

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Smiljana M. Mihailović

ANALIZA GENETSKIH BIOMARKERA  
REDOKS HOMEOSTAZE KAO FAKTORA RIZIKA  
ZA NASTANAK I PROGRESIJU  
SVETLOĆELIJSKOG KARCINOMA  
BUBREŽNOG PARENHIMA

Doktorska disertacija

Beograd 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Smiljana M. Mihailović

THE ANALYSIS OF REDOX HOMEOSTASIS  
GENETIC BIOMARKERS AS RISK FACTORS  
FOR CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA  
DEVELOPMENT AND PROGRESSION

Doctoral Dissertation

Belgrade 2024

**Mentori doktorske disertacije:**

*Prof. dr Marija Plješa Ercegovac*, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

*Prof. dr Zoran Džamić*, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

*Prof. dr Tatjana Simić*, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

*Prof. dr Ana Savić Radojević*, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

*Doc. dr Vesna Ćorić*, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

*Doc. dr Dušan Paripović*, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

*Prof. dr Saša Vojinović*, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Od sveg srca zahvaljujem se:

*Prof. dr Tatjani Simić* na pruženoj prilici i poverenju da budem jedan od članova njenog istraživačkog tima i na podršci da istrajem u svom usavršavanju,

*Prof. dr Mariji Plješa Ercegovac*, mojoj mentorki i mom najvećem osloncu, na bezuslovnoj podršci tokom celog procesa učenja i rada na ovoj disertaciji, na posvećenoj energiji, motivaciji, strpljenju, i na omogućavanju da naučim sve što je potrebno za kvalitetno bavljenje naučno-istraživačkim radom,

*Prof. dr Zoranu Džamiću*, mom mentoru, na posvećenom vremenu, konsultacijama i savetima koje mi je pružio i time pomogao da ova disertacija bude realizovana,

*Doc. dr Vesni Ćorić* koja me je tokom celih studija podučavala i učila preciznom, posvećenom i pedantnom istraživačkom radu i inspirisala za sva moja stručna i lična usavršavanja,

Celom timu: *prof. dr Ani Savić-Radojević, prof. dr Mariji Matić, prof. dr Tatjani Đukić, doc. dr Sonji Šuvakov, asist. dr Đurđi Jerotić, tehničaru Sanji Sekulić*, kao i *dr Tanji Radić* i kolegici *dr Milici Đokić*, na svem znanju koje su sa mnom podelile i time pomogle u svim koracima izrade ove disertacije,

Mojim *roditeljima, Mladenu i Snežani*, celoj porodici i svim mojim prijateljima, na ljubavi, podršci, strpljenju i razumevanju koje su uvek imali za mene.

Još jednom, najlepše hvala,

Zahvaljujući vama ovo je bilo moguće.

Smiljana Mihailović

Takođe želim da se zahvalim koautorima radova napisanih na osnovu istraživanja u okviru ove doktorske disertacije:

- Kreiranje koncepta: *prof. dr Marija Plješa Ercegovac, prof. dr Zoran Džamić*
- Prikupljanje podataka: *prof. dr Dejan Dragičević, dr Vladimir Vasić*
- Formalna analiza: *doc. dr Vesna Ćorić*
- Istraživanje: *dr sci. Tanja Radić, dr Milica Đokić*
- Recenzija i uređivanje teksta: *prof. dr Marija Plješa Ercegovac, prof. dr Zoran Džamić, prof. dr Tatjana Simić, akademik prof. dr Jovan Hadži-Đokić, prof. dr Ana Savić-Radojević, prof. dr Marija Matić*

ANALIZA GENETSKIH BIOMARKERA REDOKS HOMEOSTAZE KAO FAKTORA  
RIZIKA ZA NASTANAK I PROGRESIJU SVETLOĆELIJSKOG KARCINOMA  
BUBREŽNOG PARENHIMA

SAŽETAK

Uvod: Hemijske reakcije koje se kontinuirano odvijaju na ćelijskom nivou, praćene su nepotpunom redukcijom kiseonika čime nastaju kiseonični slobodni radikali (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Njihovo prisustvo aktivira niz antioksidantnih sistema koji će raditi na uklanjanju ROS. Aktivacija nuklearnog faktora povezanog sa eritroid 2-faktorom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2), dovodi do ekspresije enzima, poput superoksid dizmutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPX) i glutation S-transferaza (GST), koji učestvuju u antioksidantnom odgovoru. Tumorska mikrosredina sa prooksidantnom aktivnošću ima veliki značaj u nastanku i daljoj progresiji svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima. Cilj ovog ispitivanja bio je da se ispita da li najčešći genetski polimorfizmi za gene *Nrf2*, *SOD2*, *GPX1* i *GSTP1* mogu imati uticaj na nastanak sKBP.

Materijal i metode: Sprovedena je genotipizacija polimorfizama *Nrf2* (rs6721961), *SOD2* (rs4880), *GPX1* (rs1050450) kao i *GSTP1* (rs1695, rs1138272) kod 223 pacijenta sa dijagnozom sKBP i 336 pripadnika kontrolne grupe, odgovarajućim metodama reakcije lančanog umnožavanja (engl. PCR). Ispitivana je povezanost pomenutih polimorfizama sa rizikom za nastanak sKBP, kao i sa fenotipskim karakteristikama tumora i postojanje udruženog efekta sa poznatim faktorima rizika za nastanak KBP. Takođe je praćeno preživljavanje pacijenata nakon učinjene hirurške resekcije tumora u periodu od 13 godina, i mogući prognostički značaj ispitivanih polimorfizama.

Rezultati: Osobe nosioci varijantnih genotipova za *SOD2* polimorfizam imaju 4,5 puta veći rizik za nastanak sKBP u odnosu na nosioce referentnog genotipa ( $p < 0,001$ ). Osobe nosioci varijantnih genotipova za *GSTP1* rs1695 polimorfizam, koje su istovremeno nosioci referentnog genotipa za rs1138272, imaju 3,2 puta veći rizik za nastanak sKBP ( $p = 0,001$ ), dok je ispitivanjem haplotipa za navedene polimorfizme pokazano da su u 3,5 puta većem riziku osobe nosioci *Val105* i *Val114* genotipa u odnosu na nosioce referentne kombinacije *Ile105* i *Ala114* ( $p = 0,004$ ). Hipertenzivni ispitanici, koji su uz to nosioci varijantnih genotipova za *SOD2*, imaju čak 12 puta veći rizik za nastanak sKBP u odnosu na referentnu grupu ( $p < 0,001$ ). Ispitivani polimorfizmi nisu predstavljali značajan prognostički faktor među pacijentima obolelim od sKBP. Međutim, nosioci varijantnih kombinacija ispitivanih *GSTP1* rs1695 i rs1138272 polimorfizama imali su kraći period preživljavanja nakon nefrektomije.

Zaključak: Pojedini polimorfizmi gena koji kodiraju antioksidantne enzime mogu biti povezani sa nastankom sKBP, posebno varijantni genotipovi *SOD2* rs4880 i varijantni genotipovi *GSTP1* rs1695 i rs1138272 polimorfizama. Rizik za nastanak sKBP se dodatno povećava kada su ovi rizični genotipovi prisutni u kombinaciji. Takođe, nosioci kombinovanih varijantnih

genotipova rs1695 i rs1138272 *GSTP1*, imali su kraći period preživljavanja u odnosu na nosioce kombinacije referentnih genotipova.

Ključne reči: svetloćelijski karcinom bubrežnog parenhima, Nrf2, *GSTP1*, SOD2, GPX1, redoks homeostaza

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Biologija tumora i oksidativna oboljenja

UDK broj:

# THE ANALYSIS OF REDOX HOMEOSTASIS GENETIC BIOMARKERS AS RISK FACTORS FOR CLEAR CELL RENAL CELL CARINOMA DEVELOPMENT AND PROGRESSION

## ABSTRACT

**Introduction:** Continuous cellular chemical reactions result in incomplete oxygen reaction which produce reactive oxygen species (ROS). Their accumulation stimulates activation of antioxidative systems as resistance mechanisms. Activated nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) further causes antioxidant enzymes expression, such as superoxide dismutases (SOD), glutathione peroxidases (GPX), as well as glutathione S-transferases (GST). Prooxidant tumor environment is of great significance for promoting development and progression of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). The aim of this study was to evaluate importance of genetic polymorphisms of *Nrf2*, *GSTP1*, *SOD2* and *GPX1* genes in case of ccRCC.

**Material and methods:** Genotyping of *Nrf2* (rs6721961), *SOD2* (rs4880), *GPX1* (rs1050450) and *GSTP1* (rs1695, rs1138272) polymorphisms was performed in 223 cases of ccRCC and 336 matched controls by polymerase chain reaction. The connection between investigated polymorphisms and risk for ccRCC development, as well as their relation to tumor phenotype characteristics with or without contributing factors, were examined. Furthermore, overall survival after surgical resection in relation to beforementioned genotypes, was studied during the course of 13 years.

**Results:** Carriers of *SOD2* variant genotypes expressed 4.5 fold increased risk for ccRCC in comparison to referent genotype carriers ( $p < 0.001$ ). Similarly, variant genotypes carriers of *GSTP1* rs1695 also carrying referent rs1138272 genotype, exhibited 3.2 fold increased risk ( $p = 0.001$ ), while haplotype analysis for two *GSTP1* polymorphisms showed 3.5 fold increased risk for Val105 and Val114 carriers in comparison to referent combination consisting of Ile105 and Ala114 ( $p = 0.004$ ). Hypertension as risk factor in combination with variant *SOD2* genotype had 12 fold increased risk for ccRCC compared to referent group ( $p < 0.001$ ). Examined polymorphisms were not shown to be of significant prognostic importance for patients with ccRCC, although variant genotype carriers of examined *GSTP1* polymorphisms did have shorter overall survival.

**Conclusions:** Certain gene polymorphisms encoding antioxidant enzymes might be associated with the risk for ccRCC, with emphasis on variant genotype of *SOD2* rs4880 polymorphism and variant genotypes of rs1695 and rs1138272 *GSTP1* polymorphisms. Combination of these genotypes may even further significantly increase the risk. Furthermore, carriers of variant genotypes of rs1695 and rs1138272 *GSTP1* polymorphisms had shorter survival period in comparison to individuals with referent combination of these genotypes.

**Key words:** clear cell renal cell carcinoma, Nrf2, GSTP1, SOD2, GPX1, redox homeostasis



Scientific field: Medicine

The branch of scientific field: Biology of tumors and oxidative diseases

UDK number:

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Redoks homeostaza .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Značaj slobodnih radikala i redoks disbalansa u kancerogenezi .....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Mikrosredina i kancerogeneza .....	6
1.2.2. Uloga Nrf2 u kancerogenezi .....	8
1.2.3. Uloga GSTP1 u maligno izmenjenim ćelijama.....	11
1.2.4. Uloga metabolizma vodonik peroksida u tumorskoj mikrosredini .....	16
1.2.4.1. Superoksid dizmutaze.....	17
1.2.4.2. Glutation peroksidaze .....	18
1.2.5. Značaj antioksidantnih proteina u procesu kancerogeneze .....	20
<b>1.3. Karcinom bubrežnog parenhima .....</b>	<b>20</b>
1.3.1. Epidemiološki podaci .....	20
1.3.2. Dijagnostički pristup.....	21
1.3.3. Patohistološka podela i TNM klasifikacija .....	22
1.3.4. Terapijski pristup .....	23
1.3.5. Faktori rizika za nastanak KBP.....	24
<b>1.4. Uloga poremećene redoks homeostaze u patogenezi svetloćelijskog karcinom bubrežnog parenhima ..</b>	<b>25</b>
<b>1.5. Biomarkeri poremećene redoks homeostaze u slučaju sKBP .....</b>	<b>26</b>
<b>2 CILJEVI.....</b>	<b>30</b>
<b>3 MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Dizajn studije .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Studijska populacija.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3. Analiza epidemioloških faktora rizika.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4. Pravni i etički preduslovi .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5. Materijal.....</b>	<b>32</b>
3.5.1. Uzorci krvi i plazme .....	32
3.5.2. Uzorci tkiva .....	32
<b>3.6. Metode.....</b>	<b>32</b>
3.6.1. Izolacija DNK .....	32
3.6.2. Genotipizacija .....	33
3.6.2.1. Ispitivanje <i>Nrf2</i> polimorfizma rs6721961 .....	34
3.6.2.2. Ispitivanje <i>GSTP1</i> polimorfizama rs1695 i rs1138272.....	35
3.6.2.3. Ispitivanje <i>SOD2</i> polimorfizma rs4880.....	35
3.6.2.4. Ispitivanje <i>GPXI</i> polimorfizma rs1050450.....	36
<b>3.7. Statistička obrada podataka .....</b>	<b>36</b>

4 REZULTATI.....	37
4.1. Karakteristike ispitanika i kontrolne grupe.....	37
4.2. Povezanost ispitivanih genotipova i rizika za nastanak sKBP.....	39
4.3. Povezanost ispitivanih genotipova i fenotipskih karakteristika sKBP među obolelima .....	40
4.4. Efekat ispitivanih genotipova u kombinaciji i rizika za nastanak sKBP .....	45
4.4.1. Kombinovani efekat ispitivanih genotipova i rizika za nastanak sKBP.....	44
4.4.2. Analiza haplotipa za ispitivane genetske polimorfizme <i>GSTPI</i> .....	52
4.4.3. Kumulativni efekat ispitivanih polimorfizama .....	53
4.5. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na faktore rizika za nastanak sKBP .....	54
4.5.1. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na povišen arterijski pritisak.....	54
4.5.2. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na povišen gojaznost .....	60
4.5.3. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na pušačke navike.....	62
4.6. Distribucija ispitivanih genotipova među preživelim i preminulim ispitanicima .....	64
4.6.1. Ispitivani polimorfizmi kao prediktori mortaliteta pacijenata obolelih od sKBP .....	65
5 DISKUSIJA .....	71
6 ZAKLJUČCI.....	78
7 LITERATURA .....	80

# 1. UVOD

## 1.1. Redoks homeostaza

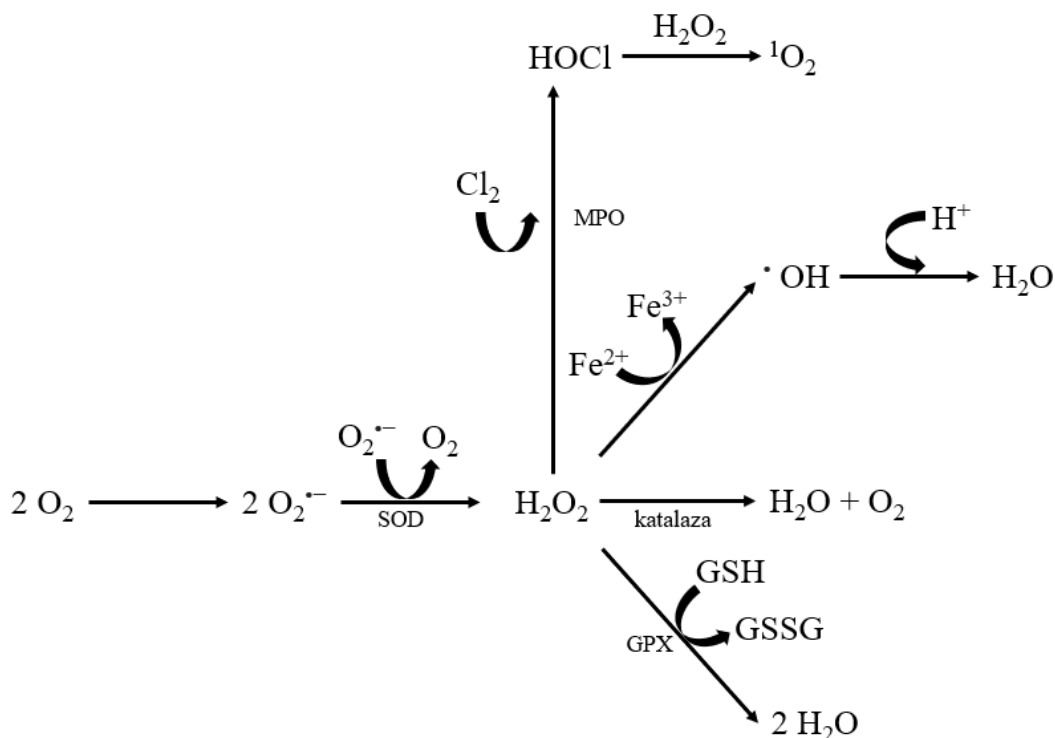
Stabilnu unutrašnju sredinu (fr. *milleu intérieur*) definisao je Klod Bernar (fr. *Claude Bernard*) 1865. godine. Narednih decenija termin „homeostaza“ osmislio je i prvi put koristio Volter B. Kanon (engl. *Walter B. Cannon, The Wisdom of the Body*, 1926) kao kovanicu dve grčke reči - ὁμοίος – slično, στάσις – staza, tako da je reč „homeostaza“ stvorena da se opiše stanje regulisane stabilnosti unutrašnje sredine svakog organizma. Od tada je koncept samoregulacije postao ključni princip moderne biologije. Kanon je opisao da homeostaza podrazumeva da ukoliko dođe do bilo kakve promene koja teži da naruši stabilnost, tu su faktori koji se automatski odupiru promeni i uvek postoje mehanizmi koji se pokreću simultano i/ili sukcesivno, što sve zajedno omogućava stabilan i konzistentan sistem [1].

Inicijalno je homeostaza analizirana isključivo za organizam u celini. Međutim, organizam ne može biti u stanju konstantne stabilnosti ukoliko svaki organ, tkivo i na kraju i pojedinačna ćelija ne održavaju homeostazu unutar svojih granica. Svaka biološka jedinica ponaosob teži da održi homeostazu svojih integrisanih sistema. Kada nastane bilo kakvo odstupanje, promena ili oštećenje, odmah nastupaju reakcije koje teže da eliminišu promenljivu koja je do promene dovela i da spreče moguće narušavanje ravnoteže [2].

