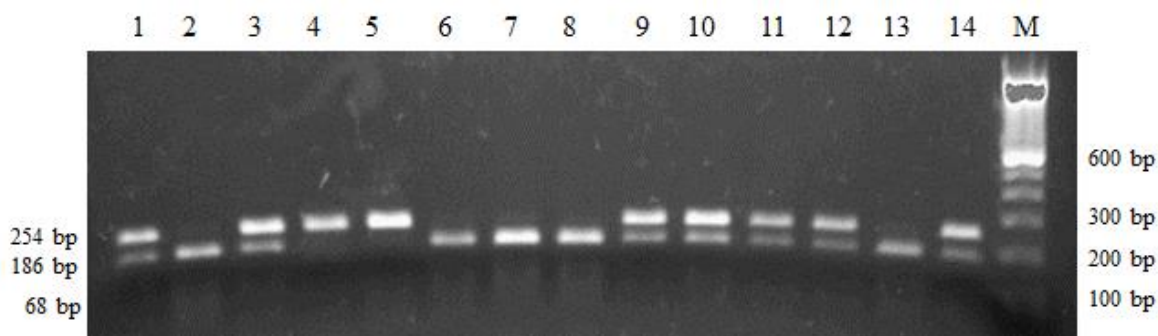
ДНК је изолована из периферне крви коришћењем *QIAGEN QIAmp* кита (*Qiagen Inc., Valencia, CA, USA*). Овом методом лизирају се мембране леукоцита у раствору детергента, а хистони и остали протеини везани за ДНК се уклањају ензимском дигестијом деловањем протеиназе К. Резултат је слободна ДНК, ослобођена од протеина, нуклеаза и осталих контаминаната који могу да ометају PCR реакцију. Добијени лизат се преноси у мини спин колоне у којима се налази силиконска гел мембрана која селективно везује ДНК. Остаток лизата се потом испира коришћењем серије пуфера који садрже соли и етанол. ДНК се на крају испира са колоне и чува на -20°C до извођења PCR реакција.

Табела 2. Секвенца почетница и рестрикциони ензими за одређивање полиморфизма *GSTO1* и *GSTO2* гена.

Ген	Секвенца почетница (5'-3')	Полиморфизам	Температура припајања (°C)	Ензим
<i>GSTO1</i>	F: GAACTTGATGCACCCTTGGT R: TGATAGCTAGGAGAAATAATTAC	SNP-rs4925	60°C	Sac8I
<i>GSTO2</i>	F: AGGCAGAACAGGAACTGGAA R: GAGGGACCCCTTTTGTACC	SNP-rs156697	60°C	MboI

3.2.2 Одређивање *GSTO1* полиморфизма

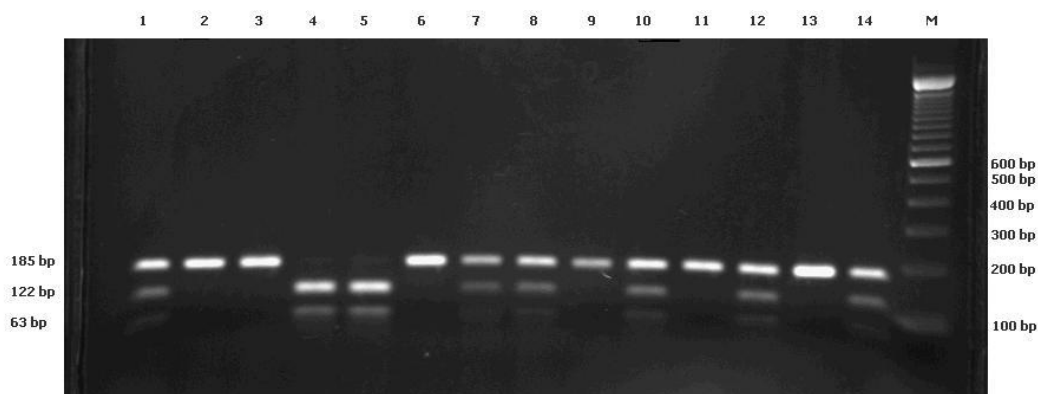
Полиморфизам једног нуклеотида *GSTO1*-C419A, rs4925 је одређиван анализом производа рестрикционе дигестије ДНК фрагмената насталих реакцијом ланчаног умножавања (енгл. *PCR - restriction fragment length polymorphism (RFLP)*) са *CacI8* ензимом (*New England Biolabs*, Масачусетс, САД) (Marahatta SB. и сар, 2006). PCR реакциона смеша је инкубирана и иницијално денатурирана на 94°C у трајању од 5 минута. Затим је уследила серија од 31 циклуса у којима су понављана наредна три корака: денатурација (94°C, 1 минут), припајање прајмера (60°C, 1 минут) и екстензија прајмера (72°C, 1 минут). Након последњег циклуса, финална екстензија на 72°C је трајала 5 минута. Успешност PCR амплификације проверавана је електрофорезом на 2% агарозном гелу. Инкубација PCR производа и *CacI8* ензима се одвијала на 37°C током 16h (преко ноћи). Након инкубације, успешност рестрикционе дигестије је проверавана електрофорезом на 2% гелу на 125 V, 0,27 A и 50 W. Присуство траке величине 186bp+68bp је указивало на *wild-type GSTO1**C/C генотип, док је присуство трака величине 254bp+186bp+68bp указивало на *GSTO1**C/A генотип, односно присуство траке 254bp на *GSTO1**A/A генотип.



Слика 8. Анализа генских варијанти *GSTO1* методом PCR-RFLP. М – маркер молекулске величине (број базних парова). Траке 2, 6, 7, 8 и 13 показују траке величине 186bp+68bp, односно присуство *GSTO1**C/C генотипа. Траке 1, 3, 9, 10, 11, 12 и 14 показују присуство три траке величине 254bp+186bp+68bp bp, односно присуство *GSTO1**C/A генотипа. Траке 4 и 5 показују присуство траке величине 254 bp, односно присуство *GSTO1**A/A генотипа

3.2.3 Одређивање *GSTO2* полиморфизма

Полиморфизам једног нуклеотида *GSTO2*–*A424G*, rs156697 је одређиван анализом производа рестрикционе дигестије ДНК фрагмената насталих реакцијом ланчаног умножавања (енгл. *PCR - restriction fragment lenght polymorphism (RFLP)*) са *MboI* ензимом (*Thermo Fisher Scientific*, Масачусетс, САД) (Marahatta SB. и сар, 2006). *PCR* реакциона смеша је инкубирана и иницијално денатурирана на 94°C у трајању од 5 минута. Затим је уследила серија од 31 циклуса у којима су понављана наредна три корака: денатурација (94°C, 1 минут), припајање прајмера (60°C, 1 минут) и екстензија прајмера (72°C, 1 минут). Након последњег циклуса, финална екстензија на 72°C је трајала 5 минута. Успешност *PCR* амплификације проверавана је електрофорезом на 2% агарозном гелу. Инкубација *PCR* производа и *MboI* ензимом се одвијала на 37°C током 16h (преко ноћи). Након инкубације, успешност рестрикционе дигестије је проверавана електрофорезом на 2% гелу на 125 V, 0,27 A и 50 W. Присуство траке величине 185bp указивало је на *wild-type GSTO2**A/A генотип, док је присуство трака величине 185bp+122bp+63bp указивало на *GSTO2**A/G генотип, односно присуство трака 122bp+63bp на *GSTO2**G/G генотип.



Слика 9. Анализа генских варијанти *GSTO2* методом *PCR-RFLP*. М – маркер молекулске величине (број базних парова). Траке 2, 3, 6, 9, 11 и 13 показују траку величине 185 bp, односно присуство *GSTO2**A/A генотипа. Траке 1, 7, 8, 10, 12 и 14 показују присуство три траке величине 185, 122 и 63 bp, односно присуство *GSTO2**A/G генотипа. Траке 4 и 5 показују присуство две траке величине 122 и 63 bp, односно присуство *GSTO2**G/G генотипа.

3.3 ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ *GSTO1* НА НИВОУ иРНК

3.3.1 *Изолација РНК*

Укупна РНК је изолована из ткива мокраћне бешике коришћењем TRIZOL®-а (*Invitrogen, Carlsbad*, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе) према упутству произвођача.

3.3.2 *Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR)*

1 μ г РНК, одређен читањем оптичке густине на 260 nm, је реверзно преписана коришћењем реверзне транскриптазе из *Moloney Murine Leukemia* вируса (*RevertAid™ H Minus M-MuLV RT, Fermentas*, Вилниус, Литванија) са случајним хексамерима (*Fermentas*) следећи упутство произвођача. Овако припремљена сДНК су умножене коришћењем *TaqMan Universal PCR Master Mix (Perkin Elmer/Applied Biosystems Foster City*, Калифорнија, САД) у укупном волумену од 20 μ л у *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)*. Добијени подаци су анализирани коришћењем SDS 2.1 софтвера (*Applied Biosystems*). Секвенца PCR почетница за детекцију *GSTO1* су биле следеће: *GSTO1 forward* почетница 5'-CCT CAT CTG GCC CTG GTT T-3'; *GSTO1- reverse* почетница 5'-CAG TTT CAG TTT TGG AGT GTG GTC TA-3'. Хумани 18S ген је коришћен као ендогена контрола нормализације узорка. Резултати су приказани релативно у односу на експресију 18S. Акумулација PCR производа је детектована у реалном времену.

3.4 ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ *GSTO1* НА НИВОУ ПРОТЕИНА

3.4.1 *Припрема цитосола ткива мокраћне бешике*

Туморско ткиво мокраћне бешике је хомогенизовано на леду у четири волумена 50 mmol/L Tris-HCl пуфера pH 7,8, садржи 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, протеазни

инхибиторни коктел (енгл. *protease inhibitor cocktail*, PIC) и натријум флуорид (NaF). Хомогенат је центрифугиран 15 min на 3000 rpm на температури од + 4°C. Добијени супернатант је затим центрифугиран 60 минута на 36100 rpm на температури од + 4°C. Цитосол који је добијен на овај начин је коришћен као полазни материјал за одређивање ензимске активности и имуноблот.

Концентрација протеина у цитосолу ткива мокраћне бешике је одређивана по методи Брадфордове (1976). За припрему стандардне криве коришћен је албумин из говеђег серума (*Bovine serum albumine-BSA*).

3.4.2 Имуноблот

За електрофоретско раздвајање GSTO1-1 коришћена је метода Лемлија (Laemmli, 1970). По завршеној електрофорези при константном напону од 100 V, раздвојени протеини су преношени на мембрану методом влажног трансфера по методи Тобина и сарадника (Towbin, 1979). Имунолошка детекција протеина имобилисаних на мембрани извршена је примарним мишјим моноклонским anti-GSTO1-1 антителом (Абкам, Кембриџ, Уједињено Краљевство Велики Британије и Северне Ирске) у разблажењу 1:500. Као секундарно антитело коришћено је гушчје анти-мишје антитело (Дако, Глоструп, Данска) у разблажењу 1:2000. Места везивања специфичних антитела детектована су у присуству хемилуминисцентног супстрата (енгл. *kit ECL Western blotting analysis system, GE Healthcare/Amersham*) и визуализована у виду расветљења на рендген филму (*Hyperfilm, Amersham*). Све мембране су инкубирани са примарним анти-актин антителом (Сент Луис, Мисури, Сједињене Америчке Државе) како би се проверило да ли је на све мембране нанета једнака количина протеина. Рендген филмови су скенирани и дензитометријска нализа урађена коришћењем програма ImageQuant 5.2 (*GE Healthcare, Бакингемшир, Уједињено Краљевство Велики Британије и Северне Ирске*).

3.5 ОДРЕЂИВАЊЕ ТИОЛТРАНСФЕРАЗНЕ АКТИВНОСТИ

Тиолтрансферазна активност GSTO је мерена спектрофотометријски са хидроксиетилдисулфидом (HEDS) као супстратом (Whitbread AK. и сар, 2005). У реакционој смеши од 1ml је било 0,3mM никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH), 1 mM глутатион (GSH), 50 U/ ml глутатион редуктазе, 0,1 mg/ml BSA, 1,5 mM EDTA, 0,75 mM 2- хидроксиетилдисулфид и 0,1 M Tris HCl, pH 8,0. Оваква смеша је инкубирана на 30°C у трајању 3 min како би се формирали HEDS-GSH мешовити дисулфиди и редуктовао присутни оксидовани глутатион (GSSG) до GSH. Реакција је започета додавањем 50µL цитосола ткива мокраћне бешике и промена апсорбанце мерена на 340 nm. Специфична активност је израчуната коришћењем екстинкционог коефицијента од 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ и изражена као mU/mg протеина.

3.6 ОДРЕЂИВАЊЕ УКУПНЕ S-ГЛУТАТИОНИЛАЦИЈЕ

3.6.1 Припрема цитосола ткива мокраћне бешике

Туморско ткиво мокраћне бешике је хомогенизовано на леду у четири волумена RIPA (енгл. *radioimmunoprecipitation assay*) пуфера који је садржао протеазни инхибиторни коктел (PIC) и NEM (N-етилмалеимид). Хомогенат је центрифугиран 15 min на 3000 rpm на температури од + 4°C. Добијенти супернатант је затим центрифугиран 60 минута на 36100 rpm на температури од + 4°C.

3.6.2 Имуноблот

За одређивање укупне S-глутатионилације у нетуморским и туморским узорцима, коришћен је цитосол добијен у горе наведеном поступку хомогенизације. За електрофоретско раздвајање протеина коришћена је метода Лемлија (Laemmli и сар, 1970) рађена у нередукујућим условима. По завршеној електрофорези при

константном напону од 100 V, раздвојени протеини су преношени на мембрану методом влажног трансфера по методи Тобина и сарадника (Towbin, 1979). Имунолошка детекција протеина имобилисаних на мембрани извршена је примарним мишјим моноклонским анти-глутатионским антителом (Абкам, Кембриџ, Уједињено Краљевство Велики Британије и Северне Ирске) у разблажењу 1:500. Као секундарно антитело коришћено је гушчје анти-мишје антитело (Дако, Глоstrup, Данска) у разблажењу 1:2000. Места везивања специфичних антитела детектована су у присуству хемилуминисцентног супстрата (енгл. *kit ECL Western blotting analysis system, GE Healthcare/Amersham*) и визуализована у виду расветљења на рендген филму (*Hyperfilm, Amersham*).

3.7 ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ УКУПНОГ И ОКСИДОВАНОГ ГЛУТАТИОНА

3.7.1 Припрема ткива мокраћне бешике

Туморско ткиво мокраћне бешике је хомогенизовано на леду у пет волумена 5`-сулфосалицилне киселине (10%, w/v). Хомогенат је центрифугиран 20 min на 3000 g (4°C). Добијени супернатант је затим коришћен за одређивање концентрације укупног и оксидованог глутатиона.

3.7.2 Одређивање концентрације укупног и оксидованог глутатиона

Интрацелуларни оксидовани (GSSG) и укупни глутатион (GSH) су одређени спектрофотометријски (Ravindranath V, 1994). За мерење концентрације укупног GSH (GSH+GSSG), узорак је инкубиран у 1 ml натријум фосфатног пуфера који је садржао 0.6 mM 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензојеву киселину) (DTNB) и 1 U/ml GSH редуктазу. Реакција је отпочињала додавањем 1.2 mM NADPH и мерена је промена апсорбанце на таласној дужини од 412 nm. Концентрација укупног глутатиона је одређивана

коришћењем GSH стандардне криве. За одређивање GSSG, коришћен је исти метод након што је додавањем 2-винилпиридина уклоњен редуковани GSH (Ravindranath V, 1994). За одређивање концентрације оксидованог глутатиона коришћена је GSSG стандардна крива. Концентрација редукованог глутатиона је добијена одузимањем концентрације оксидованог глутатиона од концентрације укупног глутатиона и изражена у nmol/mg протеина.

3.8 ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ ЦИТОСОЛНОГ ИНТЕРЛЕУКИНА-8 (IL-8) И УРИНАРНОГ 8-ХИДРОКСИ-2'-ДЕОКСИГУАНОЗИНА (8-OHdG)

Експресија IL-8 у узорцима цитосола је одређивана у цитосолној фракцији ткива пацијената са карциномом мокраћне бешике и одговарајућој контролној групи. Узорци су били центрифугирани, аликвотирани и чувани на -80°C до извођења анализа. Експресија IL-8 је одређивана ензимским имуноесејом (енгл. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) (Invitrogen, Камарило, Калифорнија, САД). Укратко, 50 μl узорка/стандарда је наносено на микротитарску плочу. Затим је додаван биотинилисани анти IL-8 коњугат. Узорци су даље били инкубирани на собној температури у трајању од 90 минута и опрани пуферованим физиолошким раствором. Следећи корак је било наношење секундарног антитета обележено пероксидазом, и узорци су овако били инкубирани 30 минута на собној температури и опрани пуферованим физиолошким раствором. Уследећем кораку, додаван је 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и инкубација је трајала 30 минута на собној температури. Реакција је била прекинута додавањем раствора за прекидање реакције који је био комерцијално обезбеђен. Апсорбанца је читана на 450 nm. За сваки сет мерења конструисана је калибрациона крива коришћењем шест стандардних раствора IL-8. Резултати су били изражени као pg/mg протеина.