Hemijske reakcije koje se kontinuirano odvijaju na ćelijskom nivou, praćene su stvaranjem reaktivnih slobodnih radikala. Ovo su molekuli sa izraženom reaktivnošću jer imaju jedan nesporen elektron, te brzo stupaju u reakciju sa drugim molekulima i, ili se oslobađaju tog elektrona, ili primaju elektron kako bi ponovo dostigli stabilno energetska stanje [3]. Nakon pomenute reakcije dolazi do ponovnog nastanka nestabilnog reaktivnog radikala od molekula koji je stupio u reakciju sa njima, a često dolazi i do oštećenja postojećeg sistema kome molekuli pripadaju, tako da se lanac reakcija nastavlja. Siguran način da se prekine reakcija bio bi da dva reaktivna slobodna radikala međusobno odreaguju i da se na taj način formira stabilno jedinjenje, međutim kako zbog reaktivnosti oni postoje vrlo kratko, svega  $10^{-9}$  ili  $10^{-12}$  sekundi, veoma retko se dešava da se sjedine dva slobodna radikala [3].

Nepotpuna redukcija kiseonika dovodi do nastanka molekula koji mogu naneti najviše štete okolnim molekulima i nazivaju se kiseonični slobodni radikali (KSR, engl. *reactive oxygen species*, ROS). Najznačajniji su superoksid anjon –  $\bullet\text{O}_2^-$ , vodonik peroksid –  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroksilni radikal –  $\bullet\text{OH}$ , perhidroksil –  $\bullet\text{O}_2\text{H}$  kao i singletni kiseonik –  $^1\text{O}_2$  (Slika 1). Oni su normalan, prirodni, uzgredni proizvod oksidativnog metabolizma unutar ćelije [4,5]. Uprkos savremenim tehnologijama, izuzetno je teško kvantifikovati ih i testovima precizno identifikovati svaki pojedinačni radikal [6].

Unutar ćelije postoji više izvora nastanka ROS. Među njima su mitohondrije, endoplazmatski retikulum, peroksizomi, mikrozomi i NADPH oksidazni sistemi ćelijske membrane [4,6]. Sa druge strane, egzogeni faktori poput ultravioletnog zračenja, radijacije, hemijskih noksi, duvanskog dima, zagađenog vazduha i farmakoterapije takođe dovode do nastanka kiseoničnih radikala. Iako su zbog svoje reaktivnosti štetni po samu ćeliju u kojoj i oko koje nastaju, za žive organizme oni mogu biti i od koristi. Naime, ROS imaju ulogu i u modulaciji ćelijske diferencijacije, preživljavanja i smrti ćelije [4]. Značajni su i kao signalni molekuli za ćelije imunskog sistema, i kao medijatori u uništavanju mikroorganizama tokom procesa fagocitoze [6].



**Slika 1.** Reakcije nastanka najznačajnijih kiseoničnih radikala. Brze reakcije se kontinuirano odvijaju i od jednog kiseoničnog radikala gotovo odmah nastane sledeći radikal; SOD – superoksid dismutaza; GPX – glutation peroksidaza; MPO – mijeloperoksidaza; prilagođeno od *Brieger K. i sar*, 2012 [5].

Nastali radikali stupaju u reakciju sa praktično svim molekulima bioloških sistema, uključujući baze ribonukleinskih i dezoksiribonukleinskih kiselina, proteine, lipide membrana ćelija i njihovih organela. Promene DNK, poput nastanka 8-hidroksideoksiguanozina (8-OHdG) zadržavaju se u genetskom materijalu i mogu predstavljati pokazatelje oksidativnog oštećenja [7]. Greške koje nastaju kao rezultat nakupljanja 8-OHdG dovode do pogrešnog sparivanja među bazama, a samim tim i do grešaka u transkripciji i translaciji prvobitnog zapisa [7]. Oštećenja mitohondrijalne DNK su takođe značajan problem, jer ove organele ne poseduju enzime koji bi izvršili reparaciju grešaka [5]. Usled reakcije ROS sa proteinima dolazi do nastanka nerastvorljivih agregata, usled čega proteini gube svoje funkcije [5].

Kako ROS mogu dovesti do oštećenja molekula i unutar i u neposrednom okruženju ćelije, posebno ribonukleinskih kiselina i makromolekula ćelija, da bi se održala ravnoteža, mora postojati način na koji će se ćelija tome odupreti. Dodatno, reakcije pokrenute stvaranjem kiseoničnih radikala narušavaju stabilnost brojnih enzimskih sistema i menjaju sveukupno funkcionisanje ćelije. Zbog toga, njihovo postojanje nije samo inicijator niza hemijskih reakcija pomoću kojih oni teže da dostignu energetska stabilnost, već oni dovode i do otpočinjanja kaskade aktivacije antioksidantnih sistema koji će raditi na uklanjanju ROS ili na korekciji nastalih oštećenja. Kiseonični radikali sa jedne strane, i sve sekvence reakcija koje sprečavaju njihovu prekomernu prevagu sa druge strane, zajedno postoje u opštem stanju redoks homeostaze. Ćelijska redoks homeostaza održava se konstantnim metaboličkim fluksom elektrofilnih molekula i

pokretanjem mehanizama koji teže da uspostave nukleofilno okruženje [2]. Povratnom spregom se aktiviraju mehanizmi kako bi se povratilo početno stanje stabilnosti produkcije oksidanasa [2].

Jednu od prvih linija odbrane u cilju očuvanja homeostaze predstavljaju enzimi koji katalizuju reakcije pretvaranja reaktivnih kiseoničnih radikala u neutralna jedinjenja poput vode (Tabela 1). Najznačajniji i najzastupljeniji jesu enzimi iz klasa superoksid dizmutaza, katalaza i glutacion peroksidaza [5]. Regulator genske ekspresije antioksidantnih enzima je transkripcioni faktor – nuklearni faktor povezan sa eritroid 2-faktorom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2) koji zajedno sa *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) čini Keap1/Nrf2 osovinu [8]. Pored enzimski katalisanih reakcija, namirnice koje se svakodnevno konzumiraju sadrže biomolekule koji se ponašaju kao „čistači“ ROS, kao što su tokoferol (vitamin E), askorbinska kiselina (vitamin C), karotenoidi, polifenoli, a sličnu aktivnost imaju i pojedini produkti organizma poput mokraćne kiseline [5,9,10].

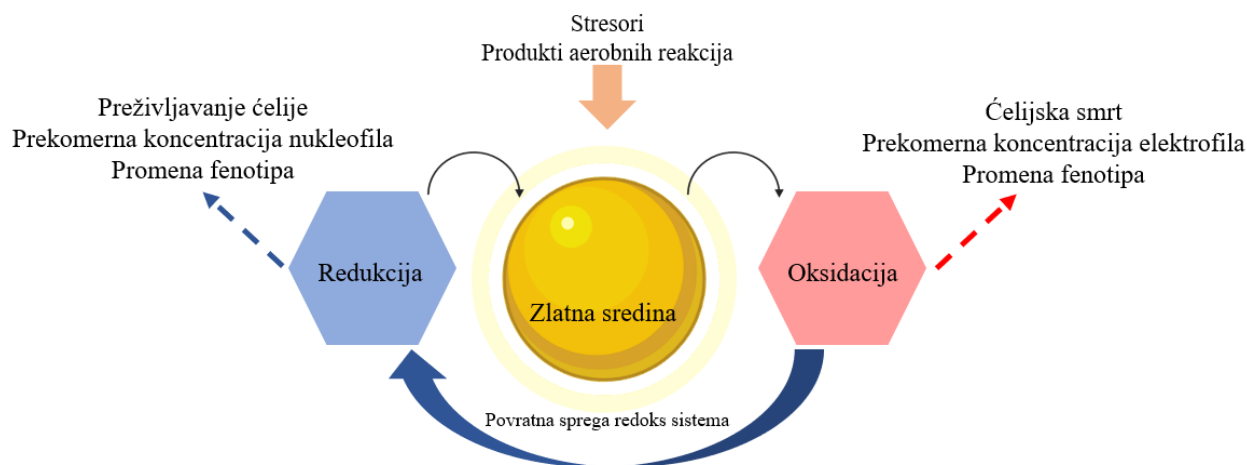
**Tabela 1.** Odabir najznačajnijih sistema antioksidativne zaštite, prilagođeno od *Sies H. i sar*, 2017 [10].

Enzimski sistemi koji ostvaruju direktan uticaj	Superoksid dizmutaze
	Mijeloperoksidaze
	Glutacion peroksidaze
	Katalaze
Enzimski sistemi koji posredno deluju	Glutacion S-transferaze
	GSSG reduktaze
	UDP-glukuronil transferaze
	NADPH transportni sistem
Ne-enzimski sistemi	$\alpha$ -tokoferol (vitamin E)
	$\beta$ -karoten
	Askorbinska kiselina (vitamin C)
	Glutacion
	Urati
	Bilirubin

GSSG reduktaza – glutacion-disulfid reduktaza; UDP-glukuronil transferaza – uridin 5-difosfo-glukuronil transferaza

Ukoliko nije u mogućnosti da se izbori sa promenom, u ćeliji i/ili organizmu nastupa stanje stresa. Stoga se oksidativni stres može posmatrati kao nemogućnost održavanja fiziološkog stanja stabilnosti redoks sistema [2]. Ćelija i organizam u celini moraju biti sposobni da se prilagode

promenjenim uslovima (Slika 2). Ukoliko su dovoljno dugo izložene blagom ili umerenom stresu, stresni stimulus aktivira nastanak fenotipskih promena koje će obezbediti zaštitu od istog tog stimulusa na duge staze, a takva adaptacija podrazumeva ponekad i modifikacije osnovnih ćelijskih funkcija [2].



**Slika 2.** „Zlatna sredina“ redoks homeostaze održava se kontinuiranim procesima oksidacije koji potom aktiviraju povratnu spregu redoks sistema i dovode do reakcija redukcije. Dokle god se održava homeostaza redoks sistema, ne dolazi do fenotipskih izmena. Ukoliko prevladaju bilo reakcije oksidacije, bilo reakcije redukcije, nastupiće promene fenotipa. U okruženju koje dovodi do potenciranja oksidacije, u slučajevima oksidativnog stresa, posledično će nastupiti ćelijska smrt, dok okruženje u kome su dominantni procesi redukcije, u slučajevima stalne aktivacije Nrf2, ćelije će opstajati. Preuzeto i prilagođeno od *Ursini F.* i sar. 2016 [2].

Narušena redoks homeostaza je značajan predmet proučavanja moderne nauke. S obzirom da predstavlja osnovu i nastanka i progresije najrazličitijih poremećaja i bolesti, saznanja o izmenjenoj ravnoteži često čine ključ razumevanja patofizioloških procesa. Na primer, oksidativno oštećenje lipoproteina male gustine (LDL) plazme onemogućava njihovo prepoznavanje i uklanjanje putem jetre. Usled toga, uklanjaju ih makrofagi, ali se oni potom tako ispunjeni lipidima nakupljaju ispod endotela krvnih sudova. Štetni nivoi neesterifikovanog holesterola koji je unutar njih, dovode do njihovog umiranja i usled toga se razvijaju aterosklerotični plakovi koji vremenom izazivaju okluziju krvnih sudova što čini osnovu različitih kardiovaskularnih događaja [3]. Takođe hemijske modifikacije amino kiselina u sastavu proteina mogu ih toliko izmeniti da imunski sistem nije u mogućnosti da ih prepozna kao sopstvene proteine, pa se posledično sintetišu antitela koja unakrsno reaguju i sa proteinima zdravih tkiva i na taj način pokreću nastanak autoimunskih bolesti. Upravo agregati proteina koji su nerastvorljivi u citosolu čine osnovu neurodegenerativnih bolesti [5]. Grupa oboljenja koja je od same inicijacije pa kroz sve faze svog napredovanja usko povezana sa oksidativnim stresom, jesu maligne bolesti ili tumori (Tabela 2).

**Tabela 2.** Grupe bolesti kod kojih postoji narušena redoks homeostaza, prilagođeno od *Brieger K. i sar*, 2012 [5].

<b>Grupa bolesti</b>	<b>Primeri</b>
<b>Hronične inflamatorne i autoimunske bolesti</b>	dijabetes, reumatoidni artritis, lupus
<b>Fibrotske bolesti</b>	plućna fibroza, dijabetična nefropatija, fibroza jetre
<b>Kardiovaskularna oboljenja</b>	ateroskleroza, hipertenzija, ishemijsko/reperfuziono oštećenje
<b>Neurološki poremećaji</b>	schizofrenija, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest
<b>Infektivne bolesti</b>	hepatitis, influenza, HIV, septični šok
<b>Tumori</b>	karcinom dojke, karcinom pluća, karcinom bubrega

## 1.2. Značaj slobodnih radikala i redoks disbalansa u kancerogenezi

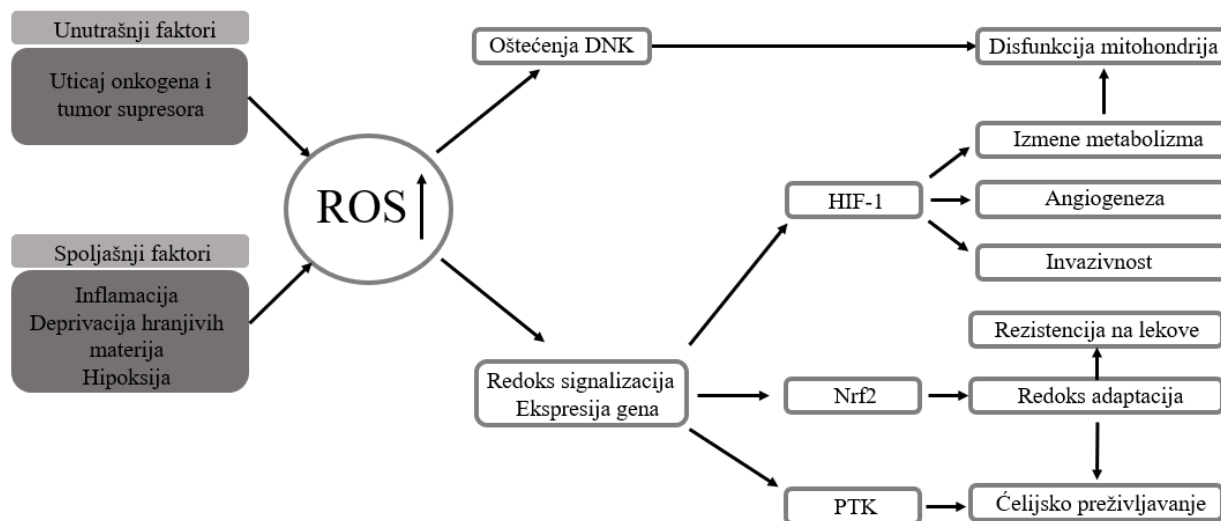
Nastanak i razvoj svakog pojedinačnog tumora zavisi od više faktora i nikada nije rezultat samo jedne izolovane promene. Zbog toga, veliki je izazov precizno definisati sve putanje koje dovode do razvoja tumora. Međutim, širom sveta oblast proučavanja malignih bolesti i njihovih molekularnih karakteristika sve više napreduje i daje odgovore na sve veći broj pitanja. Oksidativni stres ima posebno mesto u razumevanju kancerogeneze i metastatske faze bolesti.

Zbog činjenice da kiseonični slobodni radikali potpuno nasumično izazivaju oštećenja najznačajnijih makromolekula, promene u molekulima DNK, proteina i lipida, nastale usled prekomerne koncentracije ROS, ukoliko ne budu ispravljene, mogu dovesti do genetske nestabilnosti i dalje voditi nastanku tumora [11]. Hidroksilni radikali su među najreaktivnijim KSR kada je u pitanju afinitet prema DNK zbog svoje sposobnosti da brzo difunduju i dovode do oksidacije baza, posledičnog prekida jednog ili oba lanca. Prekidi lanaca DNK su izuzetno važni zbog potencijalnog gubitka postojećih informacija, pomeranja okvira transkripcije i translacije i zbog hromozomalnih rearanžmana [12]. Ukoliko ćelija ima mogućnost da ispravi nastalo oštećenje ili da pokrene programiranu ćelijsku smrt u slučaju da ne popravi grešku, mutacije se neće gomilati i neće biti prenešene na ćerke ćelije [13]. Međutim, poremećaj ravnoteže utiče i na mehanizme zadužene za prepoznavanje i reparaciju oštećenog naslednog materijala [14]. Pored toga, nestabilnost DNK i akumulacija različitih oštećenja mogu biti važan faktor koji doprinosi razvoju rezistencije na hemioterapiju [11].

Sa druge strane, kiseonični radikali se ponašaju i kao vrlo potentni signalni molekuli. Ono što ceo proces čini složenijim i otežanim jeste sposobnost da KSR svojim prisustvom aktiviraju anti-onkogene reakcije i oksidativnim stresom indukovanu ćelijsku smrt tumorske ćelije, ali isto tako unutar maligno izmenjene ćelije pokreću proonkogeni signalnu kaskadu čime ćeliji omogućavaju izbegavanje apoptoze [11]. Ispitivanjem različitih malignih bolesti, otkrivena je uloga ROS u skoro svim ćelijskim procesima karakterističnim za mutirane ćelije – nekontrolnisanoj ćelijskoj deobi, gubitku odgovora na signale za zaustavljanje rasta kao i razvoju rezistencije na ćelijski programiranu smrt. Takođe, ROS učestvuju i u procesu angiogeneze koji je esencijalan za preživljavanje ovih ćelija, zatim za proces metastaziranja, a smatra se i da u pojedinim vrstama tumora učestvuju u prekidu procesa diferencijacije novonastalih ćelija. Pored



toga doprinose i metaboličkom remodelovanju i povećanju metabolizma glukoze za koji je poznato da predstavlja karakteristiku malignih ćelija (Slika 3) [15,16].



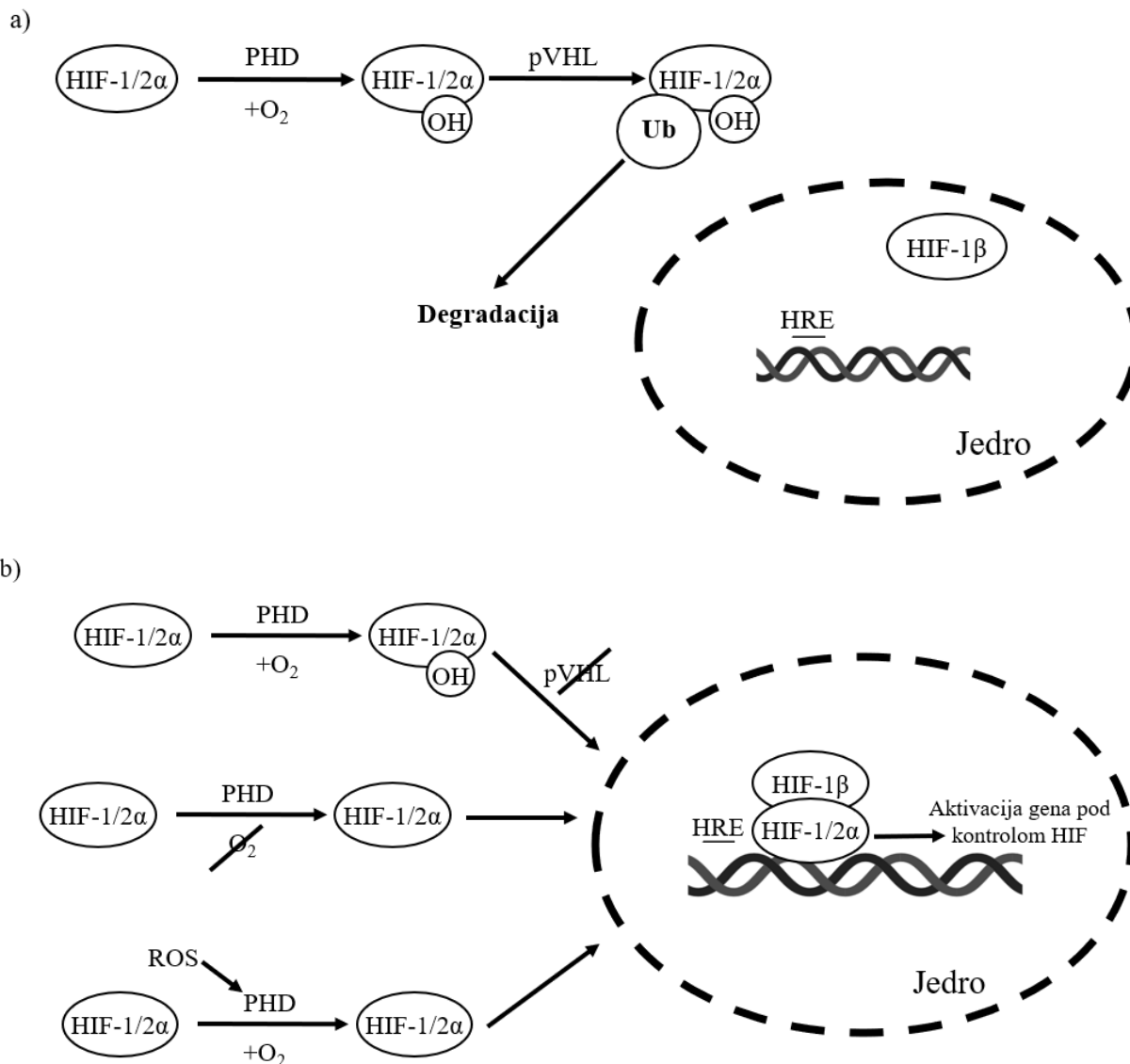
**Slika 3.** Ćelijski procesi na koje ROS imaju uticaja unutar tumorske ćelije. Pod uticajem faktora unutrašnje i spoljašnje sredine, porast koncentracije kiseoničnih radikala dovodi do oštećenja genetičkog materijala i istovremeno pokreće signalne puteve koji utiču na ekspresiju gena. Modifikacija aktivnosti hipoksijom-indukovanog faktora 1 (HIF-1) pokreće izmene metabolizma koje, jednako kao i oštećenja DNK, dovode do disfunkcije mitohondrija. Pored toga, HIF-1 utiče na angiogenezu i na invazivnost rapidno proliferišućih ćelija. Aktivacija nuklearnog faktora povezanog sa eritroid 2-faktorom 2 (Nrf2) dodatno doprinosi adaptaciji ćelija na izmenjenu redoks homeostazu i na razvoj nastanka rezistencije na lekove. Ekspresijom gena se aktiviraju i proteinske tirozin kinaze (PTK) koje zajedno sa adaptacijom na narušenu redoks homeostazu omogućavaju i ćelijsko preživljavanje. Preuzeto i prilagođeno od *Figueira T. i sar.* 2013 [17].

### 1.2.1. Mikrosredina i kancerogeneza

Tumorske ćelije koje vrlo intenzivno proliferišu, dovode do izraženog uvećanja tumora, a kako brzinu njihove proliferacije ne može adekvatno pratiti i stvaranje novih krvnih sudova, tumorske ćelije se udaljuju od regija sa boljom perfuzijom gde je prinos hranljivih materija odgovarajući. Sredina u kojoj ćelije nastavljaju sa svojim funkcionisanjem postaje siromašna hranljivim materijama, usled čega nastupa promena metaboličkih aktivnosti kako bi se obezbedio dalji razvoj i sinteza biomolekula uprkos lošim uslovima [18,19]. Istovremeno, osnažuju se sistemi koji održavaju redoks homeostazu u ćeliji da bi efekti izmenjenog metabolizma bili neutralisani [18].

U normalnim uslovima kada postoji dovoljna snabdevenost tkiva kiseonikom, dolazi do hidrosilacije dve prolinske rezidue  $\alpha$  subjediniće hipoksijom-indukovanog faktora (engl. *hypoxia-inducible factor*, HIF), i na taj način HIF postaje obeležen za dalji proces ubikvitinacije, odnosno razgradnje. Njegovo prepoznavanje vrši se od strane *von Hippel-Lindau* tumor supresornog proteina (skr. pVHL) koji je deo E3 ubikvitinskog ligaza kompleksa [20]. Na taj način je količina HIF- $\alpha$  kontrolisana količinom dostupnog kiseonika (Slika 4a). U situacijama kada

vladaju hipoksični uslovi, što je vrlo izraženo u tumorskim tkivima, izostaje „markiranje“ HIF hidroksilacijom  $\alpha$  jedinice, i zahvaljujući tome, pVHL ne može da uvede faktor u proces degradacije. Tako stabilizovan HIF- $\alpha$  vezuje se za HIF- $\beta$  subjedinicu i formira se heterodimer unutar jedra ćelije [21]. Nastali heterodimer dalje u samoj DNK aktivira elemente koji odgovaraju na hipoksiju (engl. *hypoxia responsive elements*, HRE), a deo su gena za kodiranje eritropoetina i vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) [22]. Krajnji rezultat jeste sinteza eritropoetina i stimulacija angiogeneze kako bi tkiva bila bolje snabdevena kiseonikom i hranljivim materijama (Slika 4b).



**Slika 4.** Prikaz regulacije degradacije HIF-1/2 $\alpha$  subjedinice u normalnim uslovima kada postoji normalna snabdevenost kiseonikom (slika a). Prikaz onemogućene hidroksilacije i potom ubikvitinacije u slučaju kada vlada hipoksija ili kada prisustvo kiseoničnih radikala sprečava

aktivnost prolil-hidroksilaze (PHD), odnosno nemogućnosti uvođenja HIF-1/2 $\alpha$  u proces razgradnje subjedinice ukoliko nedostaje pVHL (slika b). Kada HIF-1/2 $\alpha$  izbegne razlaganje, unutar jedra se stvara HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  kompleks koji pokreće transkripciju gena koji su pod kontrolom HIF. Preuzeto i prilagođeno od Schönberger T. i sar, 2021 [20].

Hipoksijom indukovani faktor igra značajnu ulogu i u pokretanju Warburgovog efekta. Osim što ima ulogu u regulaciji transkripcije gena za enzime koji učestvuju u glikolizi [23], smatra se da prekomerna ekspresija HIF- $\alpha$  zajedno sa aktivnošću različitih onkogenih i gubitkom funkcije tumor supresora, dovodi do intenziviranja aerobne glikolize kojom će se glukoza pretvoriti u piruvat, a posledično nastajati laktati [16]. Ovaj događaj je jedna od najpoznatijih metaboličkih promena koja se dešava još tokom ranijih stadijuma onkogeneze, čak i pre nego što nastupi hipoksija. Dodatno, još jedna posledica Warburgovog efekta je da se sa svakim ciklusom stvaranja NADPH i time se obnavlja glutation (GSH), unutarćelijsko tiol jedinjenje, koji je sam po sebi endogeni antioksidans [16]. Time tumorske ćelije sebi postepeno obezbeđuju prilagođavanje narušenoj redoks homeostazi i izbegavanje štetnog efekta prekomerne koncentracije slobodnih kiseoničnih radikala.

Ovi mehanizmi nisu izolovani u prilagođavanju maligno izmenjenih ćelija na narušenu redoks homeostazu, već se kompleksna mreža aktivacije enzima dalje simultano odvija i nastavlja. Zbog toga reaktivni kiseonični radikali svakako predstavljaju jednog od glavnih aktera tokom nastanka tumora i razvoja njihovog metastatskog potencijala.

### 1.2.2. Uloga Nrf2 u kancerogenezi

Narušavanje redoks homeostaze koje nastaje nakupljanjem ROS povećava potrebu za osnaživanjem protektivnih mehanizama. Ćelija se mora braniti od oksidativnih reakcija izazvanih superoksid anjonom, vodonik peroksidom i hidroksilnim radikalima čije se koncentracije značajno povećavaju. Smatra se da je jedan od najznačajnijih događaja aktivacija nuklearnog faktora povezanog sa eritroid 2-faktorom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2). Njegova uloga je da u normalnim, fiziološkim uslovima precizno reguliše ekspresiju enzima i molekula koji će doprineti antioksidantnoj aktivnosti i održavati adekvatnu redoks homeostazu. Međutim, unutar tumorskog tkiva, Nrf2 ima paradoksalnu, dvojnu ulogu, jer istovremeno može sprečiti i usporiti kancerogenezu, dok u već promenjenom malignom tkivu učestvuje u zaštiti ćelije od štetnih molekula [24,25]. Kada je inicijalno otkriven, Nrf2 je posmatran kao molekul koji doprinosi odbrani od tumorigeneze jer sprečava oštećenja i mutacije DNK nastale usled oksidativnog stresa [24]. Naizgled kontradiktorno, povišena aktivnost Nrf2 zabeležena je u brojnim tumorima kao što su karcinom pluća, pankreasa, endometrijuma i bubrega [26–29]. Sa razvojem istraživanja i sve preciznijim shvatanjem aktivnosti i efekta prekomerne aktivacije ovog faktora, postalo je jasno da zahvaljujući Nrf2, tumorski izmenjene ćelije stvaraju sopstveni mehanizam odbrane koji je esencijalan za opstanak u izmenjenim uslovima narušene redoks homeostaze [30]. Sprečavanje aktivacije Nrf2 čini osnovu pristupa lečenju oboljenja povezanih sa oksidativnim stresom, posebno za prevenciju kancerogeneze [24].

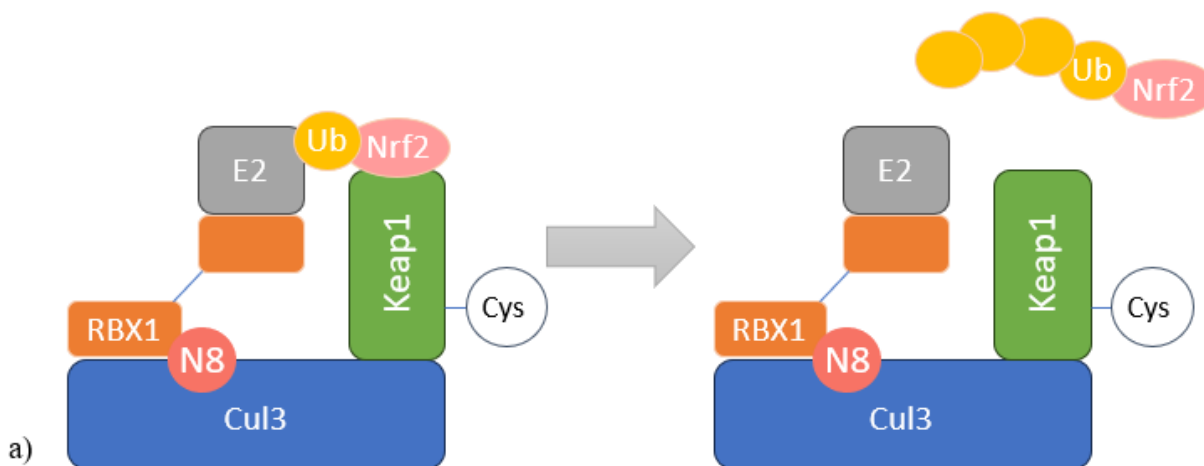
Transkripcioni faktor Nrf2 predstavlja protein koji se sastoji od 589 amino kiselina i ima molekulsku masu od 66,1 kDa [24]. Pripada podfamiliji transkripcionih faktora koji se nazivaju *Cap'n'Collar* (skr. CNC) zbog svoje specifične strukture [31]. Ovaj transkripcioni faktor ima u svom sastavu sekvencu sa leucinom neophodnu za spajanje sa drugim proteinima što posledično dovodi do dimerizacije, kontroliše ulazak i izlazak iz ćelijskog jedra, kao i pripajanje za DNK [24]. Protein je kodiran na nivou gena *NFE2L2* koji se nalazi na dugom kraku drugog hromozoma

(2q31.2), na poziciji 177230302-177265131 [32]. U sastav gena ulazi 5 egzona koji imaju dužinu preko 11 Kb [32]. Brojne genetske mutacije gena i njegovog promotornog regiona predmet su ispitivanja, jer dovode do izmene aktivnosti samog faktora kao produkta [33].

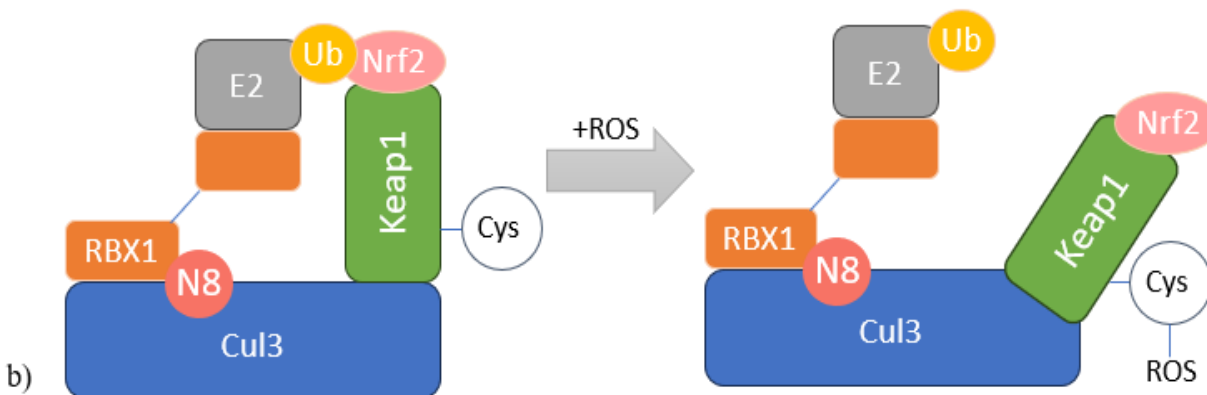
Ekspresija i aktivnost Nrf2 kao transkripcionog faktora kontrolisana je na više načina. Od Keap1/Nrf2 zavisne ubikvitinacije (engl. *Kelch-like-ECH associated protein 1*), preko brojnih transkripcionih faktora poput Jun, p21, p53, izbegavanja autofagije, do epigenetičkih promena DNK, histona i mikroRNK, Nrf2 može biti suprimiran ili dodatno aktiviran u zavisnosti od uslova koji intra- i ekstracelularno preovlađuju [24,34].

Protein Keap1 u normalnim okolnostima kada je homeostaza redoks sistema uspostavljena, održava Nrf2 u niskim koncentracijama tako što se vezuje za njega i usmerava ga ka degradaciji [34,35]. Naime, svojim evoluciono očuvanim regionima, Keap1 vezuje Nrf2 i uvodi ga u interakciju sa ubikvitin-ligaza kompleksom (Slika 5a). Predloženi modeli vezivanja i regulacije nivoa Nrf2 od strane Keap1 pretpostavljaju da postoji više stanja u kojima ovaj kompleks može postojati. Jedan od modela ukazuje na „otvoreno stanje“ kompleksa tako da odgovarajući signali mogu dovesti do njegovog „zatvaranja“, stabilizacije, i konačnog započinjanja ubikvitinacije i degradacije, ali ako izostane stimulus, onda i razgradnja izostaje [36]. Sa druge strane, smatra se da uspostavljena ravnoteža dovodi do translokacije Keap1 unutar jedra gde on za sebe vezuje Nrf2 i tako vezanog ga usmerava ka citoplazmi gde će biti razgrađen [24].

Regulacija stabilnosti ubikvitin-ligaza kompleksa i razgradnje Nrf2, veoma je složena i pod uticajem je više faktora. Ključni stimulus za „slabljenje“ ovog kompleksa i za izbegavanje ubikvitinacije Nrf2 jeste nakupljanje reaktivnih kiseoničnih radikala, odnosno narušavanje redoks homeostaze (Slika 5b) [36,37]. Reakcije elektrofilnih molekula poput ROS sa tiolnim grupama cisteinskih rezidua unutar Keap1 dovode do promene njegove konformacije i utiču na stvaranje Keap1/Nrf2 kompleksa tako da se smanji interakcija sa ligaznim kompleksom [34]. Posledično dolazi do nakupljanja Nrf2 i potenciranja njegove aktivnosti.



**Slika 5a.** Regulacija uvođenja Nrf2 faktora u proces ubikvitinacije u okruženju kada ne postoje kiseonični slobodni radikali pomoću Keap1 kompleksa. Konformacija Keap1 takva je da omogućava vezivanje Nrf2 za Cul3-E3 ubikvitin ligazu i time će ovaj faktor biti uveden u proces razgradnje.