Концентрација 8-хидрокси-2'-деоксигуанозина је одређивана у узорку урина пацијената са карциномом мокраћне бешике. Узорци су били центрифугирани, аликвотирани и чувани на -80°C до извођења анализа. Концентрација 8-OHdG је

одређивана ензимским имуноесејом (*Bioxytech 8-OHdG-EIA; Oxis Research*, Портланд, Орегон, САД). Укратко, 50 μ l примарног моноклонског антитела и 50 μ l узорка/стандарда је наносено на микротитарско плочу која је претходно обложена 8-OHdG. Узорци су даље били инкубирани на 37 °C у трајању од једног сата и опрани пуферованим физиолошким раствором. Затим је додавано секундарно антитело обележено пероксидазом, и узорци су овако били инкубирани на 37 °C у трајању од једног сата и опрани пуферованим физиолошким раствором. Уследећем кораку, додаван је 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и инкубација је трајала 1 сат на 37 °C. Реакција је била прекинута додавањем 1 М фосфорне киселине. Апсорбанца је читана на 450 nm. За сваки сет мерења конструисана је калибрациона крива коришћењем шест стандардних раствора 8-OHdG. Резултати су били стандардизовани према концентрацији креатинина и изражени као ng/mg креатинина.

3.9 СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Статистичка анализа је урађена коришћењем Статистичког пакета за друштвене науке (енгл. *Statistical Package for the Social Sciences*) (SPSS, верзија 17.0; *SPSS Inc*, Чикаго, Илиноис, САД). Дистрибуције фреквенција демографских карактеристика и наводних фактора ризика за настанак карцинома мокраћне бешике као што су старост, пол, пушење и професионална изложеност су одређиване код болесника са карциномом мокраћне бешике и одговарајуће контролне групе. Статистичка анализа се састојала из примене χ^2 testa за категоричке варијабле и Студентовог t-теста за континулане варијабле за процену значајности разлике у фреквенцији добијених резултата између испитиваних болесника и контролне групе. Статистичка анализа је укључивала, поред дескриптивне статистике, процену да ли се одговарајући генотипови налазе у Харди-Вајнберговој равнотежи и примену χ^2 testa за детерминисање значајности разлике у фреквенцији добијених генотипова између припадника студијске и контролне групе. Ефекти генског полиморфизма и ризика за настанак карцинома мокраћне бешике су процењивани помоћу принципа логистичке

регресије који су коришћени за рачунање OR (енгл. *odds ratio*) са интервалом поверења (енгл. *confidence interval*, CI) од 95% (CI 95%). На основу дистрибуције наших података и претходног знања о карциному мокраћне бешике кориговали смо резултате у односу на пол, старост, пушење и професионалну изложеност због потенцијалног ефекта у мултиваријантном логистичком регресионом моделу. Примењена је Бонферони пост-хок корекција.

Неравнотежа везаности (енгл. *linkage disequilibrium*, LD) између парова полиморфизма једног нуклеотида је процењиван коришћењем SNPStats. Јачина неравнотеже везаности је изражена као $D' = D/D_{max}$. Индивидуални хаплотип и његове фреквенције су процењивани коришћењем EM алгоритма из *haplo.stats* пакета.

Преживљавање болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике је анализирано укупно и само у групи болесника који су примали хемотерапију применом Каплан-Мајер теста за процену кумулативне вероватноће преживљавања. Предиктивна вредност различитих *GSTO* генотипова је процењивана Кокс регресионим моделом контролисано за конфаундинг променљиве у два модела. У Моделу 1, контролисано је за старост и пол, а у Моделу 2 за старост, пол и градус тумора. Ефекти генског полиморфизма и ризика за настанак смртног исхода од карцинома мокраћне бешике су представљени као *hazard ratios* (HR) са интервалом поверења од 95% (CI 95%).

За испитивање постојања статистички значајних разлика у активности глутатион трансферазе класе омега, затим експресије IL-8 и 8-OHdG, као и концентрације оксидованог и редукованог глутатиона у туморском и околном нетуморском ткиву као и у туморском ткиву различитог степена малигнитета примењен је Студентов t тест, Ман-Витни и Краскал-Волис тест.

P вредност <0.05 је сматрана статистички значајном.

4 РЕЗУЛТАТИ

У циљу расветљавања улоге глутатион трансфераза класе омега у процени ризика за настанак карцинома мокраћне бешике, одређиван је генски полиморфизам *GSTO1* и *GSTO2* и анализиран удружени ефекат испитиваних генотипова и познатих фактора ризика, пушења и изложености професионалним хемијским канцерогенима. Прогностички значај полиморфизама ових ензима је процењиван на основу петогодишњег преживљавања у групи болесника са инвазивним карциномима мокраћне бешике. Поред тога, испитивана је веза експресије *GSTO1-1* и малигног фенотипа тумора мокраћне бешике на основу одређивања експресије и тиолтрансферазне активности ензима у туморском и околном морфолошки неизмењеном нетуморском ткиву. Због потенцијалног значаја *GSTO1-1* у регулацији глутатионилације, редокс сензитивне посттратранслационе модификације протеина, у туморском и околном морфолошки неизмењеном нетуморском ткиву је одређивана укупна глутатионилација протеина, заједно са садржајем глутатиона.

4.1 ЗНАЧАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗА КЛАСЕ ОМЕГА У ПРОЦЕНИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРЦИНОМА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ

Генски полиморфизми глутатион трансфераза класе омега, *GSTO1Ala140Asp* (rs 4925) и *GSTO2Asn142Asp* (rs156697) су одређивани у 187 болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике и 140 испитаника контролне групе.

4.1.1 Демографске и клиничке карактеристике болесника са карциномом мокраћне бешике и контрола

Демографске и клиничке карактеристике контрола и болесника са карциномом мокраћне бешике су приказане у табели 3.

Табела 3. Демографске и клиничке карактеристике контрола и болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике

	Болесници <i>n</i> = 187	Контроле <i>n</i> =140	OR (95% CI)	<i>p</i>
Старост ($\bar{X} \pm SD$)	63,13 \pm 10,41	62,16 \pm 7,51		0,328
Пол				
Мушки, <i>n</i> (%)	142 (76)	105 (75)		
Женски, <i>n</i> (%)	45 (24)	35 (25)		0,846
Пушење				
Не, <i>n</i> (%)	46 (25)	60 (43)	1,0 ^a	
Да, <i>n</i> (%)	141 (75)	80 (57)	2,6 (1,6 - 4,3)	0,001
Број паклица/год.*				
0, <i>n</i> (%)	46 (25)	59 (42)	1,0 ^a	
1-29, <i>n</i> (%)	49 (26)	24 (17)	3,0 (1,6 – 5,8)	0,001
≥ 30 , <i>n</i> (%)	92 (49)	57 (41)	2,2 (1,3 – 3,8)	0,004
Професионална Изложеност				
Не, <i>n</i> (%)	106 (57)	106 (76)	1,0 ^b	
Да, <i>n</i> (%)	81 (43)	34 (24)	2,4 (1,5 – 3,9)	0,001
Хемотерапија				
Не, <i>n</i> (%)	136 (73)			
Да, <i>n</i> (%)	51 (27)			

* паклица *x* године пушачког стажа (енгл. *packyears*, број цигарета дневно *x* дужина пушења у годинама)/20, односно 1 паклица по години је 20 попушених цигарета дневно током једне године)

^a Кориговано у односу на старост, пол и професионалну изложеност, ^b Кориговано у односу на старост, пол и пушење

OR (енгл. *odds ratio*), однос шанси претходне изложености код случајева (присутан догађај од интереса) и контрола (одсутан догађај од интереса)

CI (енгл. *confidence interval*), интервал поверења

Контролну групу чинило је 105 мушкараца и 35 жена, а групу болесника 142 мушкарца и 45 жена. Просечна старост у контролној групи је била $62,16 \pm 7,51$ година, док је просечна старост болесника са карциномом мокраћне бешике била $63,13 \pm 10,41$ година.

Из приказаних резултата се види да није било значајне разлике између контролне групе и болесника са карциномом мокраћне бешике у погледу полне дистрибуције и старости. Узимајући у обзир да пушење и професионална изложеност хемијским канцерогенима представљају најзначајније факторе ризика за настанак овог карцинома, резултати значајно веће процентуалне заступљености пушача и професионалне изложености канцерогенима у групи болесника (75% и 43%) у поређењу са контролном групом (57% и 24%) су у складу са подацима из литературе. Штавише, након корекције у односу на старост, пол и професионалну изложеност, показано је да је постоји 2,6 пута већи ризик за настанак карцинома мокраћне бешике код пушача (95%CI=1,6-4,3; $p=0,001$). Такође, болесници који су били професионално изложени хемијским канцерогенима су имали значајно већи ризик за настанак овог карцинома (OR=2,4, 95%CI=1,5-3,9; $p=0,001$).

4.1.2 Повезаност полиморфизама *GSTO1* rs4925 и *GSTO2* rs156697 са ризиком за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике

Учесталост појединих *GSTO1* и *GSTO2* генотипова код болесника и контрола је приказана на табели 4. За оба одређивана полиморфизма, најчешће присутан алел је сматран референтним, док је алел чија је процентуална заступљеност била мања, сматран варијантним алелом. У контролној групи фреквенције генотипова за *GSTO1* и *GSTO2* су биле у Харди-Вајнберговој равнотежи ($p=0,066$ и $p=0,510$, редом).

Из приказаних резултата учесталости појединих *GSTO1* генотипова, може се уочити да је у контролној групи *GSTO1**C/C генотип имало 38% испитаника, 53% *GSTO1**C/A и 9% испитаника *GSTO1**A/A генотип.

Табела 4. Учесталост појединих *GSTO1* и *GSTO2* генотипова и ризик за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике

Генотип	Болесници <i>n</i> (%)	Контроле <i>n</i> (%)	OR (95% CI) ^a	P
<i>GSTO1</i> rs4925				
*CC (референтни)	82 (44)	54 (38)	1,0	
*CA (хетерозигот)	87 (46)	74 (53)	0,8 (0,5 – 1,3)	
*AA (варијантни)	18 (10)	12 (9)	1,3 (0,6 – 3,1)	0,450
<i>GSTO2</i> rs156697 ^b				
*AA (референтни)	85 (47)	79 (56)	1,0	
*AG (хетерозигот)	69 (38)	50 (36)	1,4 (0,8 – 2,4)	
*GG (варијантни)	28 (15)	11 (8)	2,6 (1,2 – 5,8)	0,041
Комбиновани <i>GSTO1/GSTO2</i> ^c				
*CC+*CA / *AA+*AG	142 (78)	122 (87)	1,0	
*CC+*CA / *GG	22 (12)	6 (4)	3,0 (1,2-7,9)	0,025
*AA / *AA+*AG	12 (7)	7 (5)	1,9 (0,7-5,5)	0,208
*AA / *GG	6 (3)	5 (4)	1,4 (0,4-5,0)	0,609

^aКориговано за старост, пол, пушење и професионалну изложеност; ^b За *GSTO2*, генотипизација је успела код 182 од 187 болесника; ^c Значајност од $p \leq 0,025$ након Бонферони корекције

OR (енгл. *odds ratio*), однос шанси претходне изложености код случајева (присутан догађај од интереса) и контрола (одсутан догађај од интереса);

CI (енгл. *confidence interval*), интервал поверења

Између контролне групе и болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике није било значајне разлика у учесталости појединих *GSTO1* генотипова. Наиме, у студијској групи 44% болесника имало је *GSTO1**C/C генотип, 46% *GSTO1**C/A и 10% болесника *GSTO1**A/A генотип.

Уочена је разлика у учесталости појединих *GSTO2* генотипова код контролне групе и групе болесника са карциномом мокраћне бешике. У контролној групи 56% испитаника су имали *GSTO2**A/A генотип, 36% је било са *GSTO2**A/G и 8% испитаника са *GSTO1**G/G генотипом. У студијској групи 47% болесника је имало *GSTO2**A/A генотип, 38% је имало *GSTO2**A/G и 15% болесника са *GSTO2**G/G генотипом.

GSTO1 полиморфизам није утицао на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике (OR=1,3, 95%CI=0,6-3,1; p=0,450). С друге стране, особе носиоци оба варијантна *GSTO2* алела (*G/G) су имали 2,6 пута већи ризик за настанак карцинома мокраћне бешике у односу на носиоце *GSTO2**A/A генотипа (95%CI=1,2-5,8; p=0,041).

Такође, испитивали смо и комбиновани ефекат *GSTO1* и *GSTO2* генотипова на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике. Занимљиво је да је модулирајући ефекат варијантног *GSTO2* генотипа био израженији уколико је био удружен са најмање једном копијом референтног *GSTO1* алела (*C/C или *C/A) и код таквих болесника је ризик за настанак карциномом мокраћне бешике био чак 3 пута већи у односу на носиоце *GSTO1**C/C или *GSTO1**C/A и *GSTO2**A/A или *GSTO2**A/G генотипа (OR=3,0, 95%CI=1,2-7,9; p=0,025) (Табела 4).

4.1.3 Ефекат *GSTO1/GSTO2* хаплотипа на ризик за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике

Пошто се *GSTO1* и *GSTO2* гени налазе на истом хромозому, удаљени међусобно само 7,5 кб, у даљем истраживању је било значајно испитати потенцијалну повезаност хаплотипа ових гена, који представља комбинацију алела на једном хромозому, са ризиком за настанак карцинома мокраћне бешике. У анализи неравнотеже везаности

(енгл. *linkage disequilibrium*, LD), добијен је резултат D' од 0,309 за *GSTO1* rs4925 и *GSTO2* rs156697 ($p=0,001$), потврђујући постојање неравнотеже везаности (LD) између ова два полиморфизма. Наши резултати су показали да је најчешће присутан хаплотип међу болесницима (49%) и контролама (57%) био *H1*, под којим се подразумева присуство *GSTO1* (*C) и *GSTO2* (*A) референтних алела (табела 5). С друге стране, особе носиоци *H4* хаплотипа (једна копија референтног алела *GSTO1* (*C) и варијантног *GSTO1* (*G)) су имале 2,8 већи ризик да оболе од карцинома мокраћне бешике (95%CI=1,5-5,2; $p=0,002$) у односу на носиоце *H1* хаплотипа.

Табела 5. Хаплотип анализа *GSTO1* и *GSTO2* у процени ризика за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике

Хаплотип	<i>GSTO1</i>	<i>GSTO2</i>	Болесници (%)	Контроле (%)	OR (95%CI) ^a	p
H1	*C	*A	49	57	1,00	
H2	*A	*A	17	18	1,3 (0,8 – 2,1)	0,360
H3	*A	*G	16	17	1,2 (0,7 – 1,9)	0,580
H4	*C	*G	18	8	2,8 (1,5 – 5,2)	0,002

^aКориговано за старост, пол, пушење и професионалну изложеност

OR (енгл. *odds ratio*), однос шанси претходне изложености код случајева (присутан догађај од интереса) и контрола (одсутан догађај од интереса);
CI (енгл. *confidence interval*), интервал поверења

Резултати хаплотип анализе су у сагласности са резултатом повезаности комбинованог ефекта *GSTO1* и *GSTO2* генотипова са ризиком за настанак овог карцинома, иако је хаплотип анализом добијена израженија статистичка значајност.

4.1.4 Удружени ефекат полиморфизма *GSTO1* rs4925 и *GSTO2* rs156697 и познатих фактора ризика у настанку карцинома мокраћне бешике

С обзиром да пушење представља један од најзначајнијих и највише испитиваних фактора ризика за настанак карцинома мокраћне бешике, као и да су

канцерогени дуванског дима супстрати за готово све класе GST, испитиван је удружени ефекат пушења и генског полиморфизма *GSTO1* и *GSTO2* на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике (табела 6)

Табела 6. Удружени ефекат пушења и *GSTO1/GSTO2* генотипа на ризик за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике

	Болесници <i>n</i> (%)	Контроле <i>n</i> (%)	OR (95%CI)	<i>p</i> ^a
<i>GSTO1/пушење</i>				
*CC+*CA/непушачи	39 (21)	52 (37)	1,0 ^b	
*CC+*CA/пушачи	129 (69)	76 (54)	2,6 (1,5 – 4,7)	0,001
*AA/непушачи	6 (3)	4 (3)	2,6 (0,8 – 8,4)	0,098
*AA/пушачи	13 (7)	8 (6)	2,3(0,5– 10,2)	0,282
<i>GSTO2^c/пушење</i>				
*AA+*AG/непушачи	36 (20)	57 (41)	1,0 ^b	
*AA+*AG/пушачи	118 (65)	72 (51)	2,8 (1,6 – 4,9)	0,001
*GG/непушачи	8 (4)	3 (2)	3,4(0,8– 14,9)	0,103
*GG/пушачи	20 (11)	8 (6)	4,3(1,6– 11,2)	0,003

^a Значајност од $p \leq 0,025$ након Бонферони корекције

^b Кориговано за старост, пол и професионалну изложеност

^c За *GSTO2*, генотипизација је успела код 182 од 187 болесника

OR (енгл. *odds ratio*), однос шанси претходне изложености код случајева (присутан догађај од интереса) и контрола (одсутан догађај од интереса); CI (енгл. *confidence interval*), интервал поверења

Особе које су пушачи и носиоци било *GSTO1**C/C или *GSTO1**C/A генотипа су имали 2,6 пута већи ризик да оболе од карцинома мокраћне бешике у односу на непушаче носиоце истог генотипа (95%CI=1,5-4,7, p=0,001). На основу наших резултата може се закључити да *GSTO1* полиморфизам није модулирао ризик за настанак овог карцинома код пушача (OR=2,6, p=0,001; табела 3). С друге стране, комбиновани ефекат пушења и *GSTO2**G/G генотипа на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике је био израженији од самог ефекта пушења. Наиме, пушачи носиоци *GSTO2**G/G генотипа имали су 4,3 пута већи ризик да оболе од карцинома мокраћне бешике у односу на непушаче носиоце референтног алела (95%CI=1,6-11,2; p=0,003).