**Slika 5b.** U slučaju prisustva oksidativnog stresa i nakupljanja ROS, ovi elektrofilni molekuli reaguju sa cisteinskim tiol grupama unutar Keap1, dovode do promene konformacije kompleksa i Nrf2 izbegava vezivanje za ubikvitin ligazni kompleks. Skraćenice – Nrf2, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*; Keap1, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; Cul3 *cullin 3*, N8, *Nedd8*; RBX1, *RING-box protein 1*. Preuzeto i prilagođeno od Baird L. i sar, 2020 [36].

Takođe, u slučaju disfunkcionalne autofagije, nevezano za oksidativni stres, razgradnja Keap1 intenzivirana je pomoću proteina p62, tako da Nrf2 ostaje permanentno aktiviran [34]. Dodatno, pokazano je da tumor supresorni protein koji se naziva Wilms tumor gen na X hromozomu (engl. *Wilms tumor gene on the X chromosome*, WTX), ima sposobnost da direktno stupi u interakciju sa Keap1, čime spreči njegovo vezivanje za Nrf2 i potom dalju ubikvitinaciju [38]. Ova stabilizacija vodi ka Nrf2-zavisnoj transkripciji [38]. U čak 30% slučajeva Vilmsovog tumora dolazi do gubitka ili mutacije WTX tumor supresornog proteina, te je u tom tkivu Nrf2 brže razgrađen čime je redukovano odgovor na citotoksične stimulse [38].

Aktivnost Nrf2 regulisana je i na nivou transkripcije gena. Mutacije gena za Keap1 i Nrf2 imaju međusobno antagonistička dejstva. Onkogeno mutacija ćelija dovodi do pojačane aktivnosti Nrf2 koji pomaže rast i odbranu tumorskih ćelija što ukazuje da ovaj transkripcioni faktor pripada onkogenom singalnom putu [24,39]. Sa druge strane, sam promotorski region gena *NFE2L2* poseduje sekvence koje ovom već sintetisanom transkripcionom faktoru omogućavaju da povratnom spregom sam pojača transkripciju sopstvenog gena i dalju sintezu [24]. Hipermetilacija specifičnih delova *NFE2L2* promotornog regiona dovodi do smanjenja ekspresije ovog faktora [40].

Citoprotektivno dejstvo Nrf2 rezultat je njegove uloge u pokretanju transkripcije gena i ekspresije proteina koji su uključeni u detoksikaciju štetnih molekula, prilagođavanju na stresne uslove, antioksidativnoj zaštiti (Tabela 3) [41,42]. U uslovima oksidativnog stresa, oslabljena je razgradnja Nrf2 i tako stabilizovan faktor nakuplja se u jedru, stvara heterodimer sa malim muskuloaponeurotičnim fibrosarkoma proteinima (engl. *small musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins*, skr. sMaf) i vezuje za sekvence DNK – *antioxidant response element* (skr. ARE) [43,44] čime utiče na ekspresiju skoro 500 gena. Pokazano je da moždane ćelije, ćelije jetre, bubrega, gastrointestinalnog trakta, kože, imaju u svom citosolu Nrf2 [41]. Veoma je značajno da su glavni enzimi indukovani od strane Nrf2 enzimi koji učestvuju u redukciji glutaciona i njegovom obnavljanju, tako da su oni akteri druge faze detoksikacije toksina [42]. Takođe, pod kontrolom ARE su i pojedine klase familije glutation S-transferaza, superoksid dizmutaza i katalaza,

antioksidantnih enzima koji doprinose uklanjanju ROS [35]. Osim uloge u odbrani od ksenobiotika, ovaj transkripcioni faktor doprinosi metaboličkom reprogramiranju malignih ćelija time što podstiče aerobnu glikolizu i sintezu glikogena [19,42].

Nuklearni faktor povezan sa eritroid 2-faktorom 2 čini značajan deo kompleksne sekvence odgovora na povećanje koncentracije reaktivnih kiseoničnih radikala i narušavanja redoks homeostaze. Ukoliko je nakupljanje ROS kratkotrajno, ćelija Nrf2 koristi kao efikasan mehanizam odbrane, međutim, ukoliko narušena ravnoteža dugo traje, transkripcioni faktor reprogramira ćeliju i menja njen celokupni metabolizam.

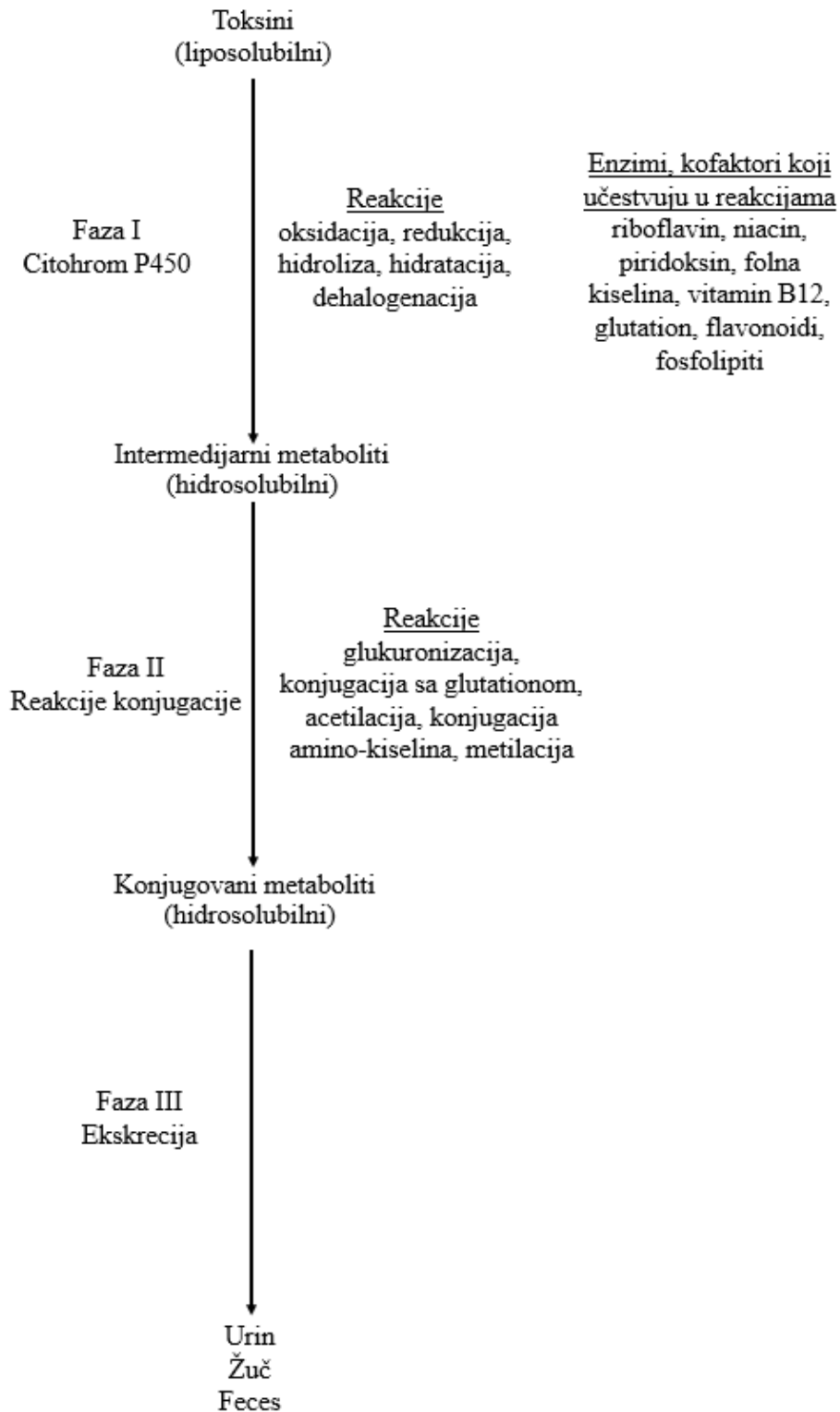
**Tabela 3.** Enzimi čiji su geni pod uticajem Nrf2 i ARE. Prilagođeno od *He F.* i sar. 2020 [42].

<b>Metabolički proces</b>	<b>Enzimi</b>
<b>Glikoliza</b>	GLUT1, G6PC, HK, GPI1, PFK2, FBP1, ALDA, ENO1,4, PKM
<b>Metabolizam glikogena</b>	PGM, GBE1
<b>Pentozo-fosfatni put</b>	G6PD, PGD, TKT, TALDO1, PPAT
<b>Metabolizam amino-kiselina</b>	PHGDH, MTHFD2
<b>Sinteza masnih kiselina</b>	FADS1, ELOVL7
<b>Metabolizam glutationa</b>	GSS, GST, GCLM, GCLC, GR, GPX, CAT, SOD1
<b>Metabolizam hema</b>	HO1, BLVR, FPN1, FTH, FTL

GLUT1, *glucose transporter 1*; G6PC, *glucose-6-phosphatase*; HK, *hexokinase*; GPI1, *glucose phosphate isomerase 1*; PFK2, *6-phosphofructo-2-kinase*; FBP1, *fructose-1,6-bisphosphatase 1*; ALDA, *aldolase A*; ENO1, *enolase 1*; PKM, *pyruvate kinase*; PGM, *phosphoglucomutase*; GBE1, *1,4-alpha-glucan branching enzyme 1*; G6PD, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*; PGD, *6-phosphogluconate dehydrogenase*; TKT, *transketolase*; TALDO1, *transaldolase 1*; PPAT, *phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase*; PHGDH, *phosphoglycerate dehydrogenase*; MTHFD2, *methylentetrahydrofolate dehydrogenase 2*; FADS1, *fatty acid desaturase 1*; ELOVL7, *elongation of very long chain fatty acids protein 7*; GSS, *glutathione synthetase*; GST, *glutathione S-transferases*; GCLM, *glutamate-cysteine ligase modulator subunit*; GCLC, *glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*; GR, *glutathione reductase*; GPX, *glutathione peroxidase*; CAT, *catalase*; SOD1, *superoxide dismutase 1*; HO1, *heme oxygenase-1*; BLVR, *biliverdin reductase*; FPN1, *ferroportin 1*; FTH, *ferritin heavy chain*; FTL, *ferritin light chain*

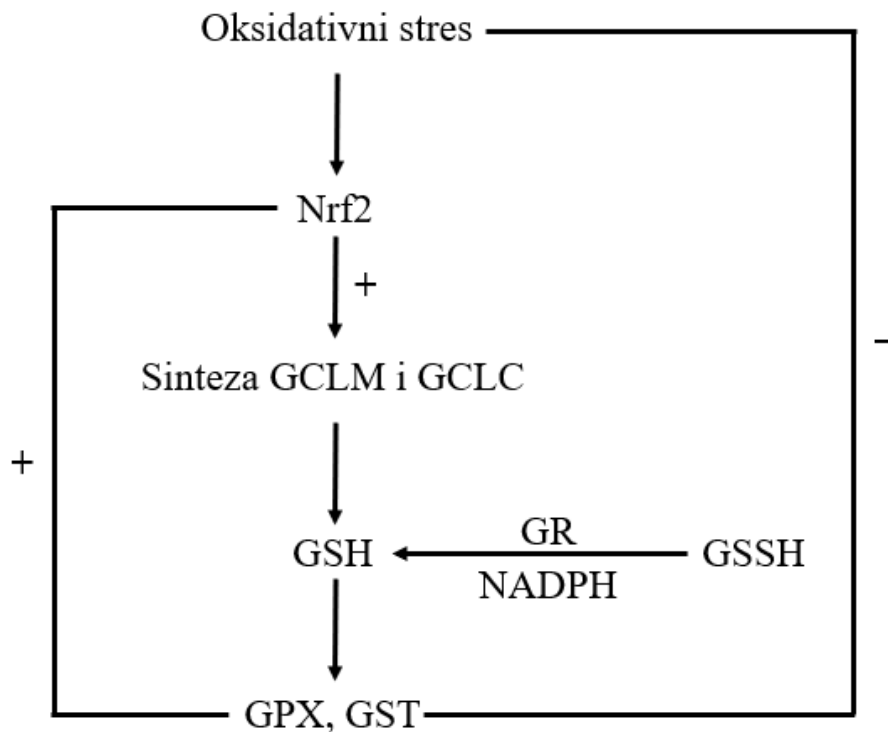
### 1.2.3. Uloga GSTP1 u maligno izmenjenim ćelijama

Ćelijski sistem detoksikacije štetnih molekula sastoji se od tri faze. U okviru prve faze odvijaju se reakcije redukcije, oksidacije i hidrolize. Metaboliti koji nastaju često su reaktivniji od inicijalnog molekula i lakše se mogu konjugovati sa glukuronskom kiselinom, glutationom ili amino kiselinama tokom druge faze. Cilj druge faze je da se dobiju polarna, hidrosolubilna jedinjenja. Zahvaljujući njihovoj hidrofilnosti, konačno formirani molekuli se iz organizma uklanjaju putem žuči ili urina u okviru treće faze (Slika 6) [3,45].



**Slika 6.** Tri faze detoksikacije ksenobiotika i formiranje hidrosolubilnih koji se putem urina, žuči i fecesa izbacuju iz organizma. Preuzeto i prilagođeno od *Liska D.* 1998 [45].

Jedan od efekata vezivanja Nrf2 za ARE jeste pokretanje transkripcije i translacije enzima koji učestvuju u drugoj fazi detoksikacije ksenobiotika, među kojima je familija enzima glutathion S-transferaza (engl. *glutathione S-transferases*, GST) (Slika 7) [44,46,47].



**Slika 7.** Nastanak oksidativnog stresa dovodi do stabilizacije i aktivacije Nrf2 koji potencira sintezu modulatorne i katalitičke podjedinice koje čine glutamat-cistein ligazni heterodimerni enzim (engl. *glutamate-cysteine lygase modifier subunit*, GCLM i *glutamate-cysteine lygase catalytic subunit*, GCLC) pod čijom se aktivnošću katalizuje prva reakcija sinteze glutathiona (engl. *glutathione*, GSH). Pod kontrolom Nrf2 su takođe glutation peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GPX) i glutathion S-transferaze koje glutathion koriste kao supstrat za reakcije neutralizacije produkata oksidativnog stresa. Preuzeto od Chauhan W. i sar. 2023 [44].

Glutathion S-transferaze su superfamilija enzima koji učestvuju u katalizaciji konjugacije elektrofilnih supstanci sa glutathionom, dodatno imaju svoje mesto u signalizaciji unutar ćelije, anti-apoptotskoj aktivnosti i inflamatornom odgovoru [48]. Podeljene su u tri familije – citosolne, mitohodrijalne i mikrozomalne [49]. Citosolne GST klase imenovane su: alfa, mi, pi, sigma, teta, zeta i omega (Tabela 4) [50,51]. Klase su međusobno homologne u svom sastavu, a razlikuju se unutar H-domena koji je vrlo varijabilan i od njega zavisi selektivnost enzima [50]. Tkiva koja su metabolički aktivna (jetra, pluća i bubrezi) imaju pojačanu ekspresiju GST.



**Tabela 4.** Klasifikacija humanih glutation S-transferaza. Prilagođeno od Wu B. i sar. 2012 [51].

	Alfa klasa	GST A1-1, A2-2, A3-3, A4-4, A5-5
	Mi klasa	GST M1-1, M2-2, M3-3, M4-4, M5-5
	Pi klasa	GST P1-1
Citosolne GST	Teta klasa	GST T1-1, T2-2
	Zeta klasa	GST Z1-1
	Omega klasa	GST O1-1, O2-2
	Sigma klasa	GST S1-1
Mitohondrijalne GST	Kapa klasa	GST K1-1
Mikrozomalne GST (MAPEG)		MGST1, MGST2, MGST3

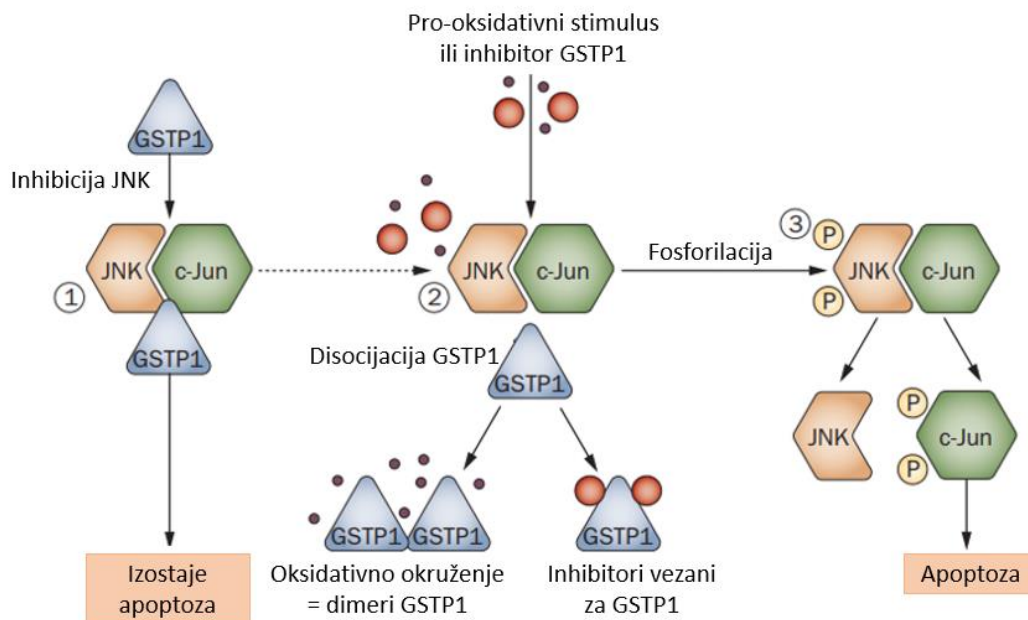
GST, *glutathione S-transferase*; MAPEG, *Membrane Associated Protein in Eicosanoid and Glutathione metabolism*

Najzastupljenija citosolna klasa je pi klasa (GSTP) koja ima samo jednog predstavnika – enzim GSTP1. Među supstratima za koje H-domen GSTP1 pokazuje specifičnost su: akrolein, benzo(a)piren diol epoksid (BPDE), hlorambucil. Njegova sinteza i aktivnost može dodatno biti uvećana u slučaju prisustva endogenih i egzogenih toksina [46]. Kroz drugu fazu detoksikacije ksenobiotika, GSTP1 učestvuje u konjugaciji elektrofilnih jedinjenja sa glutationom, omogućava njihovu neutralizaciju i potom brže uklanjanje iz organizma [47].

Gen za GSTP1, imenovan jednako kao i enzim, pozicioniran je na dugom kraku jedanaestog hromozoma (11q13.2) na poziciji 67583812-67586653. U svom sastavu ima 7 egzona i veličine je 3,06 Kb. Konačni protein je izgrađen od 210 amino-kiselina [50,52]. Ekspresija pi klase GST pod značajnim je uticajem aktivnosti Nrf2 i prepoznato je da je ovaj vid aktivacije konstitucionalno eksprimiran unutar karcinoma koji pokazuju stečenu rezistenciju na hemioterapeutike [53]. Recipročno, GSTP1 ostvaruje fizičku interakciju sa Nrf2 i imunoprecipitacijom i hromatografskim tehnikama opisani su kompleksi ova dva proteina [46]. Pretpostavlja se na osnovu „*knock out*“ modela da pi klasa utiče na stabilizaciju Nrf2, njegovo premeštanje u jedro i na kraju i na samu transkripcionu aktivnost [46].

Nevezano za ulogu u drugoj fazi detoksikacije, enzim GSTP1 ima sposobnost da stvara komplekse sa ćelijskim molekulima, menja njihovu aktivnost i na taj način učestvuje u čitavom nizu procesa, a najviše inhibiciji apoptoze [46,54,55]. Smatra se da je od velikog značaja kao spona između stresnih signala koji utiču na ćeliju i odgovora koji posledično nastaju. Jedna od najranije otkrivenih i najviše proučavanih interakcija jeste stvaranje protein:protein kompleksa sa c-Jun N-terminalnom kinazom 1 (engl. *c-Jun N-terminal kinase 1*, JNK1). Nije u potpunosti razjašnjeno kako strukturalno nastaje kompleks, ali jasno je da je ovaj enzim inhibitor JNK1 [56]. Kinaza JNK1 održava se u niskim koncentracijama ukoliko je rast ćelije adekvatno kontrolisan. Međutim, ovo su „stres“ kinaze koje se aktiviraju ukoliko dođe do oksidativnog stresa, osmotskog šoka ili pod uticajem infalamatornih citokina [56]. Novonastali uslovi za rezultat imaju aktivaciju JNK1 i

pokretanje mehanizama koji će dovesti do promena u ćelijskom ciklusu, reparaciji DNK ili do apoptoze ako se šteta drugačije ne može ispraviti (Slika 8) [57].



**Slika 8.** Inhibicija aktivnosti JNK vezivanjem GSTP1 monomera. U okruženju u kom nema oksidativnog stresa (1), GSTP1 se kao monomer vezuje za JNK i sprečava da dođe do apoptoze. U slučaju da postoje kiseonični radikali koji potenciraju stvaranje GSTP1 dimera ili inhibitori koji se vezuju za GSTP1, nastupa odvajanje ovog enzima, nastupa fosforilacija c-Jun N-terminalne kinaze koja konačno uvodi ćeliju u proces programirane smrti. Preuzeto i prilagođeno od *Simic T.* i sar. 2009 [48].

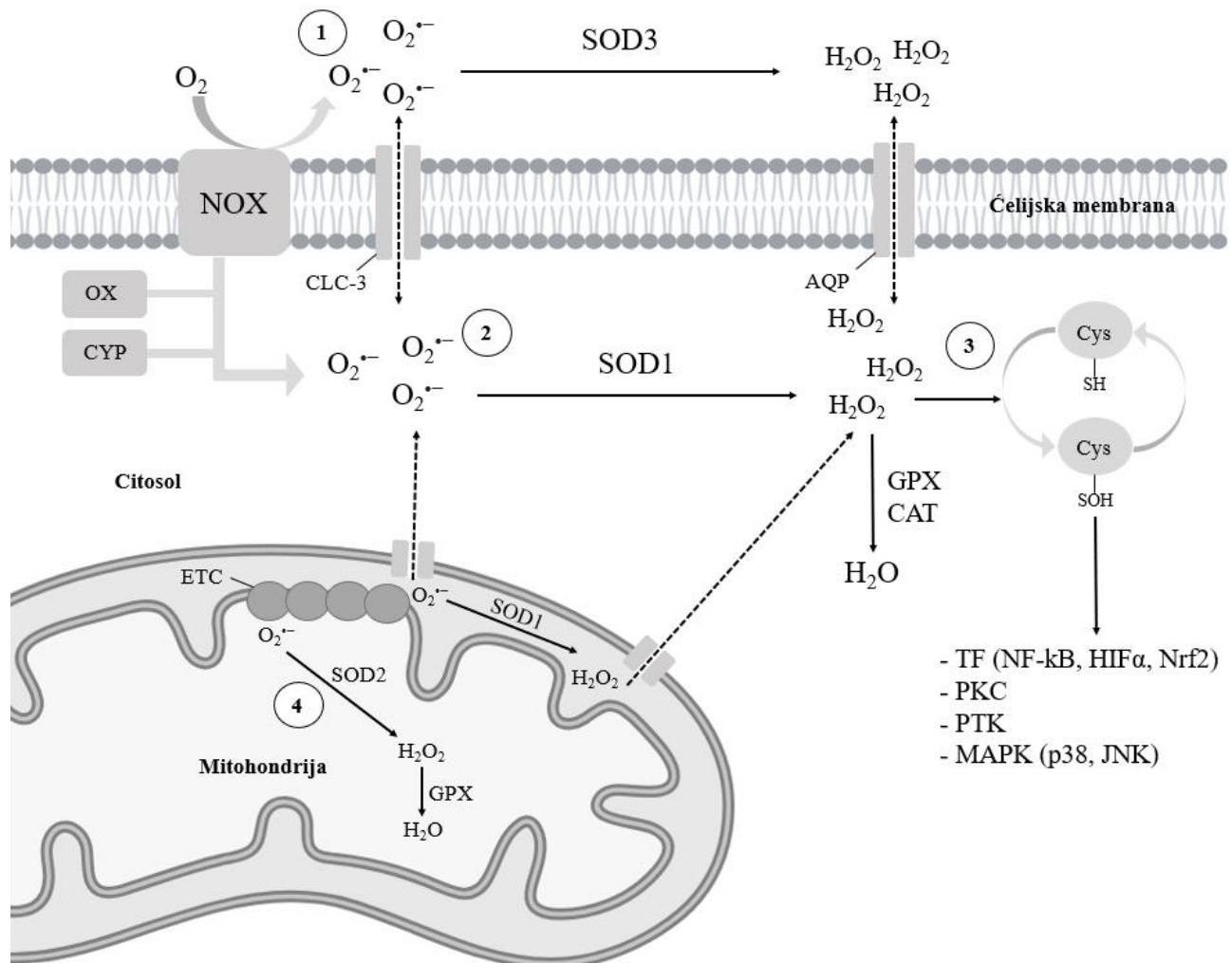
Pretpostavlja se da supresijom JNK1, GSTP1 utiče i na tumor supresor p53 koji vodi ka apoptozi, kao i na slične supresore mitohondrijalnog puta pokretanja programirane ćelijske smrti [46]. Osim sa JNK1, pokazano je da heterodimere mogu formirati i druge klase glutation S-transferaza sa pi klasom [58]. Istraživanja ukazuju na interakciju GSTP1 sa proteinom koji katalizuje post-translaciono sparivanje proteina i poseduje ulogu u apoptozi [59].

Svojom sposobnošću da katalizuje neutralizaciju ksenobiotika među kojima su i brojni kancerogeni, može se pretpostaviti da pi klasa glutation S-transferaza inicijalno, pre nego što nastupe mutagene promene, može zaštititi tkivo od značajnih i potencijalno destruktivnih oštećenja. Međutim, unutar već izmenjenih ćelija i tkiva, aktivnost GSTP1 značajno je potencirana. Sa jedne strane, povećana ekspresija i aktivnost GSTP1 mutiranoj ćeliji pomaže da neutralizuje i zaštititi se od hemioterapeutika, dok sa druge strane, dodatno interagujući sa velikim brojem ćelijski važnih molekula, doprinosi izbegavanju programirane ćelijske smrti i sposobnosti tumorskih ćelija da nekontrolisano rastu i umnožavaju se.

### 1.2.4. Uloga metabolizma vodonik peroksida u tumorskoj mikrosredini

Stalni proizvođač reaktivnih kiseoničnih radikala jesu mitohondrije. Čak 1% kiseonika koji ulazi u ciklus ćelijskog disanja, konvertuje se u superoksid anjon [17]. Nastali anjon zbog svoje jonizovanosti nije liposolubilnan, ali vodonik peroksid koji se odmah potom stvara nema naelektrisanje, stabilniji je i može proći kroz ćelijske membrane bilo difuzijom bilo prolaskom kroz akvaporine [60,61]. Ranije je bila poznata samo uloga  $H_2O_2$  u urođenom imunskom odgovoru. Kao molekul unutar peroksizoma, znalo se da učestvuje u razgradnji patogenih mikroorganizama i njihovih organela. Sa daljim ispitivanjima i saznanjem da se ponaša i kao signalni molekul, otkriveno je da može uticati na ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i migraciju [60]. Međutim, zbog svoje reaktivnosti  $H_2O_2$  u prekomernim koncentracijama može značajno oštetiti fosfolipide membrana i ribonukleinske kiseline unutar ćelije [62].

Dva ključna enzima koji utiču na koncentraciju  $\bullet O_2^-$  i  $H_2O_2$ , jesu superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze. Superoksid dizmutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD) katalizuju pretvaranje superoksid anjona u vodonik peroksid, čija je dalja redukcija do molekula vode katalizovana glutation peroksidazama (engl. *glutathione peroxidase*, GPX) (Slika 9).



**Slika 9.** Prikaz odvijanja reakcija kiseoničnih radikala posredovanih superoksid dizmutazama i glutation peroksidazama. U aerobnim uslovima, NADPH oksidaza (engl. *NADPH oxidase*, NOX)

dovodi do pretvaranja molekula kiseonika u superoksid anjon koji potom u reakciji katalizovanoj od strane SOD3, van ćelije biva pretvoren u vodonik peroksid (1). Dok  $\bullet\text{O}_2^-$  mogu da se kreću iz ćelije i u ćeliju putem cloridnih kanala (engl. *chloride channel-3*, CLC-3),  $\text{H}_2\text{O}_2$  se kreće kroz akvaporine (engl. *aquaporine*, AQP). Osim NOX, citosolne ksantin oksidaze (engl. *xanthine oxidase*, OX) i citohrom P450-monooksigenaze (engl. *cytochrome P450-monooxygenases*, CYP) takođe omogućavaju stvaranje superoksid anjona koji potom ulazi u reakciju stvaranja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , u citosolu katalizovanom SOD1 (2). Nastali vodonik peroksid neutralizuje se posredstvom glutation peroksidaza i katalaza kada nastaju neutralni molekuli vode. Međutim, reaktivni molekuli  $\text{H}_2\text{O}_2$  stupaju i u reakciju sa tiolnim grupama cisteina unutar signalnih proteina (3) što pokreće kaskadu aktivacije transkripcionih faktora (engl. *transcriptional factor*, TF), poput NF- $\kappa$ B, HIF- $\alpha$ , Nrf, zatim protein kinaza C (engl. *protein kinase C*, PKC), proteinskih trozin-kinaza (engl. *protein tyrosine kinase*, PTK) i mitogen-aktivirajućih protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK) među kojima su p38 kao i JNK. Unutar mitohondrija (4), posredstvom SOD2, takođe se odvija reakcija neutralizacije superoksid anjona nastalih unutar elektron-transportnog lanca (engl. *electron transport chain*, ETC). Nastali vodonik peroksid se jednako kao i u citosolu pretvara u molekule vode posredstvom GPX. Preuzeto i prilagođeno od Wang Y. i sar. 2018 [60], kreirano pomoću BioRender.com.

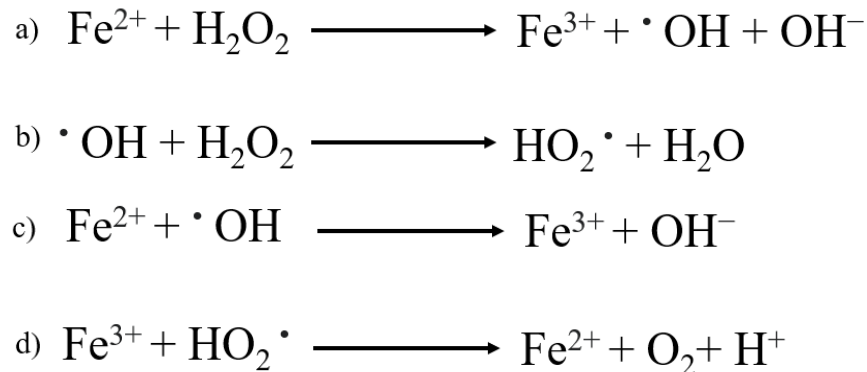
#### 1.2.4.1. Superoksid dizmutaze

Čim su otkrivene, superoksid dizmutaze su označene kao prva linija odbrane od slobodnih kiseoničnih radikala. Smatra se da svi aerobni organizmi moraju posedovati barem jednu SOD. Postoje tri klase ovih enzima koje se razlikuju u jonima metala koji ulaze u sastav njihovog katalitičkog mesta [63–65]. Za prvu klasu, SOD1, karakteristično je da imaju bakar i cink, druga klasa, SOD2 u svom sastavu ima mangan, a treća nikal. Eukariotske ćelije imaju ekstracelularno i unutar citoplazme SOD1, dok je SOD2 eksprimirana u mitohondrijama [60]. Kroz istraživanja je pokazano da je druga klasa esencijalna za život u aerobnim uslovima [66].

Gen za superoksid dizmutazu 2 nalazi se na dugom kraku šestog hromozoma (6q25.3) na poziciji 159669069-159762281. U njegov sastav ulazi 10 egzona, a konačni enzim gradi 219 amino kiselina organizovanih u homotetramer gde svaka jedinica za sebe ima vezan po jedan jon Mn [67].

Kao katalizator dizmutacije superoksid anjona, SOD2 ima značaj u oboljenjima koja su indukovana stresom jer obezbeđuje zaštitu genetskog materijala od mutacija koje bi mogle dovesti do tumorigeneze. Takođe utiče na različite transkripcione faktore, među kojima je i p53, a smatra se da ukoliko je intenzivirana ekspresija i aktivnost, dovodi do inhibicije ćelijske proliferacije i potenciranja apoptoze [67]. Pretpostavlja se da ukoliko je SOD2 unutar tumorskih ćelija dodatno aktivirana, dolazi do porasta koncentracija vodonik peroksida što šteti ćeliji i onemogućava joj dalji rast [68].

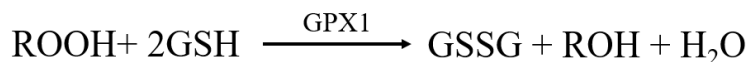
Ukoliko se vodonik peroksid zadrži unutar ćelije, on podleže Fentonovoj reakciji kojom se, u prisustvu fero jona ( $\text{Fe}^{2+}$ ), stvara hidrosilni radikal, dodatno reaktivniji i potencijalno opasniji (Slika 10) [69,70]. Zbog limitirane dostupnosti jona gvožđa, Fentonova reakcija se ne može neograničeno odvijati, ali kada nastupi oksidativni stres i kada se iz intracelularnih zaliha oslobode joni, značajno je potencirano stvaranje  $\bullet\text{OH}$  [69]. Glutation peroksidaze kao ključni enzimi koji katalizuju reakciju stvaranja neutralnih molekula vode, obezbeđuju uklanjanje prekomerno nastalih  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Slika 10.** Reakcije uključene u Fentonov proces. Fentonova reakcija je prvi put opisana 1894. godine kao reakcija kojom se uočava izražen oksidativni potencijal vodonik peroksida kada je gvožđe prisutno kao katalizator (a). Dodatne reakcije (b-d) deo su Fentonovog procesa, opisane od strane *Haber* i *Willstätter* 1931. godine. Preuzeto od *Sillanpää M.* 2020 [70].

#### 1.2.4.2. Glutation peroksidaze

Glutation peroksidaze (engl. *glutathione peroxidase*, GPX) su porodica enzima koja za supstrat koristi glutation (Slika 11) [71]. Zna se da postoji osam izoenzima obeleženih brojevima od 1 do 8 [72]. Prve četiri u svom katalitičkom centru imaju selenocistein koji doprinosi brzini reakcije [73]. Prvi izoenzim je prvi identifikovan selenoprotein, a takođe i jedan od najzastupljenijih predstavnika. Ekspimiran je najviše u citosolu i u mitohondrijama, a u pojedinim ćelijama i u peroksizomima [74].