С обзиром да је професионална изложеност појединим хемијским канцерогенима познати фактор ризика за настанак карцинома мокраћне бешике, као и да су одређени хемијски агенси супстрати за поједине класе GST, испитиван је удружени ефекат професионалне изложености и генског полиморфизма глутатион трансфераза класе омега на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике. Сви болесници и особе из контролне групе су подељени на неизложене и изложене као што је наведено у одељку Материјали и методе. Бављење послом 6 месеци или дуже у току ког су особе бивале изложене хемијским канцерогенима (у радно време као и ван радног времена) се сматрало професионалном изложеношћу.

Особе које су биле професионално изложене канцерогенима и носиоци било *GSTO1**C/C или *GSTO1**C/A генотипа имали су 2,7 пута већи ризик да оболе од карцинома мокраћне бешике у односу на носиоце истог генотипа, који у анамнези нису имали професионалну изложеност канцерогенима (95%CI=1,6–4,5, p=0,001). Овај резултат се није много разликовао од добијеног ризика за настанак карцинома мокраћне бешике код професионално изложених болесника без удруженог ефекта генотипа (OR=2,4, p=0,001; табела 3).

С друге стране, удружени ефекат професионалне изложености и варијантног *GSTO2**G/G генотипа на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике је био израженији од самог ефекта професионалне изложености. Наиме, професионално изложени носиоци *GSTO2**G/G генотипа имали су чак 6 пута већи ризик да оболе од

карцинома мокраћне бешике у односу на оне који нису професионално изложени и носиоци су референтног алела (95% CI=1,3-29,2, p=0,025) (табела 7).

Табела 7. Удружени ефекат професионалне изложености и *GSTO1/GSTO2* генотипа на ризик за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике

	Болесници <i>n</i> (%)	Контроле <i>n</i> (%)	OR (95%CI)	<i>p</i> ^a
<i>GSTO1/професионална изложеност</i>				
*CC+*CA/неизложени	92 (49)	97 (69)	1,0 ^b	
*CC+*CA/изложени	77 (41)	31 (22)	2,7 (1,6 – 4,5)	0,001
*AA/ неизложени	14 (8)	9 (7)	1,9 (0,8 – 4,7)	0,172
*AA/изложени	4 (2)	3 (2)	1,7 (0,4 – 8,3)	0,519
<i>GSTO2^c/професионална изложеност</i>				
*AA+*AG/неизложени	85 (47)	97 (69)	1,0	
*AA+*AG/изложени	69 (38)	32 (23)	2,5 (1,5 -4,3)	0,001
*GG/неизложени	17 (9)	9 (6)	1,9 (0,8 – 4,8)	0,127
*GG/изложени	11 (6)	2 (2)	6,0 (1,3 -29,2)	0,025

^a Значајност од $p \leq 0,025$ након Бонферони корекције

^b Кориговано за старост, пол и пушење

^c За *GSTO2*, генотипизација је успела код 182 од 187 болесника

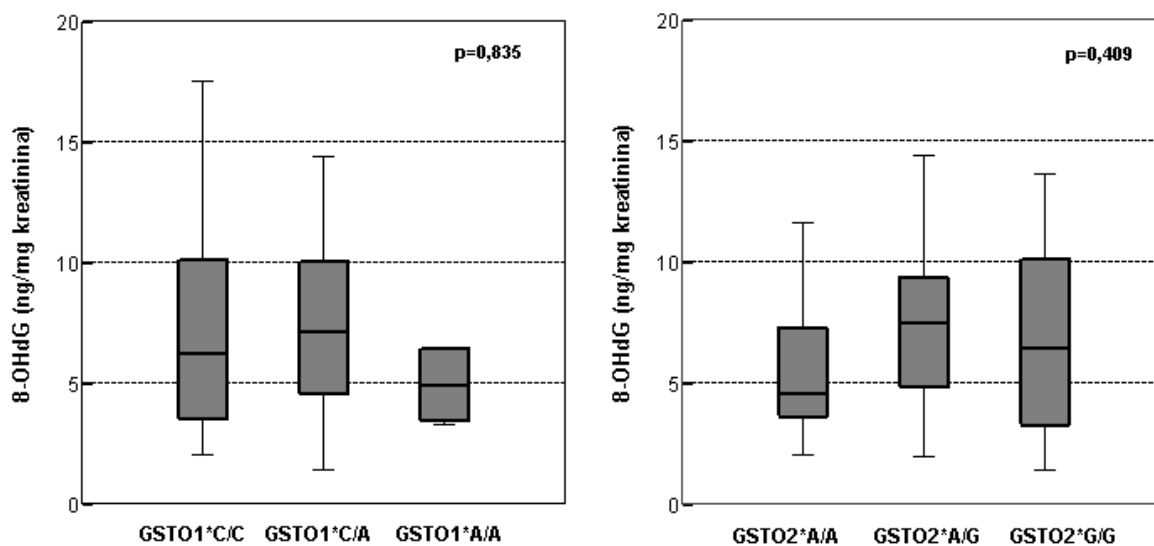
OR (енг. *odds ratio*), однос шанси претходне изложености код случајева (присутан догађај од интереса) и контрола (одсутан догађај од интереса)

CI (енг. *confidence interval*), интервал поверења

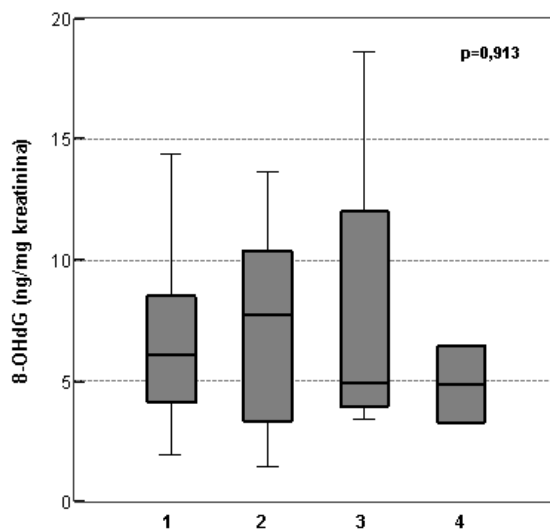
4.2 ПРОЦЕНА ОКСИДАТИВНОГ ОШТЕЋЕЊА ДНК КОД БОЛЕСНИКА СА КАРЦИНОМОМ ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ

Сматра се да је оксидативно оштећење деоксирибонуклеинске киселине (ДНК) укључено у процесе старења, канцерогенезе и различитих дегенеративних болести. Како би се проценило оксидативно оштећење ДНК у карциному мокраћне бешике, одређиван је 8-хидрокси-2'-деоксигуанозин (8-OHdG). 8-OHdG се излучује урином и представља неинвазивни маркер оксидативног оштећења ДНК. Ранијим студијама је показано да концентрација 8-OHdG у јутарњем урину добро корелира са концентрацијом измереном у 24-часовном урину, највећим делом због малих варијација у излучивању 8-OHdG током дана. Имајући то у виду, за одређивање његове концентрације у нашој студији је коришћен јутарњи урин болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике и контролне групе. Код болесника са карциномом мокраћне бешике измерена је статистички значајно већа концентрација уринарног 8-OHdG у односу на контролну групу (7,22 (95%CI=6,81–9,90) vs. 4,97 ng/mg креатинина (95%CI=3,14–7,48); $p=0,043$).

Резултати испитивања оксидативног оштећења ДНК код болесника са карциномом мокраћне бешике према GST генотипу су представљени на слици 5. Анализирајући да ли постоји веза између оксидативног оштећења ДНК и полиморфизма *GSTO1* и *GSTO2*, уочено је да не постоји статистичка значајна разлика у концентрацији 8-OHdG, маркера оксидативног оштећења ДНК, како у групи носилаца референтног алела, тако и код носилаца варијантног алела *GSTO1* или *GSTO2* (слика 5). Мада је концентрација уринарног 8-OHdG код болесника са карциномом прелазног епитела била знатно виша у односу на контроле, није уочен ефекат удруженог *GSTO1/GSTO2* генотипа на степен оксидативног оштећења ДНК (слика 6). Такође, није уочена статистички значајна разлика у концентрацији уринарног 8-OHdG код пушача и професионално изложених особа у односу на непушаче и неизложене (резултати нису приказани).



Слика 5. Концентрација 8-OHdG код носиоца различитих *GSTO1* и *GSTO2* генотипова



Слика 6. Концентрација 8-OHdG код носиоца комбинованих *GSTO1* и *GSTO2* генотипова. Бројем 1 су на слици означени носиоци *CC+*CA / *AA+*AG, бројем 2 су на слици означени носиоци *CC+*CA / *GG, бројем 3 су на слици означени носиоци *AA / *AA+*AG, а бројем 4 носиоци *AA / *GG генотипова.

4.3 ЗНАЧАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗА КЛАСЕ ОМЕГА У ПРОГНОЗИ БОЛЕСНИКА СА ИНВАЗИВНИМ КАРЦИНОМОМ МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ

За процену утицаја генских полиморфизама *GSTO1* и *GSTO2* на преживљавање пацијената са инвазивним карциномом мокраћне бешике спроведена је „*case only*” студија.

Табела 8. Демографске и клиничке карактеристике болесника са инвазивним карциномом прелазног епитела мокраћне бешике

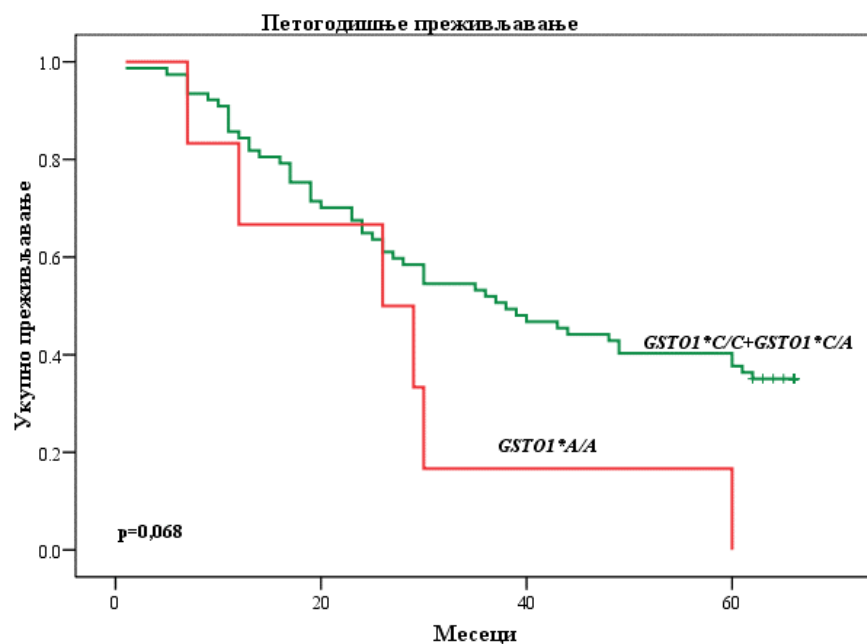
Карактеристике	Болесници <i>n</i> = 101
Старост ($\bar{x} \pm SD$)	64,04 \pm 9,34
Пол	
Мушки, <i>n</i> (%)	77 (76,2)
Женски, <i>n</i> (%)	24 (23,8)
Градус	
G1, <i>n</i> (%)	5 (5)
G2, <i>n</i> (%)	36 (35,6)
G3, <i>n</i> (%)	60 (59,4)
Стадијум	
2, <i>n</i> (%)	42 (41,6)
3, <i>n</i> (%)	37 (36,6)
4, <i>n</i> (%)	22 (21,8)
Хемотерапија	
Не, <i>n</i> (%)	50 (49,5)
Да, <i>n</i> (%)	51 (50,4)

Од укупног броја болесника са карциномом мокраћне бешике, издвојено је 105 болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике код којих је урађена генотипизација и испитиван полиморфизам глутатион трансфераза класе омега. Генотипизација је била успешна код 101 болесника за све тестиране генотипове. Средње време праћена болесника је било $38,2 \pm 23,1$ месец (распон од 1 до 60 месеци). Од 101 болесника, код 62 (61,4%) је као узрок смрти наведен карциномом мокраћне бешике, а 12 болесника (11,9%) је изгубљено током петогодишњег праћења.

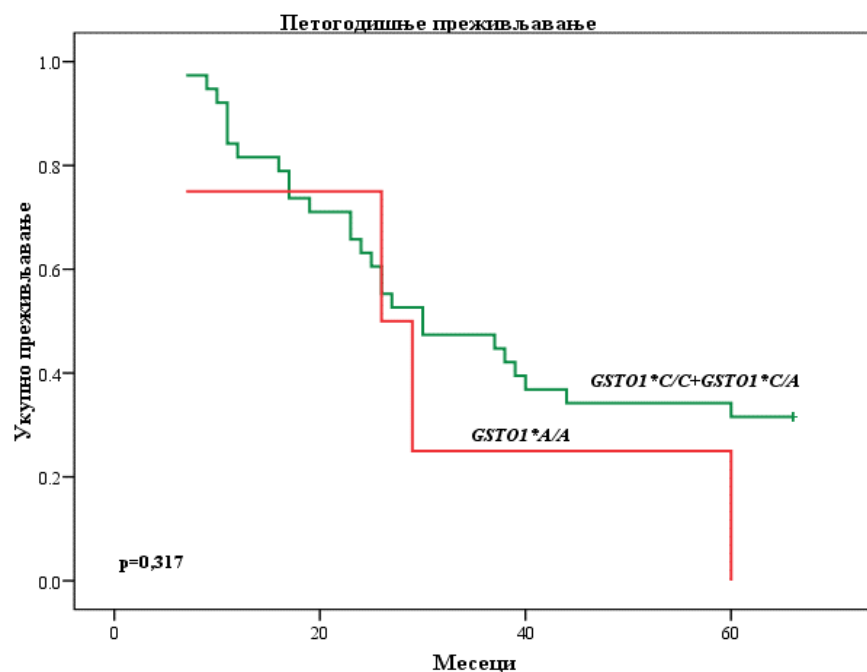
Демографске и клиничке карактеристике ове групе болесника су приказане на табели 8. Патохистолошком анализом је показано да су узорци ткива пет болесника били градуса 1 и стадијума 2 карцинома прелазног епитела мокраћне бешике и сврстани су у групу инвазивних тумора.

4.3.1 Модулирајући ефекат *GSTO1* rs 4925 полиморфизма на преживљавање болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике

Посматрајући *GSTO1* rs4925 полиморфизам, присуство оба варијантна алела (*GSTO1**A/A), које је утврђено код 8 болесника, представљало је независни предиктор ризика за смртни исход (HR=2,9, 95%CI: 1,2-7,4; p=0,022; Табела 9). Иако је процентуална заступљеност *GSTO1**A/A генотипа била релативно мала, може се претпоставити да овај генотип има велики функционални значај, с обзиром на чињеницу да је чак 6 од укупно 8 болесника са овим генотипом умрло током петогодишњег праћења. С обзиром да од карцинома мокраћне бешике чешће оболевају мушкарци и да се преодминантно тумор јавља у старијем животном узрасту, као и да је у нашој студији скоро 60% болесника имало градус 3 карцинома, конструисана су два статистичка модела за процену ризика за смртни исход како би се контролисао утицај наведених коваријабли. У првом моделу, приликом статистичке анализе уврштена је корекција за старост и пол, а у другом моделу корекција је урађена и за градус.



Слика 7А. Каплан-Мајер крива преживљавања болесника са карциномом мокраћне бешике према *GSTO1* полиморфизму.



Слика 7Б. Каплан-Мајер крива преживљавања болесника са карциномом мокраћне бешике који су били на хемотерапији према *GSTO1* полиморфизму.

Табела 9. *GSTO1* полиморфизам као предиктор смрти болесника са инвазивним карциномом прелазног епитела мокраћне бешике након петогодишњег праћења

Ризик за смртни исход код болесника носиоца <i>GSTO1</i>*A/A у поређењу са болесницима носиоцима <i>GSTO1</i>*C алела			
Модел 1^a		Модел 2^b	
HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>P</i>
1,962 (0,812-4,744)	0,134	2,941 (1,164-7,430)	0,022

CI, Интервал поверења; HR, *Hazard Ratio*.