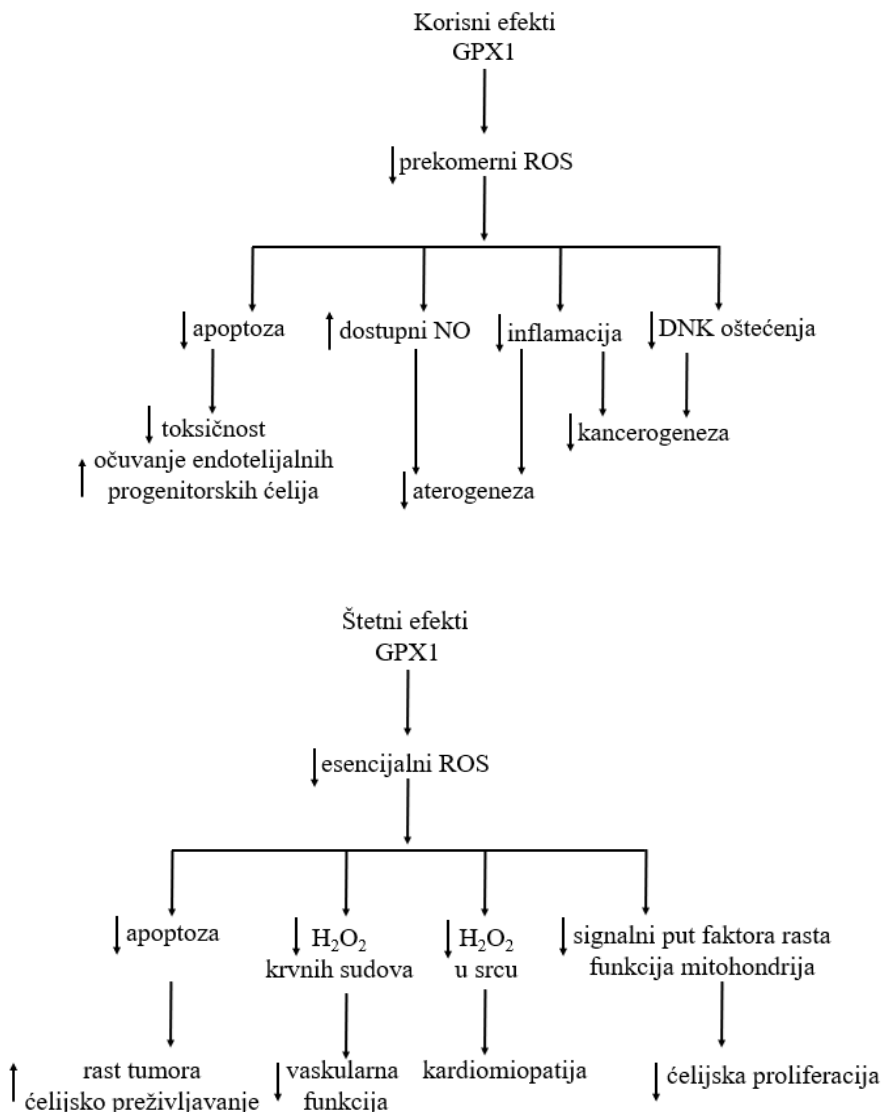


**Slika 11.** Osnovna reakcija koju katalizuje GPX1 je redukcija različitih hidroperoksida pomoću glutationa. Preuzeto od *Ursini F.* i sar. 2013 [71].

Gen za GPX1 smešten je na kratkom kraku trećeg hromozoma (3p21.31) i zauzima mesta od 49357176 do 49358353 bazna para [75]. Sastoji se od svega dva egzona, a celokupni protein ima 223 amino kiseline [75]. Njegova ekspresija je pod uticajem faktora okoline, najviše koncentracijama kiseonika koje su ćeliji dostupne. Istraživanjima se ukazuje da u hipoksičnim uslovima unutar ćelije dolazi do smanjene transkripcije ovog gena i da posledično smanjenje koncentracija ovog enzima olakšava oštećenja nastala nakon reperfuzije [69]. Tumor supresor p53 takođe može ostvariti uticaj na transkripciju *GPX1* i dodatna sinteza superoksid anjona potencira stvaranje aktivnog enzima [76]. Iako nedovoljno istraženo, kaskada koju pokreće Nrf2, može direktno ili indirektno uticati i na povećanu ekspresiju GPX1 [77].

Uloga GPX1 u tumorigenezi je diskutabilna i samim tim predmet velikog broja ispitivanja. Prepostavlja se da barem u inicijalnoj fazi nastanka tumora, sprečavanjem oksidativnih oštećenja DNK, igra odbrambenu ulogu [78]. Ali sve je više studija koje govore u prilog da u samim tumorskim ćelijama mogu biti deo njihovog novonastalog mehanizma za zaštitu od hemioterapije

[79–81]. Zaštitna uloga koju ostvaruje u normalnim ćelijama, iako pogodna za maligne ćelije, pogubna je za organizam jer povećana aktivnost GPX1 povezana je sa bržim rastom tumora, agresivnijom intravaskularnom proširenošću, i zapravo ovaj enzim sprečava da nastupi apoptoza tumorskih ćelija i podržava njihov rast (Slika 12) [78,82,83].



**Slika 12.** Dvojna uloga glutation peroksidaze 1. Kada se u ćeliji nakupi prekomerna količina ROS, GPX1 uklanjanjem ovog viška ima korisnu ulogu. Kada nastane post-ishemijska reperfuzija, GPX1 sprečava toksični efekat ROS i omogućava očuvanje endotelijalnih progenitorskih ćelija kao i  $\beta$ -ćelija pankreasnih ostrvaca. Oslabljena inflamacija i sprečavanje oštećenja DNK smanjuju mogućnost kancerogeneze. Povećanje dostupnog azot-monoksida ublažava proces tromboze i posledično i aterogeneze. Sa druge strane, smanjenjem koncentracije esencijalnih kiseoničnih radikala, GPX1 štiti tumorske ćelije od apoptoze i pospešuje rast tumora. Smanjenje koncentracije ROS u srcu i krvnim sudovima dovodi do oslabiljene vaskularne funkcije i nastanka kardiomiopatije. Takođe, signalni put faktora rasta i mitohondrijalna funkcija su umanjene, što sve doprinosi insulinskoj rezistenciji i umanjuje ćelijsku proliferaciju. Preuzeto i prilagođeno od *Lubos E.* i sar. 2011 [69].

### 1.2.5. Značaj antioksidantnih proteina u procesu kancerogeneze

Sa sve detaljnijim saznanjima o složenosti interakcija reaktivnih kiseoničnih radikala i proteina čiju aktivaciju oni inhibiraju ili potenciraju, postala je jasnija ambivalentna uloga transkripcionih faktora i enzima koji su u normalnim uslovima deo antioksidantne zaštite. Kako za zdravu ćeliju oni čine osnovu zaštite od ROS, tako i tumorskoj ćeliji koja je izložena još većim koncentracijama radikala, oni pomažu da izbegne oksidativna oštećenja i da potencijalno bude uništena. Tumorska ćelija postepeno stvara svoju mikrosredinu u kojoj, uprkos potpuno narušenoj redoks homeostazi, ona opstaje, nastavlja da se nekontrolisano umnožava i konačno širi ka celom organizmu i metastazira. Štaviše, vremenom tumorska ćelija počinje da oslobađa deo ROS u svoje okruženje što registruju fibroblasti udruženi sa kancerom (engl. *cancer associated fibroblasts*), što dalje doprinosi aktivaciji HIF-1 i VEGF, odnosno procesu angiogeneze [84]. Na kraju, i ako se započne sa hemioterapijom, lekovi koji za ćeliju predstavljaju egzogene toksine, bivaju neutralisani pomoću enzima koji su pojačano eksprimirani i aktivni, a efekti lekova brzo poništeni. Upravo zbog toga, preciznije razumevanje kontrole redoks homeostaze može omogućiti razvoj efikasnijih strategija kako za praćenje, tako i za terapijske režime malignih oboljenja.

### 1.3. Karcinom bubrežnog parenhima

Bubreg je organ čije tkivo održava stabilnost volumena i elektrolitnog sastava telesnih tečnosti. Čitavim nizom procesa reguliše vrednost arterijskog pritiska, sintezom eritropoetina utiče na eritropoezu, a kako se deo metabolizma vitamina D odvija upravo u bubrežnom parenhimu, tako očuvana funkcija ovog tkiva ima značaj i za normalnu građu kostiju [85]. U celini, bubreg je inkapsuliran, a čine ga parenhim zajedno sa renalnim sinusom u kojem se urin nakuplja i uklanja ka ureterima. Parenhim je izgrađen od nefrona, morfofunkcionalne jedinice bubrega [85]. Renalni tumori koji nastaju malignom promenom parenhimskih ćelija, uglavnom predstavljaju adenokarcinome i zato se nazivaju karcinomi bubrežnog parenhima (KBP). Mutacije ćelija sabirnih kanalića najčešće pripadaju tranzitornim ćelijskim karcinomima [86].

#### 1.3.1. Epidemiološki podaci

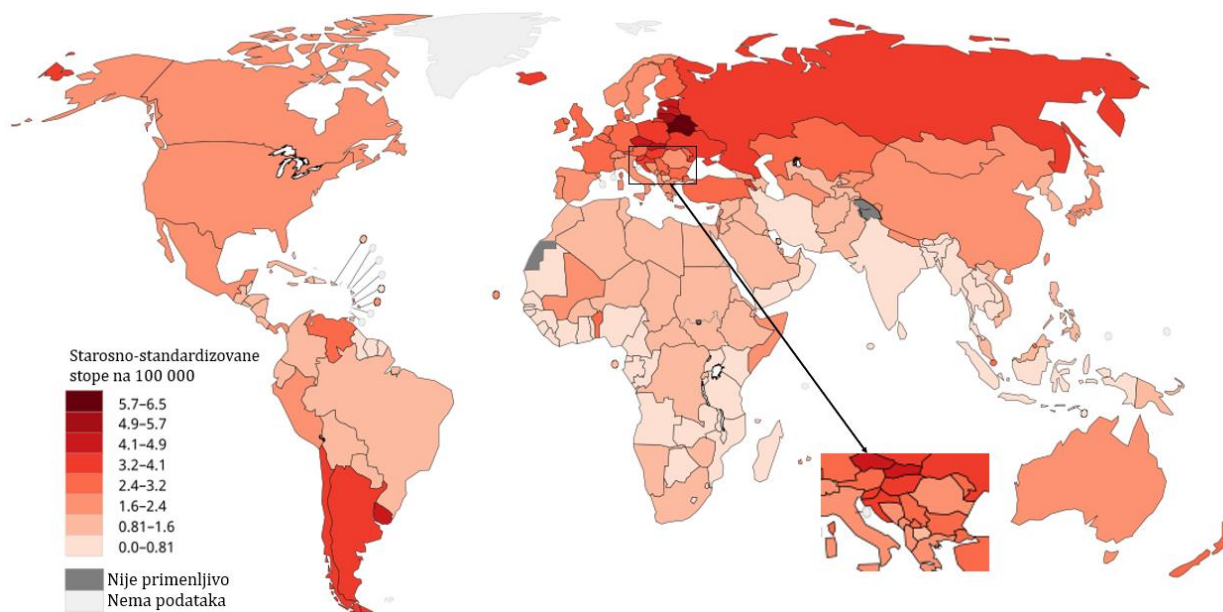
Prema statističkim podacima iz 2020. godine, od preko 19 miliona novonastalih tumora, nešto više od 2% novootkrivenih tumora jesu promene bubrega, a skoro jednak procenat smrtnih ishoda usled maligniteta pripisuje se takođe tumorima bubrega [87]. Karcinom bubrežnog parenhima čini oko 90% svih maligniteta bubrega [88].

Uprkos što zabeleženom godišnjem porastu incidencije karcinoma bubrega za 1% u Sjedinjenim Američkim Državama, istovremeno smanjenje mortaliteta za 2% godišnje ukazuje koliko je rana dijagnostika, poboljšanje pristupa i osavremenjenost terapijskih režima esencijalna za dalji napredak [89]. U Evropi se u poslednje dve decenije beleži porast incidencije za 2% godišnje, dok se mortalitet postepeno smanjuje, mada nešto sporije u državama istočne Evrope [88].

Kod muškaraca je incidencija 1,5-2 puta veća u odnosu na žene, dok se ovaj tumor najčešće javlja u sedmoj deceniji [90]. Epidemiološka ispitivanja za 2020. godinu navode da od 431 288 novootkrivenih slučajeva, čak 32% su zabeležena u evropskim zemljama [91]. Smatra se da je značajno veći procenat slučajeva zabeležen u Severnoj Americi i Evropi zbog dostupnosti



radioloških ispitivanja abdomena, tako da je veća prevalencija dijagnostikovanih malih renalnih tumorskih masa (Slika 13) [91,92].



**Slika 13.** Starosno-standardizovane stope mortaliteta karcinoma bubrežnog parenhima na 100 000 osoba oba pola. Preuzeto od *Huang J.* i sar. 2022 [92].

### 1.3.2. Dijagnostički pristup

Više od polovine slučajeva dijagnostikuje se radiološkim ispitivanjima (ultrazvučno ili kompjuterizovanom tomografijom) koja su indikovana iz drugih, nevezanih razloga. Sve do uznapredovale faze bolesti, pacijenti su asimptomatski [88]. Trijada simptoma i znakova oboljenja – bol u lumbalnoj regiji, palpabilna abdominalna masa i makroskopska hematurija, koja je dugo smatrana za galvno obeležje KBP, viđa se sve ređe (svega 6-10% slučajeva) [93], a ako nastane, tada je malignitet najčešće u odmaklom stadijumu i prognoza je loša [94]. Uznapredovali KBP u nepunih 12% slučajeva ima procenjeno preživljavanje duže od 5 godina [95]. Skoro trećina pacijenata ima paraneoplastični sindrom, i mogu biti zahvaćeni skoro svi organi [93,96]. Simptomi metastatske bolesti zavise od toga koji sistem je sekundarno zahvaćen, pa se tako beleže bolovi u skeletnom sistemu, umor, kašalj [97].

Renalne tumorske mase mogu se uočiti i opisati ultrazvučno, kompjuterizovanom tomografijom (engl. *computed tomography*, CT) i magnetnom rezonancijom (*magnetic resonance imaging*, MRI). Ukoliko je prikazana masa mala ili nejasno vizualizovana, praćenje se vrši ultrasonografski, a za jasne tumorske mase kontrastna CT abdomena i grudnog koša pogodna je za određivanje stadijuma bolesti. Savetuje se biopsija tumora pre otpočinjanja ablativne terapije [88].



### 1.3.3. Patohistološka podela i *TNM* klasifikacija

Svetska zdravstvena organizacija je prilikom inicijalne podele KBP imenovala pojedine grupe naspram njihovog izgleda citoplazme, razlika u arhitekturi tkiva, anatomskoj lokalizaciji tumora, ali sa sve većim razvojem istraživanja, definisane su i grupe prema karakterističnim molekularnim promenama [98]. Najveću i najznačajniju grupu čini svakako svetloćelijski karcinom bubrežnog parenhima (sKBP) koji čine 80-90% slučajeva KBP. Za njim su po učestalosti papilarni (10-15%) a potom hromofobni karcinomi (4-5%) [88].

Kada se postavi dijagnoza KBP, od najvećeg značaja je identifikacija koji tip karcinoma je u pitanju jer različiti tipovi imaju različit tok bolesti, te moraju biti odvojeno posmatrani i analizirani. Sve više se smatra da molekularna osnova bolesti pojedinačnih podtipova može najviše ukazati na dalju prognozu. U okviru pete revizije klasifikacije renalnih maligniteta, predviđa se potreba za integrisanim pristupom kako bi se formirala još preciznija podela ovih tumora. I za već postojeće klase postaje jasno da promene na molekularnom nivou igraju ulogu u razumevanju i poboljšanju pristupa pri dijagnostici i odabiru terapijskog režima.

Promene u prognozi u odnosu na anatomske karakteristike i da li je prisutna samo tumorska masa ili postoji zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova ili pak udaljenih metastaza, klinički i naučno nametnula je potrebu da se tumori klasifikuju prema stadijumu (engl. *tumour-node-metastasis stage classification*, *TNM*) (Tabela 5). Prvi stadijum podrazumeva da postoji samo tumorska masa veličine do 7 cm, bez zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova i bez udaljenih metastaza. Drugi stadijum označava da je tumorska masa veća od 7 a manja od 10 cm, bez dalje rasprostranjenosti maligniteta, ali i ukoliko je tumorska masa veća i proširena na velike vene ili na okolna tkiva ali bez širenja van Gerotove fascije. Trećim stadijumom obeležene su tumorske mase bilo koje veličine koje ne remete Gerotovu fasciju, ukoliko postoji zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova bez raširenih metastaza, dok je četvrti stadijum onaj u kojem nevezano kolika je primarna masa i da li su zahvaćeni limfni nodusi, postoje udaljene metastaze [99,100].

**Tabela 5.** *TNM* klasifikacioni sistem 2017. godine. Preuzeto od *Ljungberg B.* 2023 [91].

<b>T – primarni tumor</b>	
<b>TX</b>	Nemoguća procena primarnog tumora
<b>T0</b>	Nema dokaza za primarni tumor
<b>T1</b>	Tumor $\leq 7$ cm u svom najvećem dijametri, ograničen na bubreg <b>T1a</b> Tumor $\leq 4$ cm <b>T1b</b> Tumor $>4$ cm ali $\leq 7$ cm
<b>T2</b>	Tumor $>7$ cm u svom najvećem dijametri, ograničen na bubreg <b>T2a</b> Tumor $>7$ cm ali $\leq 10$ cm <b>T2b</b> Tumor $>10$ cm, ograničen na bubreg
<b>T3</b>	Tumor se širi ka velikim venama i perifernim tkivima, ali ne ka ipsilateralnoj nadbubrežnoj žlezdi i ne van Gerotove fascije <b>T3a</b> Tumor se širi u renalnu venu ili segmentne grane, ili vrši invaziju pelvikalicealnog sistema ili periranealnih i/ili renalnog masnog tkiva, ali ne van Gerotove fascije <b>T3b</b> Tumor se značajno širi u venu kavu ispod dijafragme <b>T3c</b> Tumor se značajno širi u venu kavu iznad dijafragme ili vrši invaziju zida vene kave
<b>T4</b>	Tumor vrši invaziju van Gerotove fascije (uključujući esktenziju u ipsilateralnu nadbubrežnu žlezdu)

**Tabela 5 (nastavak).** TNM klasifikacioni sistem 2017. godine. Preuzeto od *Ljungberg B.* 2023.

<b>N – regionalni limfni čvorovi</b>			
<b>NX</b>	Nemoguća procena regionalnih limfnih čvorova		
<b>N0</b>	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima		
<b>N1</b>	Metastaze u regionalnom limfnom čvoru/limfnim čvorovima		
<b>M – udaljene metastaze</b>			
<b>M0</b>	Nema udaljenih metastaza		
<b>M1</b>	Postoje udaljene metastaze		
<b>pTNM stadijumi tumora</b>			
Stadijum I	T1	N0	M0
Stadijum II	T2	N0	M0
Stadijum III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadijum IV	T4	Bilo koji N	M0
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

#### 1.3.4. Terapijski pristup

Za lokalizovane forme svih tipova karcinoma bubrežnog parenhima, hirurško uklanjanje je jedini kurativni tretman [88]. U zavisnosti od veličine primarne tumorske mase, može se pristupiti parcijalnoj ili radikalnoj nefrektomiji sa ciljem da se u slučajevima kada je to moguće, sačuva normalni bubrežni parenhim što je više moguće. Pristup je svakako individualan.