^aКориговано за старост и пол

^bКориговано за коваријабле у Моделу 1 плус додатна корекција за градус

Каплан-Мајер анализом преживљавања у целој групи болесника са карциномом мокраћне бешике је показано краће укупно преживљавање код болесника носиоца *GSTO1**A/A генотипа у поређењу са носиоцима макар једне копије *GSTO1**C алела (27,3 ± 7,6 vs. 40,1 ± 2,6 месеци, редом; $p=0,068$, Слика 7А).

Како подаци из литературе указују да у настанку и прогресији карцинома мокраћне бешике, као и у појави резистенције на хемотерапију значајну улогу могу имати глутатион трансферазе испитиван је и утицај *GSTO1* rs4925 полиморфизма на преживљавање болесника који су били на хемотерапији. Истраживањем је показано да *GSTO1* rs4925 полиморфизам нема утицаја на преживљавање болесника са карциномом мокраћне бешике који су лечени хемотерапијом (Слика 7Б).

4.3.2 Модулирајући ефекат *GSTO2* rs156697 полиморфизма на преживљавање болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике

Посматрајући *GSTO2* rs156697 полиморфизам, присуство оба варијантна алела (*GSTO2**G/G) је било независни предиктор ризика за смртни исход међу болесницима

са инвазивним карциномом мокраћне бешике. Показано је да је овај генотип најзначајнији када је у питању ризик за смртни исход, јер је за њега мултиваријабилни кориговани (Модел 2) HR износио 3,9 (95% CI: 1,8-8,9; $p=0,001$; Табела 10). Девет од укупно десет болесника носиоца овог генотипа је преминуло током петогодишњег праћења.

Табела 10. *GSTO2* полиморфизам као предиктор смрти болесника са инвазивним карциномом прелазног епитела мокраћне бешике након петогодишњег праћења

Ризик за смртни исход код болесника носиоца <i>GSTO2</i> *G/G у поређењу са носиоцима <i>GSTO2</i> *А алела			
Model 1 ^a		Model 2 ^b	
HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
2,870 (1,355-6,076)	0,006	3,967 (1,760-8,939)	0,001

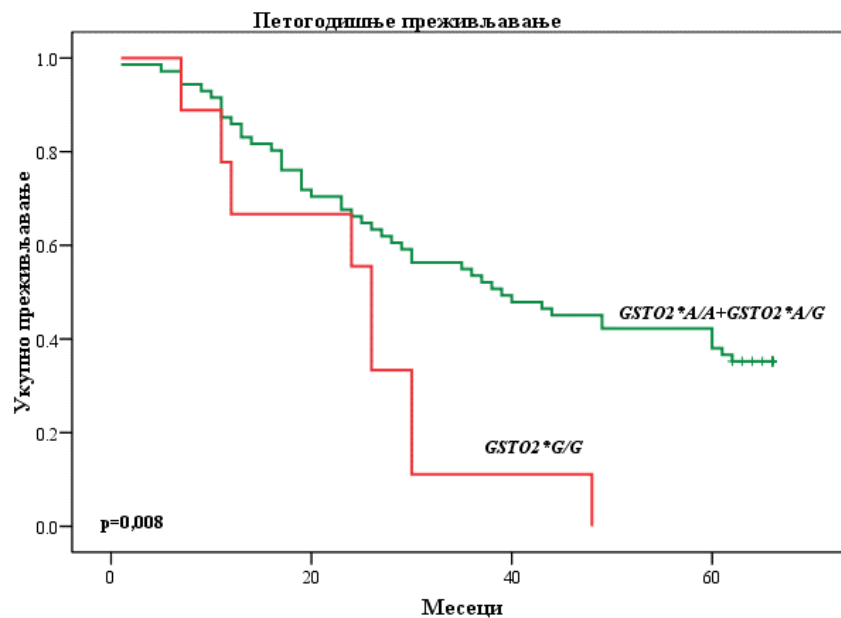
CI, Интервал поверења; HR, *Hazard Ratio*.

^aКориговано за старост и пол

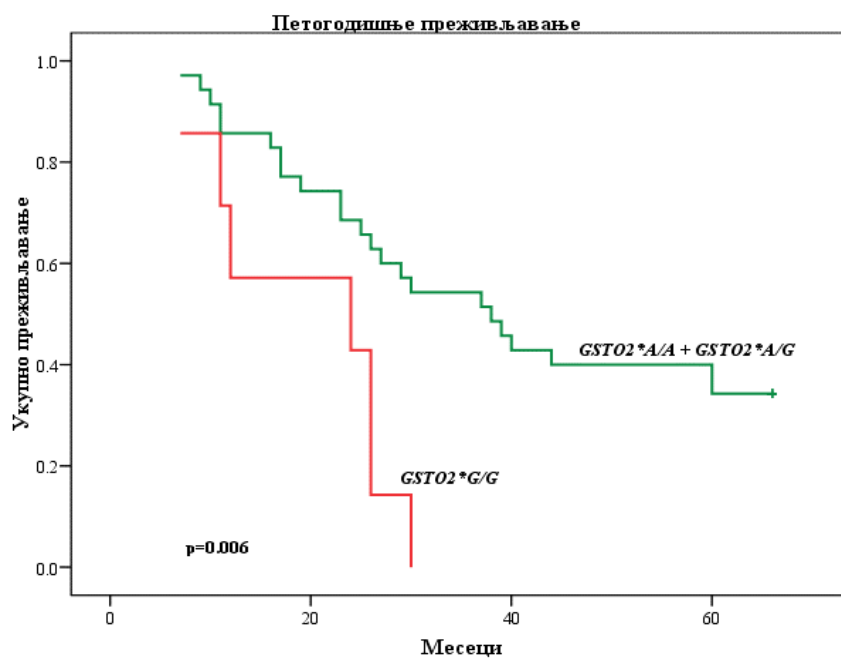
^bКориговано за коваријабле у Моделу 1 плус додатна корекција за градус

Каплан-Мајер анализом у целој групи болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике показано је да су носиоци *GSTO2**G/G генотипа имали 2 пута краће средње време преживљавања у поређењу са болесницима носиоцима барем једног *GSTO2**А алела ($23,8 \pm 4,2$ vs. $40,8 \pm 2,7$ месеци, редом; $p=0,008$, Слика 8А).

Такође, слично и као код *GSTO1* испитиван је утицај *GSTO2* rs156697 полиморфизма на преживљавање болесника са карциномом мокраћне бешике лечених хемотерапијом. Показано је да су пацијенти носиоци оба варијантна алела (*GSTO2**G/G) статистички значајно краће живели од болесника носиоца барем једног *GSTO2**А алела ($19,4 \pm 3,4$ vs. $40,3 \pm 3,7$ месеци, редом; $p=0,006$, Слика 8Б).



Слика 8А. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања болесника са карциномом мокраћне бешике према $GSTO2$ полиморфизму.



Слика 8Б. Каплан-Мајер крива укупног преживљавања болесника са карциномом мокраћне бешике који су били на хемотерапији према $GSTO2$ полиморфизму.

4.4 ЕКСПРЕСИЈА И АКТИВНОСТ ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗЕ ОМЕГА 1 У КАРЦИНОМУ ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ

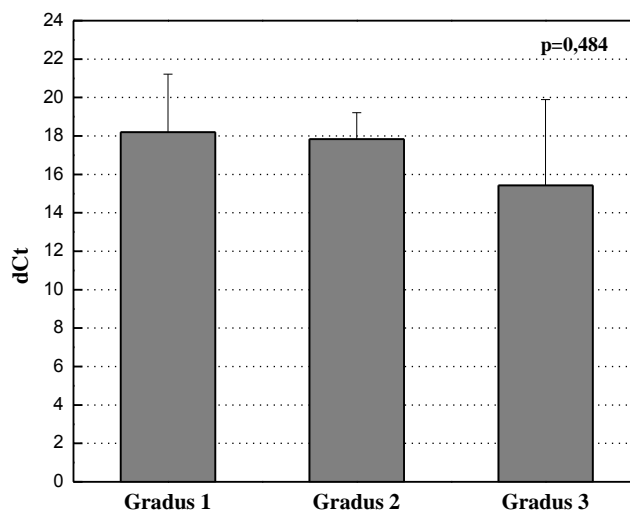
Узорци туморског и околног нетуморског ткива су добијени од 50 болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике који су били подвргнути оперативном лечењу трансуретралном ресекцијом или радикалном цистектомијом. Болесници од којих је узиман материјал су били новодијагностиковани и претходно нису били на хемотерапији. Узорци околног нетуморског ткива су били доступни само за болеснике који су били подвргнути радикалној цистектомији.

На основу стадијума болести (Т), узорци су подељени у четири групе, а према степену малигнитета (G) у три групе. На основу цистоскопије, ТУР-а, и патохистолошког налаза, узорци су подељени у две групе: неинвазивне и инвазивне туморе.

4.4.1 Експресија *GSTO1* на нивоу информационе рибонуклеинске киселине (иРНК) и протеина

Како су узорци околног неизмењеног уроепителијума били доступни само код болесника који су били подвргнути радикалној цистектомији и услед великог броја анализа у којима је коришћен овај материјал, *GSTO1* експресија на нивоу иРНК је анализирана само у узорцима туморског ткива болесника са карциномом мокраћне бешике. Експресија је одређивана реакцијом ланчаног умножавања у реалном времену (енгл. *Real time polymerase chain reaction*, RT-PCR). Резултати *GSTO1* експресија на нивоу иРНК су приказани релативно у односу на експресију 18S као делта Ct (енгл. *Threshold cycle*, Ct). Ct представља циклус PCR-а у ком флуоресценца пређе ниво прага и његова вредност је обрнуто сразмерна експресији иРНК.

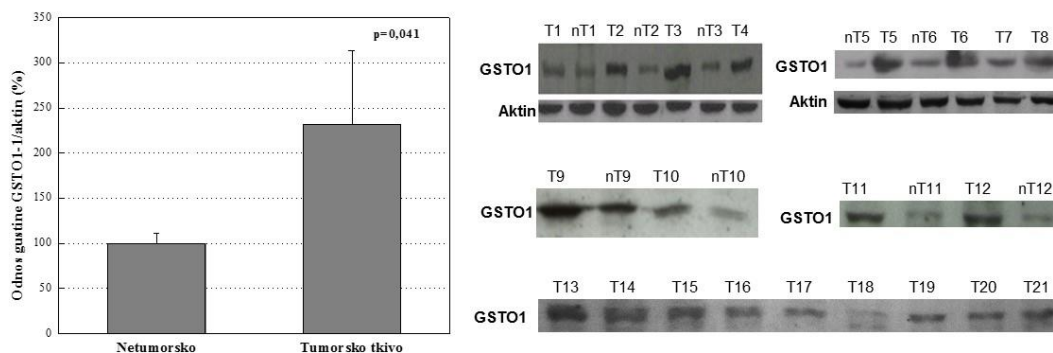
GSTO1 експресија на нивоу иРНК је расла са градусом тумора ((dCt у G1: 18,19 ± 3,02; dCt у G2: 17,83 ± 1,38; dCt у G3: 15,43 ± 4,47), мада добијене вредности нису биле статистички значајне (p=0,484) (Слика 9).



Слика 9. *GSTO1* експресија на нивоу иРНК према градусу карцинома прелазног епитела мокраћне бешике одређивана реакцијом ланчаног умножавања у реалном времену (енгл. *real time polymerase chain reaction*, RT-PCR).

Испитиван је профил експресије *GSTO1* имуноблот техником у туморском и околном морфолошки неизмењеном уроепителијуму карцинома прелазног епитела мокраћне бешике. Узорци нетуморског ткива нису били доступни за све болеснике, већ само за оне који су били подвргнути радикалној цистектомији. Присуство *GSTO1* је показано на нивоу протеина у свим туморским и нетуморским узорцима карцинома прелазног епитела мокраћне бешике..

Дензитометријском анализом податка добијених имуноблот техником је показано да је експресија *GSTO1* у туморском ткиву била око 2,3 пута већа у односу на експресију у околном неизмењеном уроепителијуму. Ова разлика је била статистички значајна ($p=0,041$). На слици 10 су приказани репрезентативни блотови у којима се види повишена експресија *GSTO1* у туморском ткиву у односу на околни неизмењени уроепителијум. карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

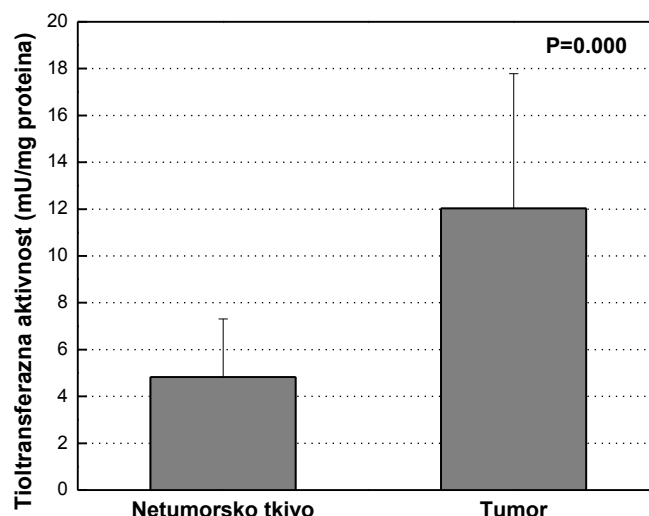


Слика 10. Профил експресије *GSTO1* у туморском (Т) и околном нетуморском ткиву (nТ) карцинома мокраћне бешике

4.4.2 Тиолтрансферазна активност *GSTO1*

Услед присуства остатка функционалне групе цистеина у активном месту глутатион трансферазе класе омега, за разлику од осталих GST класа, испољавају и специфичну тиолтрансферазну активност. Резултати научних студија показују да је тиолтрансферазна активност изоензима *GSTO1* израженија у односу на *GSTO2* изоензим код ког је потврђена висока дехидроаскорбатредуктазна активност.

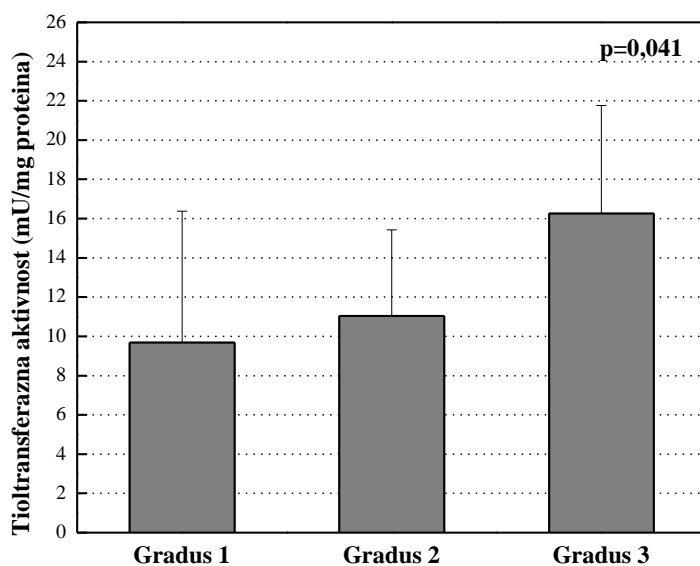
У нашој студији, тиолтрансферазна активност *GSTO1-1* у туморском ткиву карцинома прелазног епитела мокраћне бешике и одговарајућем неизмењеном уроепителијуму је одређивана коришћењем 2-хидроксиетилдисулфида као супстрата. Активност је одређена код 45 болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике и добијени резултат је приказан на слици 11. Средња вредност тиолтрансферазне активности у туморском ткиву је била 2,5 пута већа у односу на околни неизмењени уроепителијум карцинома прелазног епитела мокраћне бешике ($12,03 \pm 5,75$ vs. $4,83 \pm 2,48$ mU/mg протеина; $p= 0,000$).



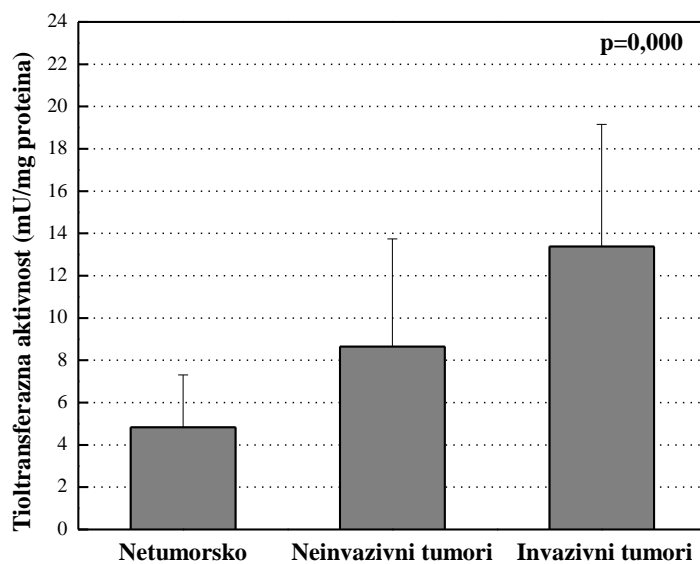
Слика 11. Тиолтрансферазна активност GSTO1-1 у туморском ткиву карцинома прелазног епитела мокраћне бешике и одговарајућем неизмењеном уроепителијуму

Такође, испитивано је да ли тиолтрансферазна активност зависи од малигног потенцијала тумора. На сликама 12 и 13 је приказано како се мења ензимска активност у складу са различим градусима и степеном инвазивности тумора. Наиме, болесници су подељени у три групе према градусу карцинома мокраћне бешике и показано је да тиолтрансферазна активност расте са градусом тумора и да је највећа у градусу 3 ($p = 0,041$) (Слика 12).