Razumevanje genetske osnove naslednih tumora bubrega, među kojima su i tumori povezani sa *von Hippel-Lindau* proteinom, nametnuo je potrebu da se različito pristupa potencijalno hereditarnim malignitetima. Sa druge strane, saznanja o njihovom tretmanu imaju uticaj i na lečenje sporadičnih slučajeva jer molekularna osnova može biti slična. Pre svega, tumori koji se razvijaju pre 46 godine, ako su bilateralni ili multifokalni, i ako u porodičnoj anamnezi postoji već ranije zabeležen slučaj KBP, mogu ukazati da je u pitanju nasledno oboljenje. Za pacijente koji imaju VHL tumore bubrega, koji su biološki manje agresivni, savetuje se da budu praćeni na 12-36 meseci, dok najveća tumorska masa ne dostigne veličinu od 3 cm, kada se pristupa minimalno invazivnoj parcijalnoj nefrektomiji [101].

U slučaju metastatskog oboljenja, saznanje da je svetloćelijski KBP vrlo vaskularizovan tumor, preusmerila je primenu sistemske hemioterapije ka anti-angiogenim terapijskim režimima. Sunitinib i pazopanib predstavljaju prvu liniju hemioterapeutika, a axitinib i sorafenib drugu liniju. Oni predstavljaju inhibitore tirozin kinaze koji utiču na VEGF [102,103]. Sa druge strane, odobreni su i everolimus i temsirolimus kao inhibitori druge ćelijske putanje koja kontroliše ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje [104]. Nažalost, sve se više beleže slučajevi kako

urođene tako i stečene rezistencije na hemioterapiju, kada se preporučuje pokušaj „*rechallenge*“ terapije, odnosno ponovni pokušaj primene nekog od ranije korišćenih terapijskih režima [105].

### 1.3.5. Faktori rizika za nastanak KBP

Etiopatogeneza karcinoma bubrežnog parenhima je kompleksna. Prepoznata su stanja i životne navike koje mogu povećati rizik za nastanak ovog tumora kao što su povišen arterijski pritisak, povišen indeks telesne mase, pušenje. Takođe, postoje oboljenja koja se češće javljaju udružena sa ovim tumorom, a svakako da u slučajevima hereditarnih maligniteta genetska osnova igra važnu ulogu.

Jedno od najčešćih hroničnih oboljenja modernog doba je povišen arterijski pritisak, hipertenzija. Definisana je kao hronično povišene vrednosti sistolnog pritiska iznad 140 mmHg i/ili dijastolnog pritiska preko 90 mmHg. Procenjeno je da od 20 do 40% svetske populacije ima povišen arterijski pritisak [106]. Hronična idiopatska hipertenzija kao nezavisan entitet nije u potpunosti rasvetljena i njena patofiziologija još uvek predstavlja predmet brojnih istraživanja. Poslednjih decenija se ispituje kao oboljenje povezano sa oksidativnim stresom i hroničnom inflamacijom [107–109]. Kao i kod drugih kardiovaskularnih oboljenja, smatra se da dolazi do slabljenja antioksidantnih odbrambenih kapaciteta i oksidativni stres postepeno doprinosi endotelijalnoj disfunkciji i povećanju rigidnosti arterijskog zida, što sve čini osnovu povišenih vrednosti krvnog pritiska. Istraživanja čitav niz godina potvrđuju da su osobe sa povišenim vrednostima arterijskog pritiska u većem riziku za nastanak KBP [106,110–112]. Očekuje se da nekontrolisana hipertenzija povećava rizik nezavisno od ostalih faktora rizika, i to 2 do 3 puta, a da bi odgovarajuća kontrola arterijskog pritiska mogla značajno da smanji rizik [113]. Od velike važnosti je progresija hroničnog oboljenja bubrega ka terminalnim fazama bolesti i iscrpljivanju funkcionalnih kapaciteta usled nekontrolisane hipertenzije. Ovo stanje dodatno povećava rizik za razvoj KBP [106]. Pretpostavlja se da uz tkivnu hipoksiju, narušena redoks homeostaza koja postoji kod hipertenzivnih osoba, može biti u pozadini ovog faktora rizika [114,115].

Prekomerna telesna masa vodi ka metaboličkom poremećaju organizma, gojaznosti. Gojaznost se kvantifikuje procenom indeksa telesne mase (engl. *body mass index*, BMI) koji se računa kao količnik telesne mase ispitanika i kvadrata telesne visine prikazane u metrima ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Smatra se da osobe koji imaju indeks telesne mase veći od  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$  imaju prekomernu telesnu masu, a da gojaznost podrazumeva indeks telesne mase veći od  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ . Adipozitet je danas prepoznat kao drugi najčešći faktor rizika za razvoj maligniteta [116]. Povezuje se sa karcinomima jednjaka, dojke, jetre, žučne kese, pankreasa, pa i bubrega. Kako kod muškaraca tako i kod žena, smatra se da povećanje BMI za  $5 \text{ kg}/\text{m}^2$  značajno povećava rizik za nastanak karcinoma bubrežnog parenhima [117]. Patofiziološki, uticaj koji prekomerna telesna masa ima za razvoj tumora objašnjava se time da se unutar belog masnog tkiva pored adipocita nakupljaju i endotelne ćelije, prekursorske ćelije, T i B limfociti, makrofagi i neutrofili, koji zajednički stvaranjem adipokina, pro-inflamatornih citokina i hormona, mogu dovesti do izmenjene mikrosredine i posledično stvoriti uslove za malignu alteraciju ranije zdravih ćelija.

Nasuprot očekivanjima, uočeno je da gojazni pacijenti sa KBP imaju bolje sveukupno preživljavanje u odnosu na obolele sa normalnom telesnom masom, što izaziva dosta diskusije i privlači pažnju istraživača [118,119]. Daljim proučavanjem molekularne osnove svetloćelijskog KBP i analizom u kontekstu povišenog BMI, povezan je genetički profil koji može dati odgovore i objašnjenja „paradoksa gojaznosti“. Pokazano je da je među pacijentima sa prekomernom telesnom masom postaju aktivirani ćelijski signalni putevi povezani sa hipoksijom i angiogenezom

uz puteve koji kontrolišu glikolizu, adipogenezu i metabolizam masnih kiselina [120]. Iako je hirurško lečenje KBP i dalje najznačajnije, u slučaju metastatskih formi bolesti, gojaznost bi mogla igrati ulogu u odabiru hemioterapije upravo zato što se pretpostavlja da signalnim putevima na koje postojeća sistemska terapija ostvaruje efekat, gojaznost takođe utiče na prognozu bolesti.

Pušenje takođe predstavlja prepoznati faktor rizika za nastanak karcinoma bubrežnog parenhima. U zemljama koje su još uvek u socioekonomskom razvoju, prevalencija pušenja nije značajno smanjena. Muškarci koje konzumiraju cigarete imaju 50% veći rizik za nastanak ovog maligniteta u odnosu na osobe koje nikada nisu pušile, a žene do 20%. Ukoliko pušači prestanu sa konzumacijom duže od 10 godina, smatra se da se rizik može smanjiti [106,121]. Organizam je prilikom konzumiranja duvanskog dima izložen ugljen-monoksidu, pa su usled toga tkiva u stanju hronične hipoksije. Pored toga, kako pušenje dovodi do hronične opstruktivne bolesti pluća, promena plućnog parenhima remeti adekvatnu razmenu gasova što dodatno utiče na opštu hipoksiju unutar organizma. Sa druge strane, čak 55 hemijskih jedinjenja za koja se zna da imaju kancerogeni potencijal (policiklični aromatični ugljovodonici, aldehidi, aromatični amini), ulaze u sastav duvanskog dima [122].

Pored hipertenzije, gojaznosti i izloženosti duvanskom dimu, karcinom bubrežnog parenhima povezan je i izloženosti organskim rastvaračima, pesticidima, metalima koji se koriste u industriji. Takođe se ispituje koliko nedostatak fizičke aktivnosti, konzumiranje mlečnih produkata, voća i povrća mogu uticati na rizik za razvoj ovog maligniteta. Kako se stalno nailazi na kontradiktorne podatke u literaturi, vremenom je postalo jasno da genetička i molekularna osnova mogu dati više odgovora o etiopatogenezi u odnosu na epidemiološke podatke. Zbog različitosti u molekularnim osobinama između klasa karcinoma bubrežnog parenhima, one se moraju analizirati zasebno.

#### 1.4. Uloga poremećene redoks homeostaze u patogenezi svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima

Svetloćelijski karcinom bubrežnog parenhima, kao što je već rečeno, predstavlja najčešći tip ovog maligniteta, ali, nažalost, ima i najagresivniji tok oboljenja sa visokim stepenom lokalne invazije, metastaza, pa samim tim i mortaliteta [88]. Uz to, čak 40% pacijenata ima recidiv nakon inicijalnog tretmana lokalizovanog tumora [123]. Tumorska mikrosredina sa prooksidantnom aktivnošću ima veliki značaj u nastanku i daljoj progresiji sKBP.

Svetloćelijski tip KBP dobio je naziv zbog karakteristično čiste, svetlo prebojene citoplazme ćelija prilikom mikroskopske vizualizacije. To je rezultat nakupljanja lipida, tako da ćelije podsećaju na svetlo masno tkivo. U tumorima višeg gradusa mogu se videti eozinofilne granule unutar citoplazme [124]. Postoji pretpostavka da patognomonična adipogeneza ćelijama sKBP zapravo omogućava preživljavanje [125]. Takođe, u slučajevima sKBP uočeno je potenciranje aerobne glikolize i fermentacije laktata [126]. Sve ovo ukazuje na potrebu da se svetloćelijski KBP posmatra i tumači kao metaboličko oboljenje. Brojni istraživači čak naglašavaju da je neophodna detaljnija klasifikacija na podtipove na osnovu molekularnih karakteristika, i da bi upravo to dodatno pomoglo pri identifikaciji tumora sa lošijom prognozom [127,128].

Pre svega, jedna od najvažnijih molekularnih izmena za razumevanje sKBP jeste inaktivacija gena za tumor supresorni protein pVHL [129]. Može doći bilo do mutacije, bilo do potpunog gubitka aktivnosti ovog gena epigenetskim mehanizmima. Bialelna inaktivacija *VHL* gena nalazi se u osnovi razvoja hemangioblastoma, epididimalnih cistadenoma, neuroendokrinih

tumora i karcinoma bubrežnog parenhima koji čine *von Hippel Lindau* sindrom [130]. Proučavanjem skupa ovih tumora je i otkriven pVHL i njegov odgovarajući gen. Interesantno je da čak 80 % sporadičnih slučajeva sKBP imaju promene u *VHL* na hromozomu 3 [131].

Kako pVHL omogućava ubikvitinaciju HIF- $\alpha$  a potom i njegovu degradaciju, gubitak funkcionalnog pVHL za posledicu ima nagomilavanje HIF- $\alpha$  iako je oksigenacija tkiva odgovarajuća [132]. Stvaranje heterodimera HIF- $\alpha/\beta$  dovodi do inicijacije transkripcije gena za VEGF i na taj način započinje signal za neoangiogenezu unutar tumorskog tkiva [22]. Okolne ćelije stimulirane angiogenezom, oslobađaju proinflamatorne citokine i proteaze u tumorsku mikrosredinu čime olakšavaju invaziju tumorskog tkiva u okolno, zdravo tkivo [133].

Ipak, izolovani gubitak *VHL* ili funkcije pVHL, nije dovoljan da samostalno indukuje nastanak sKBP. Kao i u svim drugim karcinomima, potrebne su i dodatne genetske ili epigenetske izmene, pretežno u kaskadi odgovora na narušenu redoks homeostazu. Upravo svetloćelijski KBP pripada grupi tumora koji se dovode u vezu sa promenama u funkcionisanju Keap1/Nrf2 osovine. Gubitak ili promene na genu koji kodira Keap1, omogućavaju stabilnost Nrf2 [134]. Zahvaljujući stabilizaciji Nrf2, i njegovom nakupljanju unutar jedra, aktiviraju se ARE sekvence u okviru DNK i započinje transkripcija i translacija čitavog niza enzima što tumorskoj ćeliji omogućava preživljavanje i samim tim povezano je sa lošijim ishodom. Jednak efekat imaju somatske mutacije *NFE2L2*, tako da i to doprinosi kancerogenezi sporadičnih slučajeva [134]. Pokazalo se da je izmenjeno funkcionisanje Keap1/Nrf2 osovine takođe povezano sa resistencijom na više hemioterapeutika zahvaljujući posledičnom potenciranju druge faze detoksikacije ksenobiotika [135].

Glutation S-transferaze, kao porodica enzima, imaju svoje značajno mesto u etiopatogenezi uroepitelijalnih tumora, između ostalog i karcinoma bubrežnog parenhima [136–138]. Interakcije i stvaranje protein:protein kompleksa između transferaza pi klase i cJun NH<sub>2</sub>-kinazom 1, pokazale su se od značaja i u slučaju sKBP, gde inhibicija JNK1 pod uticajem GSTP1 pomaže tumorskim ćelijama da izbegnu programiranu ćelijsku smrt [139].

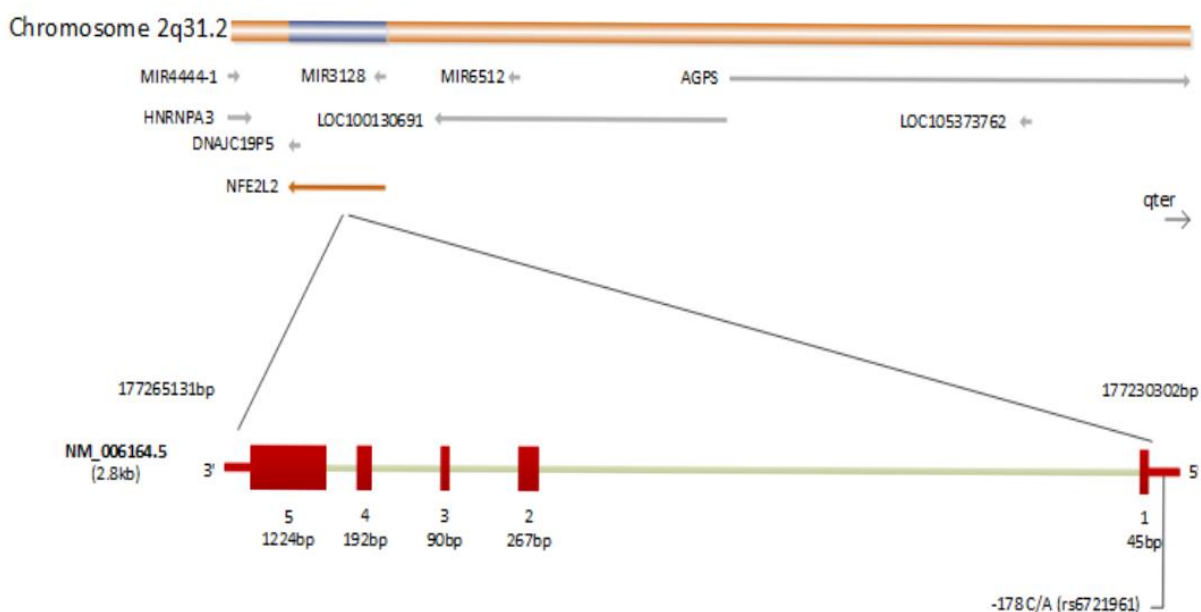
Na kraju, ali ne i najmanje značajno, izmenjen metabolizam vodonik peroksida, kao i u slučaju brojnih drugih tumora, i kod svetloćelijskog KBP predstavlja važan činilac za njegovo razumevanje. Takođe izuzetno loš prognostički efekat ima i povećana ekspresija SOD2 u tkivu KBP, što se objašnjava razvojem rezistencije ćelija na toksične efekte ROS i dodatno potpomognute migracije tumorskih ćelija ka okolnim tkivima [140]. Pored toga, i metaboliti povezani sa glutationom, čija se koncentracija povećava u uznapredovalim stadijumima sKBP, mogu ukazivati da dolazi do značajnih promena u njegovom metabolizmu [123]. U saglasnosti sa tim, pokazano je i da je povišena ekspresija GPX1 u slučaju sKBP, povezana sa lošijom prognozom [81].

### 1.5. Biomarkeri poremećene redoks homeostaze u slučaju sKBP

Godinama unazad, istraživački timovi proučavaju i ispituju veliki panel genetičkih i molekularnih promena unutar sKBP kako bi identifikovali potencijalne nove prognostičke markere i našli način da prepoznaju pacijente koji imaju veći rizik za nastanak metastatske forme bolesti, ali i za pojavu recidiva i svakako veći rizik za nastupanje smrtnog ishoda. Takođe, sa otkrivanjem značaja molekularnog profila u razvoju rezistencije na postojeću hemioterapiju, postoji stalna potreba da se identifikuju novi biomarkeri koji bi se odabir sistemske terapije mogao individualizovati.

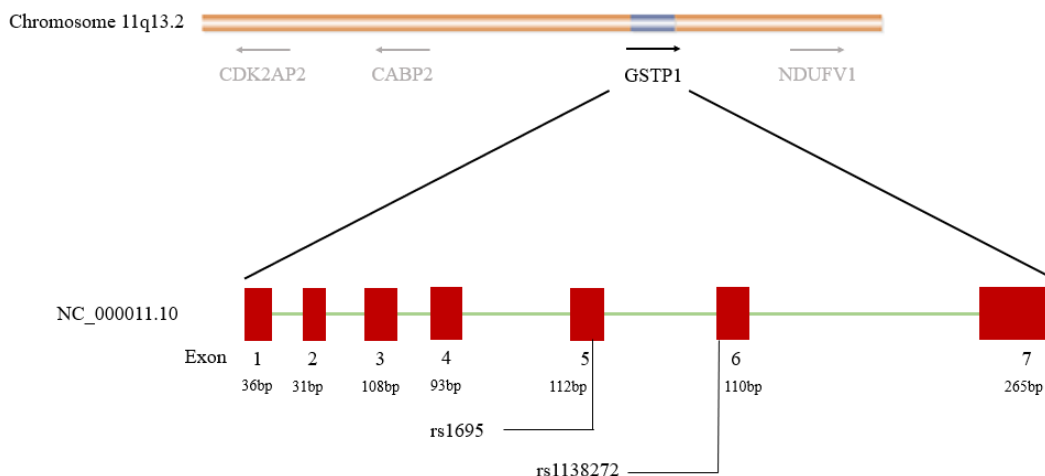
Pored promena na *VHL* genu, genetski polimorfizmi koji za posledicu mogu imati promenu nivoa ekspresije i/ili aktivnosti sintetisanih proteina, imaju svoje mesto u definisanju pacijenata podložnih nastanku i progresiji ovog tumora. Kada je sKBP u pitanju, posebna pažnja pridodaje se genetskim polimorfizmima za antioksidantne enzime kao i proteine koji utiču na njihovu ekspresiju i/ili aktivnost. Za *Nrf2*, *SOD2*, *GPX1* i *GSTP1* gene opisani su polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNP).