Даље, туморски узорци су стратификовани према стадијуму болести на неинвазивне (T1) и инвазивне (T2, T3 и T4 стадијум) и испитивано је како се ова ензимска активност мења са променом инвазивности тумора (Слика 13). Показано је да је тиолтрансферазна активност била статистички значајно повећана у узорцима инвазивних тумора у односу на неинвазивне туморе и активност у околном неизмењеном уроепителијуму је била нижа у односу на активност у неинвазивним и инвазивним туморима ($4,83 \pm 2,48$; $8,65 \pm 5,09$; $13,37 \pm 5,78$ mU/mg протеина, редом; $p = 0,000$) (Слика 13).



Слика 12. Тиолтрансферазна активност у складу са различим градусима карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

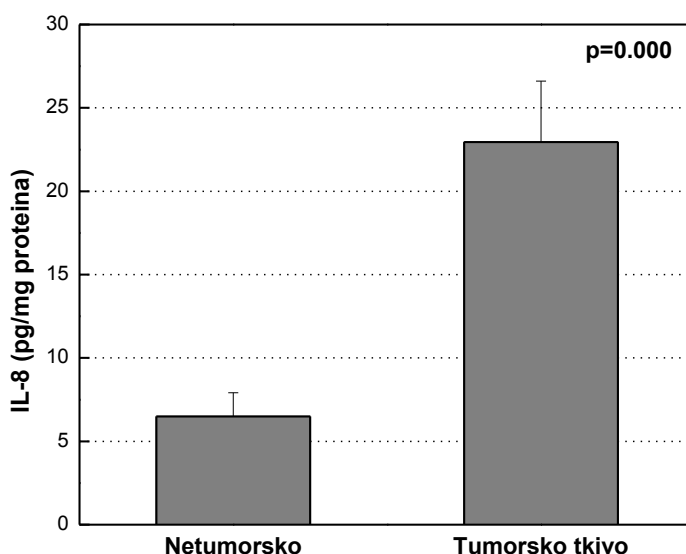


Слика 13. Тиолтрансферазна активност у нетуморском ткиву и у узорцима неинвазивних и ивазивних тумора карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

На основу наших резултата, може се закључити да је у карциному прелазног епитела мокраћне бешике повећана експресија и тиолтрансферзна активност GSTO1-1 у односу на околни неизмењени уроепителијум бешике. Такође, тиолтрансферзна активност је расла са градусом и променом инвазивности тумора и највеће вредности активности су забележене у градусу 3 и код инвазивних тумора.

4.4.3 Експресија интерлеукина-8 (IL-8) у карциному прелазног епитела мокраћне бешике

Узимајући у обзир да IL-8 представља биомаркер инвазивности и да је у карциному мокраћне бешике претпостављена његова улога у туморогенези и продукцији спонтаних метастаза, одређивали смо његову експресију у узорцима карцинома прелазног епитела мокраћне бешике. Уочили смо статистички више вредности IL-8 у туморском ткиву у односу на морфолошки неизмењени уроепителијум ($22,94 \pm 3,67$ vs. $6,49 \pm 1,43$ pg/mg протеина; $p=0,000$) (слика 14)

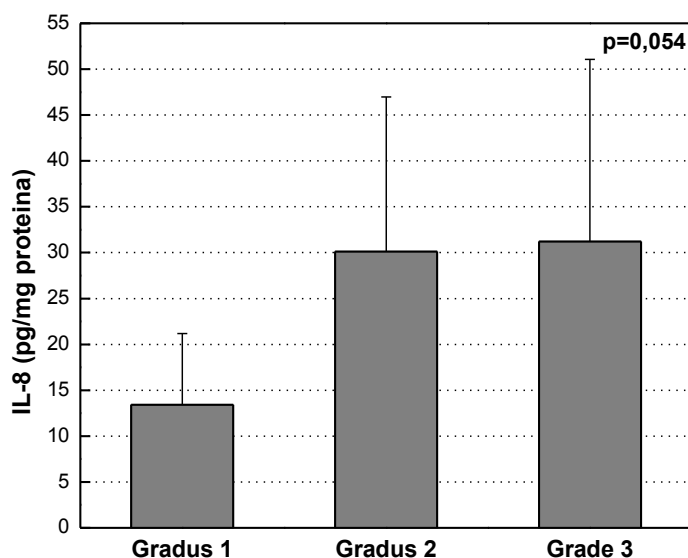


Слика 14. Експресија IL-8 у нетуморском у односу на туморско ткиво карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

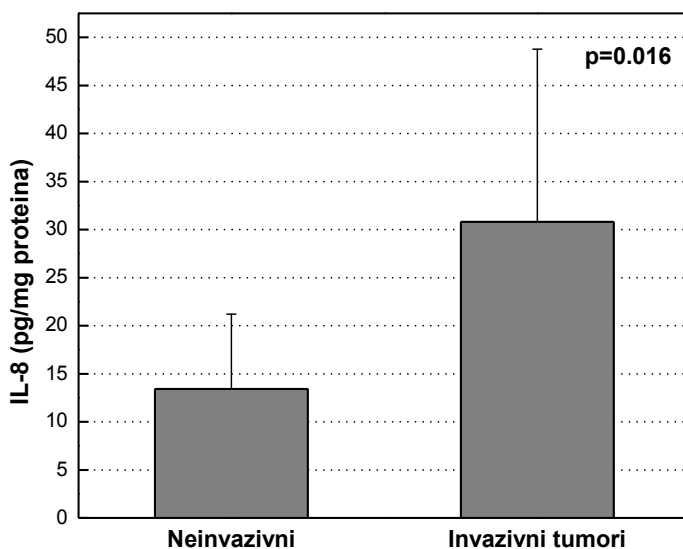
Експресија IL-8 у ткиву карцинома прелазног епитела мокраћне бешике је пропорционално расла, како са порастом степена малигнитета тумора (G1: $13,42 \pm 7,77$; G2: $30,11 \pm 16,86$; G3: $31,19 \pm 19,86$ pg/mg протеина, $p=0,054$) тако и са инвазивношћу тумора ($13,42 \pm 7,77$ vs. $30,80 \pm 17,96$ pg/mg протеина, $p=0,016$) (слика 15 и слика 16).

На основу наших резултата може се закључити да повишене вредности IL-8 пружају додатну потпору улози запаљенског процеса у карциному прелазног епитела мокраћне бешике.

Даље би требало испитати и проверити везу између GSTO1-1 и маркера запаљенског процеса као и осталих познатих показатеља за рану детекцију и прогнозу карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.



Слика 15. Експресија IL-8 према градусима карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.



Слика 16. Експресија IL-8 у неинвазивним и инвазивним узорцима карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

4.5 САДРЖАЈ ГЛУТАТИОНА У КАРЦИНОМУ ПРЕЛАЗНОГ ЕПИТЕЛА МОКРАЋНЕ БЕШИКЕ

С обзиром да промене у редокс равнотежи узроковане присуством слободних радикала, доводе до промена у концентрацији редукованог (GSH) и окидованог глутатиона (GSSG), то може имати утицаја на бројне протеине доводећи до њихове постранислационе оксидативне модификације. За одређивање концентрације редукованог и окидованог глутатиона коришћен је спектрофотометријски кинетички метод где се GSH стално оксидује и преводи у GSSG у реакцији са 5,5'-дителиобис (2-нитробентоева киселина) (DTNB). Концентрација редукованог глутатиона је добијена одузимањем концентрације окидованог глутатиона од концентрације укупног глутатиона и изражена као nmol/mg протеина. Садржај редукованог глутатиона (GSH) је био значајно већи у туморском ткиву у односу на околни морфолошки неизмењени уроепителијум ($51,21 \pm 30,39$ vs. $8,54 \pm 3,91$ nmol/mg протеина, $p < 0.0001$) (Табела 11),

тима потврђујући да у туморском ткиву постоје значајне промене метаболизма глутатиона.

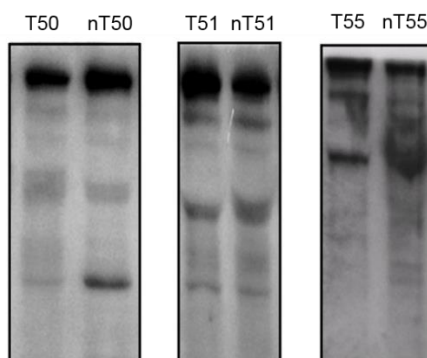
Табела 11. Садржај редукованог (GSH) и оксидованог (GSSG) глутатиона у туморском и нетуморском ткиву болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике

	Туморско ткиво ($\bar{x} \pm SD$)*	Нетуморско ткиво ($\bar{x} \pm SD$)	P
GSH (nmol/mg протеина)	51,21 \pm 30,39	8,54 \pm 3,91	<0,0001
GSSG (nmol/mg протеина)	4,57 \pm 1,90	0,22 \pm 0,04	<0,0001

*Концентрација глутатиона је представљена као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.5.1 Укупна глутатионилација протеина

Укупна глутатионилација протеина је одређивана у 19 туморских узорака и околном морфолошки неизмењеном уроепителијуму болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике. Моноклонско анти-глутатионско антитело је коришћено како би се испитала укупна протеинска глутатионилација *ex vivo* (Слика 17).



Слика 17. Укупна глутатионилација протеина у туморском (Т) и нетуморском ткиву (nТ) карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

На слици се виде траке молекулских маса од 7,2 до 205 kDa са тракама већег броја и интензитета у нетуморском ткиву у односу на туморско ткиво карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

Овај снижен степен укупне глутатионилације у туморском ткиву мокраћне бешике би се могао можда објаснити повећаном експресијом и тиолтрансферазном активности GSTO1-1 која је такође показана у нашој студији, имајући у виду њену познату деглутатионилациону улогу. Најновија истраживања о GSTO1-1 говоре о потенцијалној улози GSTO1-1 у редокс регулацији протеина и ћелијским сигналним путевима.

5 ДИСКУСИЈА

Глутатион трансферазе (GST) су суперфамилија ензима које у ћелијама каталишу реакције коњугације електрофилних метаболита ендогеног и егзогеног порекла са глутатионом, чиме се најчешће смањује њихова токсичност. Недавно су GST молекули упоређени са мирнодопском армијом, која у ћелијама чека напад цитотоксичних и прооксидативних једињења како би заштитила здраве ћелије од оштећења. У туморским ћелијама пак, значајну улогу у појави резистенције на различите антитуморске лекове, могу имати управо ови ензими (Simic T. и сар, 2009). Новија истраживања показују да поред познатих каталитичких, поједини GST изоензими поседују и некаталитичке улоге, које остварују протеин-протеинским интеракцијама са неколико сигналних молекула и на тај начин учествују у регулацији редокс-сензитивног MAPK (енгл. *mitogen-activated protein kinase*) сигналног пута. Узимајући у обзир да је показано да неке од ових улога, посебно у регулацији одређених апоптотских сигналних путева у туморима надмашују значај њихових каталитичких функција, последњих година постоје интензивна истраживања усмерена на инхибицију GST као мету терапије (Tew KD. и Townsend DM, 2012).

Поред разлика које постоје међу различитим GST класама, постоји и значајна генетска хетерогеност међу класама услед генских делеција и дупликација, као и полиморфизама једног нуклеотида у кодирајућим и некодирајућим регионима. Велики број описаних полиморфизама у оквиру свих цитосолних GST имају значајне функционалне ефекте и доводе се у везу са појавом различитих малигних и немалигних болести (Board PG. и сар, 2013).

Иако припадају суперфамилији цитосолних глутатион трансфераза, глутатион трансферазе класе омега (GSTO) немају заједничке супstrate са осталим класама и поседују неке структурне карактеристике различите у односу на остале припаднике ове суперфамилије. Поред тога, функционална група у активном месту GSTO класе је цистеин, уместо серина или тирозина, који су кључни за каталитичку активност осталих GST (Whitbread AK. и сар, 2005). Сматра се да су ове разлике у основи низа

специфичних активности, укључујући тиолтрансферазну активност и њену значајну улогу у реакцијама глутатионилације протеина, што је карактеристично првенствено за GSTO1-1 изоензиме (Menon D. и Board PG, 2013). GST изоензимима класе омега учествују и у биотрансформацији арсена, а поседују и дехидроксиаскорбат-редуктазну (ДХАР) активност чиме су укључени у ћелијске антиоксидативне механизме одбране. Штавише, сматра се да у ћелијама сисара највећу ДХАР активност поседује заправо GSTO2-2 ензими (Zhou H. и сар, 2012). Поред тога, GSTO1-1 још учествује и у активацији проинфламаторног цитокина, интерлеукина-1 β и модулацији ријанодинских рецептора (Whitbread AK. и сар, 2005).

Као и код осталих припадника цитосолних глутатион трансфераза, и код омега класе ове суперфамилије уочена је генска хетерогеност настала због присуства полиморфизама једног нуклеотида или делеција. Mukerjee B. и сарадници (2006) су описали 31 полиморфизам код *GSTO1* и 66 полиморфизама у *GSTO2* гену. Генетске варијације присутне у генима који кодирају омега класу су до сад повезиване са настанком Алцхајмерове и Паркинсонове болести, амиотрофичне латералне склерозе, васкуларне деменције, хроничне опструктивне болести плућа, али и различитих малигнух болести (Menon D. и Board PG, 2013). Нашим истраживањем су обухваћени до сада највише изучавани полиморфизми једног нуклеотида, *GSTO1* rs4925 и *GSTO2* rs156697 код болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике.

До сада је удруженост полиморфизама *GSTO1* и *GSTO2* са ризиком за настанак карцинома мокраћне бешике одређивана у свега неколико студија, које су испитивале ефекат ових полиморфизама код болесника који живе у подручјима где су концентрације арсена изнад дозвољене границе у води за пиће, али са неконзистентним резултатима. Велика епидемиолошка студија Wang YH. и сарадника (2009) испитивала је утицај три полиморфизма *GSTO* класе (*GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697 и *GSTO2* rs2297235) на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике, као и њихову повезаност са факторима ризика, као што су пушење, присуство арсена у пијаћој води, конзумација алкохола и изложеност хемијским канцерогенима код болесника и контрола у Тајпеју (Кина). Занимљиво је да је једино код болесника

носилаца варијантног *GSTO2**G/G генотипа (полиморфизам rs2297235, који настаје као последица замене аденина (A) у гуанин (G) на позицији 183) пронађен статистички значајно већи ризик за настанак карцинома мокраћне бешике, независано од испитиваних фактора ризика. Испитивањем повезаности хаплотипа *GSTO* гена (комбинације алела на једном хромозому), и ризика за појаву карцинома уочено је да су носиоци H4 (C⁴¹⁹-G⁻¹⁸³-G⁴²⁴) хаплотипа били под 2,6 пута већим ризиком у поређењу са носиоцима референтног, H1 (C⁴¹⁹-A⁻¹⁸³-A⁴²⁴) хаплотипа. Поред тога, аутори су показали модулирајући ефекат комбинације „ризичних“ генотипова код болесника који су били изложени свим испитиваним факторима ризика, чак 9 пута у поређењу са неизложеним носиоцима референтних *GSTO* генотипова. Lesseur C. и сарадници (2012) су испитивањем популације Њу Хемшира (САД) показали да су носиоци варијантног *GSTO2**G/G генотипа (полиморфизам rs156697) имали већи ризик за настанак карцинома мокраћне бешике независно од присуства арсена. Међутим, Chung CJ. и сарадници (2011) су проучавајући исту популациону групу као и Wang YH. и сарадници, показали да су носиоци *GSTO2**G/G под смањеним ризиком за настанак карцинома мокраћне бешике у односу на носиоце оба референта алела и да је статистички значајно већи проценат монометиларсенитне киселине пронађен у носиоца *GSTO1**C/C генотипа. На крају, Ху Y. и сарадници (2009) су показали да полиморфизам *GSTO2* rs156697 нема утицај на ризик за настанак карцинома мокраћне бешике код испитаника у Кини који су били хронично изложени високим концентрацијама арсена у води за пиће.

Наши резултати испитивања значаја *GSTO1* и *GSTO2* полиморфизама у процени ризика за настанак карцинома мокраћне бешике су у сагласности са резултатима Wang YH. и сар, (2009), као и Lesseur C. и сар. (2012). У нашој студији, испитивањем повезаности два најчешће одређивана *GSTO* полиморфизама (*GSTO1* rs4925 и *GSTO2* rs156697) са ризиком за настанак карцинома мокраћне бешике, статистички значајно већи ризик добијен је једино за *GSTO2* полиморфизам. Наиме, болесници носиоци *GSTO2**G/G варијантног генотипа су били под 2,6 пута већим ризиком, док су болесници носиоци референтног *GSTO1**A/A генотипа били под 1,3

пута већим ризиком за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике. С обзиром на постојање неравнотеже везаности (енгл. *linkage disequilibrium*, LD) гена и њихову међусобну удаљеност на 10. хромозому од само 7,5 кб, поред комбинованог ефекта ових полиморфизама, анализирали смо и ефекат хаплотипова у процени ризика за настанак овог карцинома. Наши резултати су показали да је најчешће присутан хаплотип међу болесницима и контролама био *H1*, под којим се подразумева присуство *GSTO1* (*C) и *GSTO2* (*A) референтних алела. С друге стране, особе носиоци *H4* хаплотипа (једна копија референтног алела *GSTO1* (*C) и варијантног *GSTO2* (*G)) су имале 2,8 већи ризик да оболе од карцинома мокраћне бешике у односу на носиоце *H1* хаплотипа.

Оваква комбинација *GSTO1* (*C) и варијантног *GSTO2* (*G) у „ризичном“ *H4* хаплотипу има и своје биолошко објашњење. Наиме, сложене промене настају у ћелијској редокс регулацији, која подразумева да је током туморске прогресије фаворизовано редуковано стање молекула (Savic-Radojevic A. и сар, 2007). Током овог процеса настају и посттранслационе модификације протеина приликом који се глутатион реверзибилно додаје (глутатионилација) и одузима (деглутатионилација) овим протеинима што је један од видова регулације активности многих протеина укључених у раст тумора (Tew KD. и Townsend DM, 2012). Најновије истраживање Menon-а и сарадника говори о полиморфним варијантама *GSTO1* које би потенцијално могле утицати на процес и регулацију глутатионилације и истиче у први план референтну *GSTO1**C алелску варијанту, која кодира протеин са највећом деглутатионилационом активношћу (Menon D. и Board PG, 2013). Пошто глутатионилација може утицати, како на структуру протеина тако и на њихову функцију, разлике у активности и потенцијална разлика у специфичности према одређеним супстратима између алелских варијанти *GSTO1* би могла бити прихватљив механизам којим би се објаснила повезаност овог генског полиморфизма и различитих обољења (Menon D. и Board PG, 2013). Могуће је претпоставити да присуство *GSTO1**C алелске варијанте доприноси деглутатионилацији протоонкогених протеина укључених у настанак карцинома мокраћне бешике и на овај начин доприноси ризику

за настанак карцинома уоченом код пацијента носиоца Н4 хаплотипа. Међу онкогеним протеинима које је могуће на овај начин регулисати је и антиапоптотски ензим глутатион трансфераза P1 (GSTP1) са јасно дефинисаном улогом у настанку и прогресији карцинома мокраћне бешике (Savic-Radojevic A. и сар, 2007; Pljesa-Ercegovic M. и сар, 2011).

Даље, Allen M. и сарадници (2012) су проучавајући повезаност *GSTO1* rs4925 и *GSTO2* rs156697 полиморфизма и ризика за настанак Алцхајмерове и Паркинсонове болести показали да присуство варијантних алела *GSTO1* и *GSTO2* има за последицу нижу генску експресију *GSTO2-2* протеина у мозгу. Уколико претпоставимо да је такав начин регулације експресије *GSTO2* присутан и у ћелијама карцинома прелазног епитела мокраћне бешике, присуство варијантних алела *GSTO1* и *GSTO2*, би вероватно довело до промене експресије или активности првенствено *GSTO2-2*. Познато је да овај ензим поседује највећу дехидроаскорбатну активност код људи, и на тај начин учествује у регенерацији оксидоване форме витамина С, дехидроаскорбата у аскорбинску киселину. Осим познате антиоксидативне улоге, аскорбинска киселина може довести до активације апоптозе у туморским ћелијама, као што је показано на ћелијској линији HCT116 карцинома дебелог црева (Catani MV. и сар, 2002), а укључена је и у регулацију индуцибилног фактора хипоксије (енгл. *hypoxia-inducible factor, HIF*). Шта више, показано је да HIF учествује у регулацији експресије многих гена укључених у раст тумора, енергетски метаболизам и апоптозу (Tian W. и сар, 2014). Guan Z. и сарадници (2013) су на T24 ћелијској линији карцинома прелазног епитела мокраћне бешике показали да хипоксија, као пратилац брзо растућих тумора, доводи до пораста нивоа HAF (енгл. *hypoxia-associated factor, HAF*) и уз активацију NF-κB сигналног пута, узрокује и активацију HIF-а и води појачаној склоности ћелија за малигну алтерацију. Поред тога, Traber MG. и Stevens JF. (2011) у свом истраживању говоре о томе да би витамин С-зависна инхибиција HIF сигналног пута могла бити један од начина контроле туморске прогресије и инфламације (Traber MG. и Stevens JF, 2011). Уколико претпоставимо да је код носилаца Н4 хаплотипа, болесника са карциномом прелазног епитела снижена дехидроаскорбат редуктазна активност

GSTO2-2 ензима, то би за последицу могло имати смањене концентрације аскорбинске киселине у тумору мокраћне бешике. Штавише, о функционалном значају *GSTO2* полиморфизма говори и чињеница да је наше истраживање показало да већина болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике, који су преминули у току петогодишњег праћења, су били носиоци варијантног *GSTO2**G/G генотипа.

Узимајући у обзир све наведено, присуство Н4 хаплотипа под којим се подразумева висока деглутатионилациона *GSTO1-1* и ниска дехидроаскорбат редуктазна активност *GSTO2-2*, би могло бити у основи повећаног ризика за настанак карцинома мокраћне бешике међу овим болесницима.

И поред чињенице да су пушење и професионална изложеност хемијским канцерогенима два најзначајнија фактора ризика за настанак карцинома мокраћне бешике, досадашње велике епидемиолошке студије нису дале одговор на питање да ли постоји модулирајући ефекат полиморфизама *GSTO* класе на ове факторе ризика, нарочито узимајући у обзир чињеницу да су испитаници истовремено били изложени високим концентрацијама арсена у води за пиће. Тек је недавно је у студији Tung MC. и сарадника (2014) показан модулирајући ефекат референтног *GSTO1**Ala/Ala генотипа, који код пушача повећава ризик за настанак карцинома мокраћне бешике чак 4,2 пута. Међутим, још увек је недовољно јасно да ли *GSTO2* полиморфизам, посебно имајући у виду његову дехидроаскорбат-редукатазну каталитичку улогу, може да модулира ризик код пушача и професионално изложених особа.

Наиме, скоро сва једињења која су познати фактори ризика за настанак карцинома мокраћне бешике су истовремено и важан извор слободних радикала, који свој ефекат испољавају директно, као они присутни у дуванском диму, или током метаболизма хемијских канцерогена, као што су полициклични ароматични угљоводоници (енгл. *polycyclic aromatic hydrocarbons*, ПАХ) (Filiadis I. и сар, 2000; Valavanidis A. и сар, 2009). С обзиром на антиоксидативну улогу коју има *GSTO2-2* учествујући у регенерацији дехидроаскорбата, измењена активност *GSTO2-2* протеина би могла довести до интериндивидуалних разлика приликом детоксикације канцерогена присутних у дуванском диму и приликом професионалне иложености

канцерогенима. Наши резултати показују да су пушачи носиоци *GSTO2**G/G генотипа били под 4 пута већим ризиком за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике у односу на непушаче носиоце референтног *GSTO2**A/A генотопа. С друге стране, наши резултати који говоре о повећаном ризику за настанак карцинома код професионално изложених пацијената, носилаца варијантног *GSTO2**G/G генотипа треба тумачити са опрезом узимајући у обзир мали број здравих контрола у подгрупи изложених *GSTO2**G/G носиоца.

Такође, постоје подаци о формирању ДНК коњугата услед повећаног стварања слободних радикала током превођења полицикличних ароматичних угљоводоника до хинона (Yu H и сар, 2006). Могли бисмо претпоставити да током малигне трансформације долази до значајних промена ћелијског редокс статуса, што све води оштећењу ДНК, мутацији гена и структуралним променама на ДНК. Штавише, важно је напоменути да оксидативни стрес не доприноси само настанку, него и промоцији и прогресији тумора. У фази промоције, слободни кисеонични радикали могу допринети измењеној генској експресији и модификацији сигналних путева, што би за последицу имало повећање ћелијске пролиферације и инхибицију апоптозе. Даље, оксидативни стрес може такође допринети прогресији тумора стимулацијом додатних промена у ДНК што заузврат може довести до развоја малигнијег фенотипа тумора (Halliwell B, 2007; Reuter S. и сар, 2010). У карциному дојке је показано да је маркер оксидативног оштећења ДНК, 8-OHdG, 8-17 пута повећан у примарном тумору у односу на немалигно ткиво дојке (Malins DC. и сар, 1991). Наши резултати о повећаној концентрацији уринарног 8-OHdG код болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике у поређењу са здравим контролама су у сагласности са недавном студијом Chung CJ. и сарадника (2008) који су испитивали концентрацију 8-OHdG у корелацији са изложеношћу арсену. Међутим, у нашој студији није уочена разлика у концентрацији овог маркера оксидативног оштећења ДНК код болесника са различитим *GSTO1* или *GSTO2* генотиповима. Ово је свакако изненађујући резултат, који захтева додатно истраживање које би значило и испитивање на већем узорку болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике.

Поред могућности да модулирају ризик за настанак карцинома мокраћне бешике, GST класе омега могу значајно допринети напредовању ових тумора, утичући на капацитет ћелија за пролиферацију, али и на одговор на терапију. У нашем истраживању је први пут показан и прогностички значај глутатион трансфераза класе омега у карциному прелазног епитела мокраћне бешике. Нека будућа истраживања, којима би се објаснила корелација између GSTO генотипа и фенотипа (одређивање експресије GSTO2 протеина и дехидроаскорбат редуктазне активности), као и мерење концентрације аскорбинске киселине у овом карциному су неопходна како би се објаснила чињеница да су болесници са инвазивним карциномом мокраћне бешике који су били носиоци варијантног *GSTO2**G/G генотипа били под 3,9 пута већим ризиком за настанак смртног исхода у поређењу са носиоцима барем једног *GSTO2**A алела. Даље, носиоци *GSTO1**A/A генотипа су били под 2,9 пута већим ризиком за настанак смртног исхода, него болесници носиоци барем једног *GSTO1**C алела. Једно од потенцијалних објашњења прогностичког значаја ових полиморфизама, поред већ наведених улога у апототским процесима, антиоксидативној одбрани и регулацији редокс равнотеже у карциному мокраћне бешике, налазе се у резултатима последњих истраживања, који пружају додатну потпору улози запаљенског процеса у овом тумору указујући на значајну улогу *GSTO1*-1 у инфламаторном одговору. Escobar-García DM. и сарадници (2012) су показали да је полиморфизам *GSTO1* rs 4925 повезан са појачаном експресијом гена који кодирају интерлеукин-8 (IL-8) и Araf-1 углавном код хетерозигота, док је други функционални *GSTO1* E208K полиморфизам (rs 7077635) био повезан са повишеном експресијом IL-8 и TGF- β гена. Такође, сматра се да је *GSTO1*-1 ензим укључен и у активацију проинфламаторног цитокина, интерлеукина-1 β , који регулише експресију IL-8. Повећана експресија IL-8 и/или његових рецептора је уочена у различитим туморским ћелијама, ендотелијалним ћелијама, инфилтрирајућим неутрофилима и тумор-асоцираним макрофагима, указујући на то да IL-8 функционише као значајан регулаторни фактор унутар туморског микроокружења. Наиме, IL-8-посредована индукција више сигналних путева (a) утиче на генску експресију регулацијом активности различитих

транскрипционих фактора, (б) модулира ћелијски протеом на нивоу транслације, и/или (ц) утиче на организацију ћелијског цитоскелета путем посттранслационе регулације регулаторних протеина. Као последица различитости ефектора, стимулацијом сигналних путева посредованих IL-8 долази до ангиогених одговора у ендотелијалним ћелијама, повећава се пролиферација и преживљавање ендотелијалних и туморских ћелија, а потенцира миграцију туморских ћелија, ендотелијалних ћелија и инфилтрирајућих неутрофила на месту тумора. Уз то, показано је да стресом и лековима индукован IL-8 сигналинг има улогу у хемотерапијској резистенцији туморских ћелија (Waugh DJ. и сар, 2008). Даље, показано је да IL-8 има значаја у процени постојања метастаза код карцинома мокраћне бешике (Inoue K. и сар, 2000). Наши резултати говоре о статистички значајно вишој концентрацији IL-8 у туморском ткиву у односу на морфолошки неизмењени уроепителијум. Даље, ми смо показали да је концентрација IL-8 у ткиву тумора мокраћне бешике пропорционално расла, како са порастом степена малигнитета тумора, тако и са инвазивношћу тумора. Имајући у виду овакве резултате и резултате других научних група (Waugh DJ. и сар, 2008), намеће се закључак да би потенцијална инхибиција IL-8 сигналног пута могла дати значајне резултате у терапији карцинома мокраћне бешике, као и да би требало испитати GSTO1-1 заједно са осталим познатим показатељима за рану детекцију и прогнозу карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.

У том смислу, ови полиморфизми могу утицати и на разлике у индивидуалном одговору ових болесника на примењени цитостатски терапијски протокол, који се користи у терапији карцинома мокраћне бешике. Важно је нагласити да је полиморфизам *GSTO2* гена, за разлику од полиморфизма *GSTO1*, имао значајан утицај на преживљавање болесника са инвазивним карциномом мокраћне бешике, који су примили хемотерапију. Наиме, болесници који су били носиоци варијантног *GSTO2**G алела су 2 пута краће живели у поређењу са носиоцима барем једног *GSTO2**A алела. Овакав резултат говори у прилог нашој хипотези о антитуморској улози аскорбинске киселине у карциному прелазног епитела мокраћне бешике и у сагласности је са налазима Catani и сарадника (2002), који су показали да аскорбинска киселина

повећава антинеопластично дејство цисплатине, тиме повећавајући степен апоптозе туморских ћелија. Још више податка о потенцијалној примени аскорбинске киселине у терапеутске сврхе у различитим туморима су описали Li Y. и Schellhorn HE. у свом ревијском раду (2007). Аутори наводе да интравенска примена витамина C, за разлику од оралне примене, води високим концентрацијама овог витамина у организму што утиче на смањење прогресије тумора. Паралелено са клиничким студијама, у току су и бројне експерименталне студије које као циљ имају истраживање механизма којим витамин C постиже антитуморски ефекат испитујући његову антиоксидативну и прооксидативну функцију, потенцијалну улогу у преносу сигнала, генској експресији и метастази тумора (Li Y. и Schellhorn HE, 2007).

У овом истраживању је по први пут описана експресија GSTO1 на нивоу информационе РНК и протеина у карциному прелазног епитела мокраћне бешике. Наиме, поред резултата, који говоре о повишеној експресији GSTO1-1 у карциному прелазног епитела мокраћне бешике у односу на околни неизмењени уроепителијум, наши резултати указују и на пораст активности овог ензима са порастом хистопатолошког градуса и инвазивношћу тумора. Поред сличних резултата који су добијени у карциному сквамозног епитела једњака (Li Y. и сар, 2014), прогностичка улога повећане експресије GSTO1-1 је показана и у узорцима премалигне лезије Баретовог једњака (Piaggi S. и сар, 2009). Дакле, појачана експресија GSTO1 у карциному прелазног епитела мокраћне бешике наглашава његову потенцијално значајну улогу у ћелијском редокс потенцијалу овог тумора, што може имати велики утицај на раст и прогресију тумора.

Наши резултати о повећаној концентрацији глутатиона у туморском ткиву у поређењу са нетуморским ткивом потврђују да постоји поремећај глутатионске хомеостазе у карциному прелазног епитела мокраћне бешике, што је примећено већ у неким нашим ранијим истраживањима и истраживањима других научних група (Savic-Radojevic A. и сар, 2007). Оно што привлачи пажњу је чињеница да је у овом истраживању показан нижи степен S-глутатионилације у узорцима карцинома прелазног епитела мокраћне бешике у односу на нетуморско ткиво. Слични резултати

су добијени и анализом другог уролошког тумора, карцинома простате, где је степен глутатионилације тумор супресорног p53 протеина био значајно нижи у узорцима туморског ткива у односу на морфолошки неизмењено ткиво простате, како у оквиру једног узорка тако и међу различитим узорцима (Yusuf MA. и сар, 2010).

Ослањајући се на недавно истраживање Menon-а и сарадника о улози коју GSTO1-1 има у процесу глутатионилације (Menon D. и Board PG, 2013), претпоставили смо да би повећана деглутатионилациона активност GSTO1 у туморском ткиву могла допринети укупном процесу деглутатионилације, што би све могло довести до смањеног степена укупне S-глутатионилације. Све до сада, регулаторна улога глутатионилације (редукција протеин-глутатион мешовитих дисулфида, протеин-SSG) у редокс сигналној трансдукцији је испитивана узимајући у обзир највише глутаредоксине, као примарне деглутатионилишуће ензиме у ћелији (Yusuf MA. и сар, 2010). Штавише, показано је манипулација активношћу овог ензима утиче на нисходне сигналне догађаје мењањем статуса глутатионилације протеина у ћелији (Yusuf MA. и сар, 2010). Међу потенцијалним кандидатима у ћелијама карцинома прелазног епитела мокраћне бешике који би били подложни редокс регулацији, препознали смо глутатион трансферазу P1(GSTP1), за коју се зна да је појачано експримирана у овом карциному, што је показано како у нашој ранијој, тако и у студији Berendsen и сарадника (Savic-Radojevic A. и сар, 2007; Berendsen CL. и сар, 2000). Овај високо експримиран туморски протеин има могло би се рећи интригантну антиапоптоску улогу која се може објаснити његовим протеин:протеинским интеракцијама са c-Jun NH₂-терминалном киназом (JNK) (Simic T. и сар, 2009). Изгледа да GSTP1-1 представља важну везу између ћелијског редокс потенцијала и регулације киназних путева укључених у апоптозу. У молекуларној основи тога како оксидативни стрес доводи до промене преноса сигнала и зашто GSTP1 представља молекуларни прекидач у регулацији редокс статуса би могао бити управо процес S-глутатионилације. Заиста, тек недавно су Tew и сарадници показали да S-глутатионилација значајно утиче на GSTP1:JNK интеракцију, што води дисоцијацији овог комплекса (Tew KD. и сар, 2011) Нашим ранијим истраживањима је потврђено да ова интеракција постоји како у 5637

ћелијској линији карцинома бешике, тако и туморском ткиву карцинома прелазног епитела мокраћне бешике (Pljesa-Ercegovac M. и сар, 2010). Посматрано на молекуларном нивоу, наши резултати нуде потврду регулаторне улоге S-глутатионилације у протеин:протеинским интеракцијама као што је GSTP1:JNK интеракција тиме намећући важну улогу коју деглутатионилишући ензими, као што је GSTO1-1, имају у резистенцији ових тумора на апоптозу.

С друге стране, иако не постоје подаци да ли су лекови који се користе у хемотерапији карцинома прелазног епитела мокраћне бешике истовремено и супстрати за GSTO1-1, на основу наших резултата повећане експресије GSTO1-1 у овом карциному, заједно са њеном потенцијалном "антиапоптотском" улогом (Piaggi S. и сар, 2010), може бити значајана када се разматра способност ових тумора да развију резистенцију на лек. Наиме, и MVAC (метотрексат, винбластин, доксорубицин и цисплатина) и GC/Cis (гемцитабин и цисплатина) протоколи, који се користе у лечењу болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике садрже цисплатину (Witjes JA и сар, 2014). Резистенција ових тумора на хемотерапијске протоколе који садрже цисплатину је чест проблем на који се наилази у клиничкој пракси. Најновија истраживања су подстакла расправу о резистенцији на цисплатину, али и о високој токсичности овог лека с обзиром да се не везује само за ДНК. Наиме, познато је да је само 5-10% интраћелијске концентрације цисплатине пронађено у ДНК фракцији, док се осталих 75-85% везује за нуклеофилна места на протеинима који садрже тиол групе, као и за репликационе ензиме и РНК (Gómez-Ruiz S. и сар, 2012). Претпоставља се да би поремећаји у редокс статусу туморских ћелија могли утицати на овај процес кроз промене у глутатионилационој/деглутатионилационој равнотежи, при чему висока концентрација тиол група фаворизују везивање цисплатине за протеине. Упркос тешкоћама у овој области које се односи на сложеност биохемијских путева, разумевање односа између редокс хомеостазе и прогресије карцинома прелазног епитела мокраћне бешике би могло довести до развоја лекова који би могли да интерагују са таквим молекуларним процесима, тиме проширујући терапеутску стратегију против овог карцинома.

Наши резултати нуде основу за развијање концепта да висока експресија GSTO1 у карциному прелазног епитела мокраћне бешике може бити значајна за развијање агресивног фенотипа, пре свега због новооткривене улоге овог ензима у процесу деглутатионилације, која би могла доприносити поремећају редокс равнотеже присутне у овом тумору. У будућности, испитивање GSTO1 експресије би се могло користити као додатни молекуларни маркер у идентификовању пацијента код којих је ризик за прогресију тумора повећан. Поред тога, на основу добијених резултата намеће се закључак да би функционални GSTO полиморфизми могли имати прогностичку и/или фармакогеномску улогу код болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике, чиме би се постигло успешније лечење кроз индивидуални приступ болеснику.

6 ЗАКЉУЧЦИ

На основу приказаних резултата могу се извести следећи закључци:

- ❖ Резултати овог рада су потврдили да су пушење и професионална изложеност хемијским агенсима независни фактори ризика за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике
 - Пушачи су имали 2,6 пута већи ризик да оболе од карцинома мокраћне бешике у односу на непушаче
 - Особе које су професионално изложене хемијским канцерогенима су имале 2,4 пута већи ризик да оболе од карцинома прелазног епитела мокраћне бешике у односу на неизложене особе
- ❖ Присуство *GSTO1**C/*GSTO2**G хаплотипа је удружено са повећаним ризиком за настанак карцинома прелазног епитела мокраћне бешике.
 - Болесници носиоци *GSTO1**C/*GSTO2**G хаплотипа су били под 2,8 пута већим ризиком да оболе од карцинома мокраћне бешике у односу на носиоце *GSTO1**C/*GSTO2**A хаплотипа
- ❖ Ризик за настанак карцинома прелазног епитела је израженији код пушача, носилаца варијантног *GSTO2**G/G генотипа
 - Пушачи носиоци *GSTO2**G/G генотипа су били под 4,3 пута већим ризиком да оболе од карцинома мокраћне бешике у односу на непушаче носиоце *GSTO2**AA+*GSTO2**AG генотипа
- ❖ Није уочен ефекат појединачних *GSTO1* и *GSTO2* генотипова, као ни комбинованог *GSTO1*/*GSTO2* генотипа на степен оксидативног оштећења ДНК
 - Концентрација уринарног 8-OHdG, биомаркера оксидативног оштећења ДНК код болесника са карциномом прелазног епитела је била знатно виша у односу на контроле

- ❖ Функционални GSTO1 и GSTO2 полиморфизми могу имати прогностичку и/или фармакогеномичку улогу код болесника са прелазним епителом мокраћне бешике, посебно код оних са инвазивним туморима.
 - Варијантни, *GSTO1**A/A или *GSTO2**G/G генотипови су били независни предиктори укупног ризика за смртни исход болесника са инвазивним карциномом прелазног епитела мокраћне бешике и значајно су утицали на преживљавање ових болесника
 - Значајан утицај на преживљавање болесника који су примали хемотерапију је показан једино за *GSTO2* полиморфизам
- ❖ У туморском ткиву експресија и тиолтрансферазна активност GSTO1-1 је била повећана у поређењу са околним нетуморским ткивом болесника са карциномом прелазног епитела мокраћне бешике
 - Експресија GSTO1-1 је била око 2,3 пута веће у туморском у односу на нетуморско ткиво
 - Активност и експресија GSTO1-1 су значајно корелирале са градусом и инвазивношћу тумора
- ❖ Експресија интерлеукина-8 у карциному прелазног епитела мокраћне бешике је била виша у односу на околни неизмењени уроепителијум и значајно је корелирала са малигним фенотипом тумора
- ❖ На основу измењеног односа редукованог и оксидованог глутатиона, као и снижене глутатионилације у туморском ткиву може се закључити да у карциному прелазног епитела постоји изражен поремећај редокс равнотеже.
 - Узимајући у обзир деглутатионилациону каталитичку активност GSTO1-1, повећана експресија овог ензима би могла бити у основи снижене глутатионилације у туморском ткиву у односу на околни неизмењени уроепителијум.

7 СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

8-OHdG	8-хидроксидеоксигуанозин
Akt	Протеин киназа Б
Apaf-1	(енгл. <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>)
CarboMV	карбоплатина, метотрексат, винбластин
CI	интервал поверења (енгл. <i>confidence interval</i>)
CLIC 1-5	протеини хлоридног јонског канала (енгл. <i>Chloride Intracellular Channel</i>)
CM	цисплатина, метотрексат
CMV	цисплатина, метотрексат, винбластин
CRIDs	лекови који блокирају отпуштање цитокина (енгл. <i>cytokine release inhibitory drugs</i>)
Ct	циклус PCR-а у ком флуоресценца пређе ниво прага (енгл. <i>threshold cycle</i>)
EDTA	етилен диамино тетра цирћетна киселина
ELISA	ензимски имуноесеј (енгл. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ERK	киназа регулисана екстрацелуларним сигналинама (енг. <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>)
Gc/Cis	гемцитабин/цисплатина
Grx	глутаредоксин
GSH	редуковани глутатион
GSSG	оксидовани глутатион
GST	глутатион трансфераза
GSTA1	глутатион трансфераза алфа 1
GSTM1	глутатион трансфераза ми 1
GSTO1	глутатион трансфераза омега 1
GSTO2	глутатион трансфераза омега 2
GSTP1	глутатион трансфераза пи 1

GWAS	студије асоцијације у читавом геному (енгл. <i>Genome-Wide Association Studies</i>)
HAF	фактор повезан са хипоксијом (енгл. <i>hypoxia-associated factor</i>)
HEDS	хидроксиетилдисулфид
HIF	хипоксија индуцибилни фактор (енгл. <i>hypoxia-inducible factor</i>)
HR	<i>Hazard ratio</i>
IL-1 β	интерлеукин-1 β
IL-8	интерлеукин-8
JNK	c-Jun N-терминална киназа
LD	неравнотежа везаности (енгл. <i>linkage disequilibrium</i>)
MAPEG	мембрански протеини укључени у метаболизам еикосаноида и глутатиона (енг. <i>Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism</i>)
MAPK	митогеном активирани протеин киназе (енг. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MVA(E)C	метотрексат, винбластин, адриаамин (епирубицин), цисплатина
NADPH	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NaF	натријум флуорид
NAT	N-ацетилтрансфераза
NF- κ B	једарни фактор капа активираних В лимфоцита (енг. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
OR	однос шанси (енг. <i>odds ratio</i>)
PAH	полициклични ароматични угљоводоници (енг. <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
PCR	реакција ланчаног умножавања (енгл. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	анализа производа рестрикционе дигестије ДНК фрагмената насталих реакцијом ланчаног умножавања (енг. <i>PCR - restriction fragment length polymorphism</i>)

PIC	протеаза инхибиторни коктел (енгл. <i>protease inhibitor cocktail</i>)
RT-PCR	реакција ланчаног умножавања у реалном времену (енгл. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
RyR	ријанодински рецептор
SD	стандардна девијација
SNP	полиморфизам једног нуклеотида (енг. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
\bar{x}	средња вредност
TCC	карцином прелазног епитела
TGF- β	трансформишући фактор раста бета (енг. <i>transforming growth factor beta</i>)
ДНК	деоксирибонуклеинска киселина
ДХАР	дехидроаскорбат редуктазна активност
иРНК	информациона рибонуклеинска киселина

8 ЛИТЕРАТУРА

- Abdollah F, Gandaglia G, Thuret R, et al. Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis. *Cancer Epidemiol* 2013;37(3):219-225.
- Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 1999;18(5):1321-1334.
- Allen M, Zou F, Chai HS, Younkin CS, Miles R, et al. (2012) Glutathione S-transferase omega genes in Alzheimer and Parkinson disease risk, age-at-diagnosis and brain gene expression: an association study with mechanistic implications. *Mol Neurodegener* 7: 13.
- Berendsen CL, Mulder TP, Peters WH. Plasma glutathione S-transferase pi 1-1 AND alpha 1-1 levels in patients with bladder cancer. *J Urol.* 2000;164(6):2126-2128.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermini LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24798-24806.
- Board PG, Coggan M, Watson S, Gage PW, Dulhunty AF. CLIC-2 modulates cardiac ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1599-1612.
- Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3267-3288.
- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997; 8(3):444-472.
- Booth J, Boyland E, Sims P. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione, *Biochem. J.* 1961;79:516-524.

- Boyland E, Chasseaud LF. Enzymes catalysing conjugations of glutathione with alpha-beta-unsaturated carbonyl compounds, *Biochem. J.* 1968;109:651–661.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000;86(2):289-294.
- Burger M, Catto JW, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013;63(2):234-241.
- Castro-Caldas M, Carvalho AN, Rodrigues E, Henderson C, Wolf CR, Gama MJ. Glutathione S-transferase pi mediates MPTP-induced c-Jun N-terminal kinase activation in the nigrostriatal pathway. *Mol Neurobiol.* 2012;45(3):466-477.
- Catani MV, Costanzo A, Savini I, Levrero M, de Laurenzi V, et al. Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochem J* 2002;364 (Pt 2): 441-447.
- Chen JH, Ni RZ, Xiao MB, et al. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in human pancreatic cancer tissue. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 193-200.
- Chopin D.K., Gattegno B. Superficial bladder tumors. *E Urol*, 2002; 42: 533-541.
- Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, et al. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol* 2006;174(1):107-110.
- Chung CJ, Huang CJ, Pu YS, Su CT, Huang YK, Chen YT, et al. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and urothelial carcinoma risk in low arsenic exposure area. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226:14-21.
- Chung CJ, Pu YS, Su CT. Gene polymorphisms of glutathione S-transferase omega 1 and 2, urinary arsenic methylation profile and urothelial carcinoma. *Sci Total Environ* 2011; 409: 465-470.
- Cohen SM, Goel A, Phillips J, et al. The role of perioperative chemotherapy in the treatment of urothelial cancer. *Oncologist* 2006;11(6):630-640.

- Coll RC, Robertson A, Butler M, Cooper M, O'Neill LA. The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. PLoS One. 2011;6(12):e29539.
- Combes B, Stakelum GS. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione, J. Clin. Invest. 1961; 40: 981–988.
- Cooper AJ, Pinto JT, Callery PS. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2011;7(7):891-910.
- Cote RJ and Datar RH. Therapeutic approach to bladder cancer: identifying targets and mechanisms. Clin Rev in Oncol, 2003; 46:S67-S83.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. Trends Biochem Sci. 2009;34(2):85-96.
- Dash A, Pettus JA 4th, Herr HW, Bochner BH, Dalbagni G, Donat SM, Russo P, Boyle MG, Milowsky MI, Bajorin DF. A role for neoadjuvant gemcitabine plus cisplatin in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a retrospective experience. Cancer. 2008;113(9):2471-2477.
- David KA, Milowsky MI, Ritchey J, Carroll PR, Nanus DM. Low incidence of perioperative chemotherapy for stage III bladder cancer 1998 to 2003: a report from the National Cancer Data Base. J Urol. 2007;178(2):451-454.
- de Luca A, Moroni N, Serafino A, Primavera A, Pastore A, Pedersen JZ, Petruzzelli R, Farrace MG, Pierimarchi P, Moroni G, Federici G, Sinibaldi Vallebona P, Lo Bello M. Treatment of doxorubicin-resistant MCF7/Dx cells with nitric oxide causes histone glutathionylation and reversal of drug resistance. Biochem J. 2011;440(2):175-183.
- Djukic TI, Savic-Radojevic AR, Pekmezovic TD, Matic MG, Pljesa-Ercegovac MS, Coric VM et al. Glutathione S-transferase T1, O1 and O2 polymorphisms are associated with survival in muscle invasive bladder cancer patients. PLoS One. 2013;8(9):e74724

- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem.* 2001;276(5):3319-3323.
- Escobar-García DM, Del Razo LM, Sanchez-Peña LC, Mandeville PB, Lopez-Campos C, Escudero-Lourdes C. Association of glutathione S-transferase Ω 1-1 polymorphisms (A140D and E208K) with the expression of interleukin-8 (IL-8), transforming growth factor beta (TGF- β), and apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) in humans chronically exposed to arsenic in drinking water. *Arch Toxicol.* 2012;86(6):857-868.
- Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, Breinl E, Merseburger AS, Shariat SF. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J Urol.* 2011;29(4):457-463.
- Filiadis I, Hrouda D. Genetic factors in chemically-induced transitional cell bladder cancer. *BJU Int.* 2000;86:794-801.
- Findlay VJ, Townsend DM, Morris TE, Fraser JP, He L, Tew KD. A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. *Cancer Res.* 2006;66(13):6800-6806.
- Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* 2009;16(10):1303-1314.
- Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Villa P, Eberini I, Vandekerckhove J, Gianazza E, Ghezzi P. Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics.* 2003;3(7):1154-1161.
- Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011;306(7):737-745.
- Gandini S, Botteri E, Iodice S, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2008;122(1):155-164.
- Garcia-Closas M, Rothman N, Figueroa JD, et al. Common genetic polymorphisms modify the effect of smoking on absolute risk of bladder cancer. *Cancer Res*

2013;73(7):2211-2220.

- Gilge JL, Fisher M, Chai YC. The effect of oxidant and the non-oxidant alteration of cellular thiol concentration on the formation of protein mixed-disulfides in HEK 293 cells. PLoS One. 2008;3(12):e4015.
- Gómez-Ruiz S, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluđerović GN. On the discovery, biological effects, and use of Cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. BioinorgChem Appl. 2012;2012:140284.
- Gong M, Dong W, An R. Glutathione S-transferase T1 polymorphism contributes to bladder cancer risk: a meta-analysis involving 50 studies. DNA Cell Biol 2012;31(7):1187-1197.
- Greetham D, Vickerstaff J, Shenton D, Perrone GG, Dawes IW, Grant CM. Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Biochem. 2010;11:3.
- Guan Z, Ding C, Du Y, Zhang K, Zhu JN, Zhang T, He D, Xu S, Wang X, Fan J. HAF drives the switch of HIF-1 α to HIF-2 α by activating the NF- κ B pathway, leading to malignant behavior of T24 bladder cancer cells. Int J Oncol. 2014;44(2):393-402.
- Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM, Jakoby WB. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974;71(10):3879-3882.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974;249(22):7130-7139.
- Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J. 2007;401:1-11.
- Harling M, Schablon A, Schedlbauer G, Dulon M, Nienhaus A. Bladder cancer among hairdressers: a meta-analysis. Occup Environ Med. 2010;67(5):351-358.
- Hayano T, Inaka K, Otsu M, Taniyama Y, Miki K, Matsushima M, Kikuchi M. PDI and glutathione-mediated reduction of the glutathionylated variant of human lysozyme. FEBS Lett. 1993;328(1-2):203-208.

- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.
- Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000; 61: 154-166.
- Hill BG, Bhatnagar A. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(3):559-567.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004;83:1-1438.
- Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, Radinsky R, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res.* 2000;60(8):2290-2299.
- Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, Pettersson F, Langmark F, Pedersen D, Prior P, Neal F, Karjalainen S, Bell J, et al. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 1995; 63(1):1-6.
- Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, Pettersson F, Langmark F, Pedersen D, Prior P, Neal F, Karjalainen S, Bell J, et al. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 1995; 63(1):1-6.
- Karagas MR, Park S, Warren A, Hamilton J, Nelson HH, Mott LA, Kelsey KT. Gender, smoking, glutathione-S-transferase variants and bladder cancer incidence: a population-based study. *Cancer Lett* 2005; 219(1):63-69.
- Ketterer B, Christodoulides L, Enderby G, Tipping E. Mercapturic acid biosynthesis: the separate identities of glutathione-S-aryl chloride transferase and ligandin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;57(1):142-147.
- Kiemeny LA, Thorlacius S, Sulem P, et al. Sequence variant at 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 2008; 40(11):1307-1312.
- Kleinerman RA, Boice JD Jr, Storm HH, Sparen P, Andersen A, Pukkala E, Lynch CF, Hankey BF, Flannery JT. Second primary cancer after treatment for cervical cancer. An international cancer registries study. *Cancer.* 1995;76(3):442-452.

- Laliberte RE, Perregaux DG, Hoth LR, Rosner PJ, Jordan CK, Peese KM, Egglar JF, Dombroski MA, Geoghegan KF, Gabel CA. Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16567-16578.
- Lesseur C, Gilbert-Diamond D, Andrew AS, Ekstrom RM, Li Z, Kelsey KT, Marsit CJ, Karagas MR. A case-control study of polymorphisms in xenobiotic and arsenic metabolism genes and arsenic-related bladder cancer in New Hampshire. *Toxicol Lett.* 2012;210(1):100-106.
- Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 2007;137(10):2171-2184.
- Li Y, Zhang Q, Peng B, Shao Q, Qian W, Zhang JY. Identification of glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1) protein as a novel tumor-associated antigen and its autoantibody in human esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2014;35(11):10871-10877.
- Lind C, Gerdes R, Hamnell Y, Schuppe-Koistinen I, von Löwenhielm HB, Holmgren A, Cotgreave IA. Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch Biochem Biophys.* 2002;406(2):229-240.
- Lindahl M, Mata-Cabana A, Kieselbach T. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(12):2581-2642.
- Litwack G, Ketterer B, Arias IM. Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature.* 1971;234(5330):466-467.
- Liu D, Hewawasam R, Pace SM, Gallant EM, Casarotto MG, Dulhunty AF, Board PG. Dissection of the inhibition of cardiac ryanodine receptors by human glutathione transferase GSTM2-2. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(7):1181-1193.
- Lock JT, Sinkins WG, Schilling WP. Effect of protein S-glutathionylation on Ca²⁺

homeostasis in cultured aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(2):H493-506.

- Lower GM Jr. Concepts in causality: chemically induced human urinary bladder cancer. *Cancer* 1982; 49(5):1056-66.
- Malins DC, Haimanot R. Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res.* 1991;51:5430–5432.
- Marahatta SB, Punyarit P, Bhudisawasdi V, Paupairoj A, Wongkham S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett.* 2006;236(2):276-281.
- Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H, Omae K, et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett.* 2000;151:87-95.
- McGrath M, Michaud DS, De Vivo I. hormonal and reproductive factors and the risk of bladder Cancer in women. *Am J Epidemiol.* 2006;163(3):236-244.
- Menon D, Board PG. A role for glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle. *J Biol Chem.* 2013;288(36):25769-25779.
- Mieczal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, Shelton MD. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(11):1941-1988.
- Mukherjee B, Salavaggione OE, Pelleymounter LL. isar. Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 1237-1246.
- Murta-Nascimento C, Silverman DT, Kogevinas M, et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(8):1595-1600.
- Neugut AI, Ahsan H, Robinson E, Ennis RD. Bladder carcinoma and other second malignancies after radiotherapy for prostate carcinoma. *Cancer* 1997; 79(8):1600-4.
- Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract.* 2002;10(6):311-322.

- Piacentini S, Monaci PM, Polimanti R, Manfellotto D, Fuciarelli M. GSTO2*N142D gene polymorphism associated with hypothyroidism in Italian patients. *MolBiol Rep.* 2013;40(2):1967-1971.
- Piaggi S, Marchi S, Ciancia E, Debortoli N, Lazzarotti A, Saviozzi M et al. Nuclear translocation of glutathione transferase omega is a progression marker in Barrett's esophagus. *Oncol Rep.* 2009;21(2):283-287.
- Piaggi S, Raggi C, Corti A, Pitzalis E, Mascherpa MC, Saviozzi M et al. Glutathione transferase omega 1-1 (GSTO1-1) plays an anti-apoptotic role in cell resistance to cisplatin toxicity. *Carcinogenesis.* 2010;31(5):804-811.
- Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Dragicevic D, Mimic-Oka J, Matic M, Sasic T, Pekmezovic T, Vuksanovic A, Simic T. Enhanced GSTP1 expression in transitional cell carcinoma of urinary bladder is associated with altered apoptotic pathways. *UrolOncol* 2011;29(1):70-77.
- Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Mimic-Oka J, Simic T. Co-localization of GSTP1 and JNK in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Genet Mol Biol.* 2010;33(3):460-462.
- Ploeg M, Aben KK, Kiemeney LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 2009;27(3):289-293.
- Ravindranath V. Animal models and molecular markers for cerebral ischemia-reperfusion injury in brain. *Methods Enzymol.* 1994;233:610-619.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49:1603–1616.
- Rothman N, Garcia-Closas M, Chatterjee N, et al. A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42(11): 978-984.
- Rushton L, Bagga S, Bevan R, et al. Occupation and cancer in Britain. *Br J Cancer.* 2010;102:1428-1437.
- Savic-Radojevic A, Djukic T, Simic T, Pljesa-Ercegovac M, Dragicevic D, Pekmezovic T, Cekerevac M, Santric V, Matic M. GSTM1-null and GSTA1-low

activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage in bladder cancer. Redox Rep. 2013;18(1):1-7.

- Savic-Radojevic A, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Opacic M, Dragicevic D, Kravic T, Djokic M, Micic S, Simic T. Glutathione S-transferase-P1 expression correlates with increased antioxidant capacity in transitional cell carcinoma of urinary bladder. EurUrol 2007;52(2):470-477.
- Schmuck EM, Board PG, Whitbread AK, Tetlow N, Cavanaugh JA, Blackburn AC, Masoumi A. Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Pharmacogenet Genomics. 2005;15(7):493-501.
- Schrier B, Hollander M, Bas WG, et al. Prognosis of muscle-invasive bladder cancer: Difference between primary and progressive tumors and implications for therapy. EurUrol 2004; 45:292-296.
- Scosyrev E, Noyes K, Feng C, et al. Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. Cancer. 2009;115(1):68-74.
- Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ. Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. Antioxid Redox Signal. 2005;7(3-4):348-366.
- Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. Cancer 2007;109:574-550.
- Sherif A, holmberg L, Rintala E, et al. Nordic Urothelial Cancer Group. Neoadjuvant cisplatinum based combination chemotherapy in patients with invasive bladder cancer: a combined analysis of two Nordic studies. Eur Urol 2004;45(3):297-303.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013;63(1):11-30.
- Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Mimic-Oka

- J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *J Nat Rev Urol* 2009; 6(5):281-289.
- Soini Y, Haapasari KM, Vaarala MH, Turpeenniemi-Hujanen T, Kärjä V, Karihtala P. 8-hydroxydeguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma. *Int J ClinExpPathol.* 2011;4:267-275.
 - Stamenkovic M, Radic T, Stefanovic I, Coric V, Sencanic I, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Jaksic V, Simic T, Savic-Radojevic A. Glutathione S-transferase omega-2 polymorphism Asn142Asp modifies the risk of age-related cataract in smokers and subjects exposed to ultraviolet irradiation. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2014;42(3):277-283.
 - Stenzl A. Words of wisdom. Re: sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Eur Urol.* 2010;57(4):729.
 - Stonehill WH, Dmochowski RR, Patterson AL, Cox CE. Risk factors for bladder tumors in spinal cord injury patients. *J Urol* 1996; 155(4):1248-50.
 - Sylvester R, Sternberg C. The role of adjuvant combination chemotherapy after cystectomy in locally advanced bladder cancer: what we do not know and why. *Ann Oncol.* 2000;11(7):851-896.
 - Terentyev D, Györke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, de Blanco EC, Khanna S, Sen CK, Cardounel AJ, Carnes CA, Györke S. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in chronic heart failure. *Circ Res.* 2008;103(12):1466-1472.
 - Tew KD, Manevich Y, Grek C, Xiong Y, Uys J, Townsend DM. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free RadicBiol Med.* 2011;51(2):299-313.
 - Tew KD, Townsend DM. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17: 1728-177.
 - Thier R, Golka K, Brüning T, Ko Y, Bolt HM. Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts. *Toxicol Lett.* 2002;127(1-3):321-

327.

- Tian W, Wang Y, Xu Y, Guo X, Wang B, Sun L, Liu L, Cui F, Zhuang Q, Bao X, Schley G, Chung TL, Laslett AL, Willam C, Qin B, Maxwell PH, Esteban MA . The hypoxia-inducible factor renders cancer cells more sensitive to vitamin C-induced toxicity. *J BiolChem* 2014; 289(6):3339-3351.
- Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369-7375.
- Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free RadicBiol Med* 2011;51(5):1000-1013.
- Tung MC, Wang YH, Yeh SD, Wu CC, Chen KC, Huang ZM, Huang MT, Chiou HY. Combined effects of GSTO1 and SULT1A1 polymorphisms and cigarette smoking on urothelial carcinoma risk in a Taiwanese population. *J Formos Med Assoc*. 2014;113(9):640-647.
- Tuttle TM, Williams GM, Marshall FF. Evidence for cyclophosphamide-induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient. *J Urol*. 1988;140(5):1009-1011.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6:445-462.
- Velu CS, Niture SK, Doneanu CE, Pattabiraman N, Srivenugopal KS. Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry*. 2007;46(26):7765-7780.
- Wallace L, Pellizzari E, Hartwell TD, Perritt R, Ziegenfus R. Exposures to benzene and other volatile compounds from active and passive smoking. *Arch Environ Health* 1987; 42(5):272-279.
- Wang YH, Yeh SD, Shen KH, Shen CH, Juang GD, Hsu LI, Chiou HY. and Chen CJ. A significantly joint effect between arsenic and occupational exposures and risk genotypes/diplotypes of CYP2E1, GSTO1 and GSTO2 on risk of urothelial

- carcinoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009;241:111-118.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735-6741.
 - Weistenhofer W, Blaszkewicz M, Bolt HM, Golka K. N-acetyltransferase-2 and medical history in bladder cancer cases with a suspected occupational disease (BK 1301) in Germany. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(13-14):906-910.
 - Whitbread AK, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board PG. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2005;401:78-99.
 - Witjes JA, Compérat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebre T, Ribal MJ, Van der Heijden AG, Sherif A; European Association of Urology. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol.* 2014;65(4):778-792.
 - Xu Y, Li X, Zheng Q, Wang H, Wang Y, Sun G. Lack of association of glutathione-S-transferase omega 1(A140D) and omega 2 (N142D) gene polymorphisms with urinary arsenic profile and oxidative stress status in arsenic-exposed population. *Mutat Res.* 2009;679(1-2):44-49.
 - Yin ZL, Dahlstrom JE, Le Couteur DG, Board PG. Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(8):983-987.
 - Yu H, Xia Q, Yan J, Herreno-Saenz D, Wu YS, Tang IW, et al. Photoirradiation of polycyclic aromatic hydrocarbons with UVA light - a pathway leading to the generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Int J Environ Res Public Health.* 2006;3:348-354.
 - Yuh BE, Ruel N, Wilson TG, et al. Pooled analysis of clinical outcomes with neoadjuvant cisplatin and gemcitabine chemotherapy for muscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2013;189(5):1682-1686.
 - Yusuf MA, Chuang T, Bhat GJ, Srivenugopal KS. Cys-141 glutathionylation of human p53: Studies using specific polyclonal antibodies in cancer samples and cell

lines. Free RadicBiol Med. 2010;49(5):908-917.

- Zhang J, Liu Z, Masumiya H, Wang R, Jiang D, Li F, Wagenknecht T, Chen SR. Three-dimensional localization of divergent region 3 of the ryanodine receptor to the clamp-shaped structures adjacent to the FKBP binding sites. J Biol Chem. 2003;278(16):14211-14218.
- Zhou H, Brock J, Liu D, Board PG and Oakley AJ. Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases. J. Mol. Biol. 2015;420:190-203

9 БИОГРАФИЈА

Татјана Ђукић (девојачко Сашаић) је рођена 05.07.1982. године у Вировитици (СФРЈ). Основну школу и IX београдску гимназију "Михаило Петровић Алас" завршила је у Београду као ђак генерације. Студије на Медицинском факултету Универзитета у Београду започела је 2001. године, а дипломирала 2007. године са просечном оценом 9,37 (девет, тридесет и седам). У току студирања др Ђукић је била демонстратор на Катедри за биохемију Медицинског факултета у Београду (2003-2007. године), као и члан Центра за стручни и научноистраживачки рад студената (2005-2007. године). Др Ђукић је била стипендиста Министарства просвете Републике Србије (2002-2006. године), Фонда за младе таленте Републике Србије и града Београда (2006-2007. године) и Министарства науке (2007-2009. године). Докторске студије на Медицинском факултету у Београду др Ђукић је уписала 2007. године, модул Молекуларна медицина. Лекарски стаж је завршила и стручни испит положила у марту 2008. године. Специјализацију из Клиничке биохемије је уписала октобра 2009. године. На Институту за медицинску и клиничку биохемију Медицинског факултета у Београду др Ђукић се запослила 2009. године као сарадник у настави, а у звање асистента је изабрана 2011. године. Др Ђукић је ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја број ОИ175052 „Улога плутатион трансфераза у подложности за настанак обољења“ (2011-2015). Полазник је већег броја курсева континуиране медицинске едукације као и научних скупова у земљи и иностранству. Др Ђукић је у мају 2010. године била полазник школе „*High-Throughput Screens in Genome Integrity*“ (Оксфорд, Енглеска), а у јуну 2013. године је била полазник школе „*Responsible* на стручном усавршавању на Институту за патофизиологију Медицинског факултета Универзитета у Љубљани (Словенија). Поседује активно знање енглеског и француског језика.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Татјана Ђукић

број уписа 07-DS-MM-12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Повезаност полиморфизама и експресије глутатион трансфераза класе омега са
настанком и прогресијом карцинома прелазног епитела мокраћне бешике**

- 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 кршила ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

Татјана Ђукић

У Београду, 21.12.2015. године

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Татјана Ђукић
Број уписа 07-DS-MM-12
Студијски програм Молекуларна медицина
Наслов рада **Повезаност полиморфизама и експресије глутатион
трансфераза класе омега са настанком и прогресијом карцинома прелазног
епитела мокраћне бешике**
Ментор Проф. др Ана Савић-Радојевић

Потписана Татјана Ђукић

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда


У Београду, 21.12.2015. године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Повезаност полиморфизама и експресије глутатион трансфераза класе омега са настанком и прогресијом карцинома прелазног епитела мокраћне бешике
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

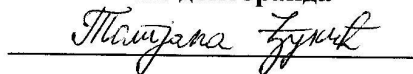
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда



У Београду, 21.12.2015. године