Polimorfizam gena za *Nrf2*, rs6721961, dovodi do supstitucije citozina adeninom na mestu -617 unutar proksimalnog promotora [141]. Kako je ovaj SNP pozicioniran na mestu koje podseća na ARE sekvencu, smatra se da se njegovom promenom menja i sposobnost samoindukcije *Nrf2* [142]. Još uvek ostaje neobjašnjen potpuni efekat polimorfizma na funkciju samog enzima i kroz istraživanja diskutuje se da li usled polimorfizma, odnosno kod varijantnog genotipa (-617AA) dolazi do slabije ili jače transkripcije samog gena (Slika 14) [143,144].



**Slika 14.** Prikaz gena za *Nrf2*. Preuzeto od Jerotić Đ. i sar, 2021 [144].

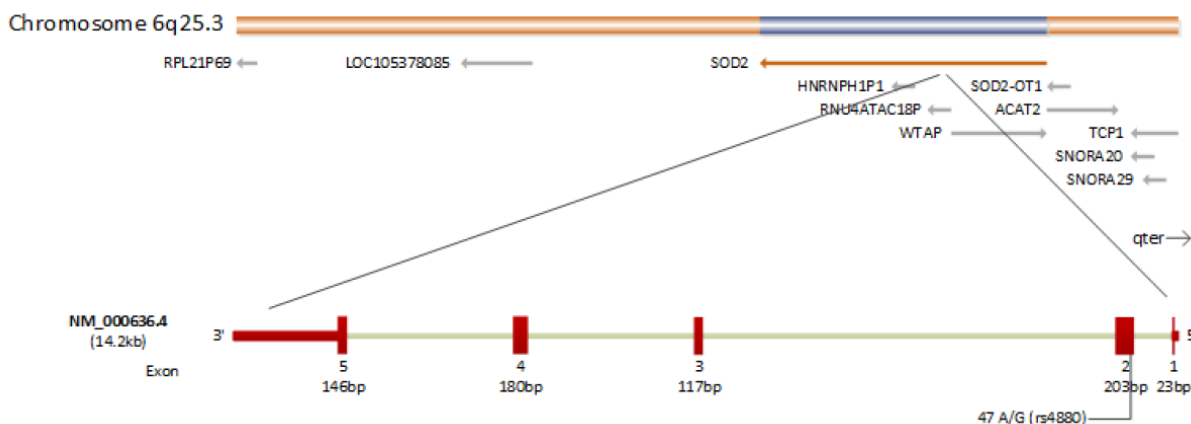
U slučaju gena za *GSTP1*, opisano je više polimorfizama, među kojima su najčešći rs1695 i rs1138272 [145], dok haplotip *GSTPIABCD* predstavlja kombinaciju ova dva SNPa (Slika 15). Polimorfizam rs1695 dovodi do zamene adenina guaninom na mestu 313, tako da nakon translacije u aminokiselinski lanac dođe do zamene izoleucina valinom na mestu 105, što *GSTP1* čini potentnijim JNK1 inhibitorom, i time on ostvaruje jači anti-apoptotski efekat [146]. Sa druge strane, zbog SNP-a rs1138272 dolazi do promena u okviru šestog egzona (zamena citozina timinom na mestu 341), usled čega se alanin na poziciji 114 menja valinom u okviru aktivnog mesta enzima [147]. Ova modifikacija smanjuje supstratnu specifičnost za reakcije detoksikacije [148].



**Slika 15.** Gen za GSTP1. Preuzeto i prilagođeno od Coric V, 2017 [149].

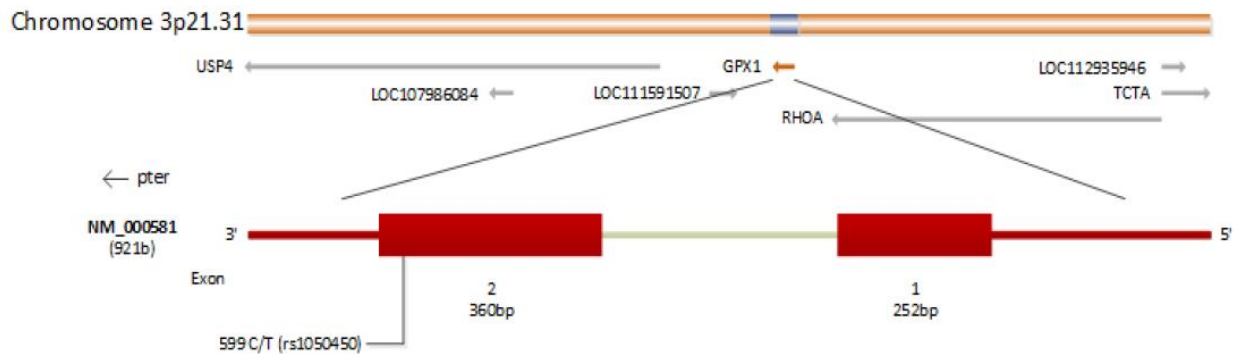
Haplotip *GSTPIABCD* predstavlja kombinaciju ova dva *GSTP1* SNPa [125]. Identifikovana su četiri haplotipa – prvi je takozvani „divlji“ *GSTP1A* koji podrazumeva *Ile105* i *Ala114*. Tri haplotipa su varijantna – *GSTP1B* (*Val105* i *Ala114*), *GSTP1C* (*Val105* uz *Val114*) i *GSTP1D* (*Ile105* uz *Val114*). Smatra se da kako je pozicija amino kiseline na 105 mestu blizu aktivnog centra enzima, ona značajno utiče na katalitičku aktivnost. Usled toga, pretpostavlja se da je *Val105* varijanta bolji katalizator za reakcije sa diol epoksidima i da ima širu specifičnost za supstrate od *Ile105* varijante [54]. Još uvek nije u potpunosti objašnjen efekat *Ala114Val* supstitucije, ali moguće je da pojačava efekat *Ile105Val* zamene [54].

Najviše proučavan polimorfizam gena za SOD2 je SNP rs4880. U okviru drugog egzona citozin na mestu 2734 menja se u timin, pa u konačnom proteinu na mestu 16 umesto alanina vezuje se valin (Slika 16) [150]. Kako u okviru unutrašnje mitohondrijalne membrane postoji transportni kanal koji sa smanjenom efikasnošću unosi *Val16* formu SOD2 u odnosu na *Ala16*, enzim ostaje spolja i postepeno ga razgrađuju proteazomi, zbog čega je antioksidantna aktivnost ove dismutaze unutar mitohondrija značajno smanjena [150].



**Slika 16.** Prikaz gena za SOD2. Preuzeto od Jerotić Đ. i sar, 2021 [144].

Na kraju, polimorfizam gena za GPX1 koji je predmet brojnih istraživanja, jeste rs1050450 (Slika 17). Zbog zamene prolina leucinom na mestu 200 (usled nukleotidne promene citozina timinom) menja se konformacije enzima [151]. Prolin koji ulazi u sastav referentne forme enzima nema slobodne nesupstituisane amino grupe vezane za  $\alpha$ -ugljenikov atom i omogućava formiranje jedinstvenog zavoja unutar sekundarne strukture peptida [151]. Gubitak navedene specifične konformacije menja aktivnost GPX1.



**Slika 17.** Prikaz gena za GPX1. Preuzeto od *Jerotić Đ. i sar, 2021 [144]*.

Do sada je pokazano da karcinom bubrežnog parenhima predstavlja maligno oboljenje zasnovano na složenim metaboličkim promenama koje ovaj tumor čine velikim izazovom za ispitivanje i za lečenje. Kao jedan od najagresivnijih tipova, svetloćelijski KBP zaslužuje posebnu pažnju. S obzirom na čitavu mrežu genetičkih i epigenetičkih faktora, kao i poseban uticaj faktora spoljašnje sredine, razumevanje ove bolesti iziskuje stalne napore da se svaki aspekt njegovog nastanka, razvoja i progresije prouči i istraži. Enzimi uključeni u održavanje redoks homeostaze u patogenezi predstavljaju aktere koji na posredni i neposredni način doprinose kancerogenezi i metastaziranju. Usled toga, prepoznavanje osoba koje su posebno podložne i u većem riziku za razvoj sKBP, u budućnosti može pomoći sprovođenju još efikasnijeg skrining programa, razvoju strategija za praćenje ovih pacijenata i odabiru najpogodnije terapije.



## 2. CILJEVI

Ciljevi istraživanja bili su:

- ispitati da li postoji uticaj genskih polimorfizama *Nrf2* (rs6721961), *SOD2* (rs4880), *GPXI* (rs1050450) kao i *GSTP1* (rs1695, rs1138272) na rizik za nastanak svetloćelijskog KBP;
- ispitati da li ispitivani genotipovi utiču na fenotipske karakteristike tumora;
- ispitati da li postoji udruženi efekat ispitivanih genotipova i poznatih faktora rizika KBP (pušenje, hipertenzija, gojaznost);
- ispitati da li genski polimorfizmi *Nrf2* (rs6721961), *SOD2* (rs4880), *GPXI* (rs1050450) kao i *GSTP1* (rs1695, rs1138272) imaju prognostički značaj kod bolesnika sa svetloćelijskim KBP.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Dizajn studije

Studija slučajeva i kontrola.

#### 3.2. Studijska populacija

U studiju slučajeva i kontrola uključeno je 223 pacijenta sa patohistološki potvrđenom dijagnozom svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, koji su lečeni na Klinici za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u periodu od 2011. do 2014. godine, a čiji su uzorci krvi deo biobanke formirane na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a u saradnji sa Klinikom za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Među pacijentima bilo je 73 pripadnice ženskog i 147 pripadnika muškog pola, prosečne starosti  $58,95 \pm 11,65$  godina.

Kriterijumi za uključivanje u studiju bili su:

1. potvrđen malignitet bubrega radiološkim metodama (ultrazvučno, kompjuterizovanom tomografijom, magentnom rezonancijom),
2. patohistološki potvrđena dijagnoza svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima u skladu sa klasifikacijom tumora Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2016. godine kao i određivanje gradusa i stadijuma tumora,
3. izvršena parcijalna ili totalna nefrektomija,
4. pacijenti starosne dobi  $\geq 18$  godina,
5. informisana saglasnost pacijenta da budu uključeni u studiju.

Ukoliko su pacijenti imali ranije dijagnostikovano maligno oboljenje drugog organa, bili su isključeni iz studije.

Kontrolna grupa sastojala se od 336 ispitanika uparenih prema polu i godinama (138 pripadnica ženskog pola, 198 pripadnika muškog pola, starosti  $60,44 \pm 10,84$  godina) koji su tokom istog perioda lečeni na Klinici za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije i nisu imali dijagnozu malignog oboljenja. Svim pripadnicima kontrolne grupe isključeno je postojanje malignog oboljenja, svi pripadnici bili su starosne dobi  $\geq 18$  godina, svi su dali svoj informisani pristanak da učestvuju u studiji. Ukoliko su ispitanici imali ranije dijagnostikovano maligno oboljenje, isključeni su iz studije.

#### 3.3. Analiza epidemioloških faktora rizika

Kako bi bili prikupljeni i analizirani demografski podaci o pacijentima i pripadnicima kontrolne grupe, kao i podaci o prepoznatim faktorima rizika za nastanak sKBP, korišćen je strukturisani epidemiološki upitnik sastavljen na Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Đukic i sar, 2013). U odnosu na gojaznost kao faktor rizika, pacijenti su razvrstani u grupu pacijenata čiji je indeks telesne težine (ITT) bio manji od  $25 \text{ kg/m}^2$  i na grupu ispitanika čiji je ITT bio jednak ili veći od  $25 \text{ kg/m}^2$ . Kada je u pitanju pušački status ispitanika, osobe koje su pušile tokom perioda u trajanju od najmanje 60 dana bilo kada pre otpočinjanja studije označene su kao pušači. Za dobijanje podataka od paklu cigareta po godini,

ispitivani su o broju cigareta koje su tokom dana konzumirali u navedenom periodu pušenja, a broj pakla cigareta po godini dobijen je prema formuli – broj cigareta konzumiran tokom dana ÷ 20 × broj godina pušenja. Svi dobijeni podaci odnosili su se na period pre postavljanja dijagnoze sKBP za sve pripadnike grupe pacijenata i za odgovarajući vremenski period za pripadnike kontrolne grupe.

### 3.4. Pravni i etički preduslovi

Studija je izvedena u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 2013. godine). Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta (broj odluke 1322/III-14, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu). Sve osobe čiji je biološki materijal korišćen u studiji, kao i lični podaci, potpisale su pristanak za učešće u studiji i obaveštene su o ciljevima i očekivanim ishodima studije.

### 3.5. Materijal

#### 3.5.1. Uzorci krvi i plazme

Od svih ispitanika venepunkcijom su uzeti uzorci pune krvi (3 ml) sa etilen-diamin-tetra-sirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom, na Klinici za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, potom transportovani na Institut za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Za izolaciju DNK korišćeno je 400 µl krvi, dok je ostatak korišćen za separaciju plazme centrifugiranjem na 3600 rpm/4°C tokom 10 minuta. Dodavano je 10 µl butil-hidroksi-toluena (10 mmol/l) po 1 ml plazme kako bi se sprečila auto-oksidacija uzorka. Uzorci krvi sa EDTA skladišteni su na -20 °C, a uzorci plazme na -80 °C na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

#### 3.5.1. Uzorci tkiva

Uzorci tumorskog i netumorskog tkiva (n = 20) dobijeni su prilikom hirurške parcijalne ili potpune nefrektomije pacijenata na Klinici za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Na osnovu tumorskog tkiva patohistološki je potvrđeno da je u pitanju svetloćelijski karcinom bubrežnog parenhima, određen je gradus nukleusa, stepen vaskularne invazije, nekroze tumor i invazije sabirnog sistema i perirealnog tkiva. Uzorci su skladišteni u *RNA later RNA Stabilization* reagensu (*Qiagen, Chatsworth, California, USA*) na -20 °C na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### 3.6. Metode

#### 3.6.1. Izolacija DNK

Izolacija DNK ispitanika vršena je iz 200 µl uzorka periferne krvi i iz 25 mg netumorskog tkiva bubrega. Korišćen je *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Chatsworth C.A, USA)* u skladu sa protokolom proizvođača. Procedura pročišćavanja DNK prema *QIAamp* protokolu sastojala se iz pet koraka prilikom kojih su korišćene spin kolone. Verovatnoća da dođe do unakrsne kontaminacije između uzoraka bila je mala. U okviru prvog koraka, za lizu uzorka krvi i

stabilizaciju DNK korišćena je smeša deterdžentskih pufera i enzima Proteinaza K (600 mAU/ml, 40 mAU/mg proteina). Tokom izolacije DNK iz netumorskog tkiva, prvi korak nije zahtevao mehaničku homogenizaciju, već je enzimski liziran tkivni uzorak tokom prolongirane inkubacije sa Protinazom K (1-3 časa). Drugi korak sastojao se u apsorpciji DNK na silika membranu (*QIAamp silica membrane*) prilikom kratkotrajnog cetrifugiranja. Optimalno vezivanje DNK za membrane omogućeno je odgovarajućim uslovima u kojima se vrši liza puferima. Naredna dva koraka podrazumevala su ispiranje puferima AW1 i AW2 proizvođača, kako bi se otklonile sve rezidualne čestice koje bi potencijalno mogle onemogućiti ili oslabiti genotipizaciju. Puferi su nanošeni, a potom uzorci centrifugirani tako da je DNK prethodno vezana za silika membranu ostajala vezana, a rezidualne čestice su bile ispirane. Konačno, prečišćena DNK vezana za membrane odvojena je od iste u koncentrovanoj formi unutar AE pufera proizvođača. Tako izolovana DNK bez proteina, nukleaza ili bilo kojih drugih potencijalnih inhibitornih rezidua, skladištena je na -20 °C. Koncentracija DNK i čistoća uzoraka određivani su spektrofotometrijski na 230, 260, 280 i 320 nm pomoću GeneQuant pro (*Biochrom, Cambridge, England*).

### 3.6.2. Genotipizacija

Svi ispitivani polimorfizmi predstavljaju razliku u pojedinačnim nukleotidima i genotipizacija pet ispitivanih polimorfizama vršena je kroz reakciju lančanog umnožavanja (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (Tabela 6). U slučaju Nrf2 polimorfizma rađena je PCR sa dva para konfrontirajućih prajmera, a ostala četiri polimorfizma određena su kvantitativnom PCR.

**Tabela 6.** Ispitivani polimorfizmi, pozicija i nastala supstitucija nukleotida kao rezultat polimorfizma i posledična supstitucija amino-kiselina u polipeptidnom lancu

Gen	Polimorfizam	Supstitucija nukleotida	Supstitucija amino-kiselina
<i>Nrf2</i>	rs6721961	-617 C>A	
<i>GSTP1</i>	rs1695	313 A>G	Ile105Val
<i>GSTP1</i>	rs1138272	341 C>T	Ala114Val
<i>SOD2</i>	rs4880	2734 C>T	Ala16Val
<i>GPX1</i>	rs1050450	599 C>T	Pro200Leu

### 3.6.2.1. Ispitivanje *Nrf2* polimorfizma rs6721961

Za ispitivanje *Nrf2* rs6721961 polimorfizma vršena je PCR-CTTP (engl. *polymerase chain reaction with confronting two-pair primers*) prema protokolu koji su koristili Shimoyama i saradnici [152].

Korišćena su dva para prajmera sledećih sekvenci nukleotida:

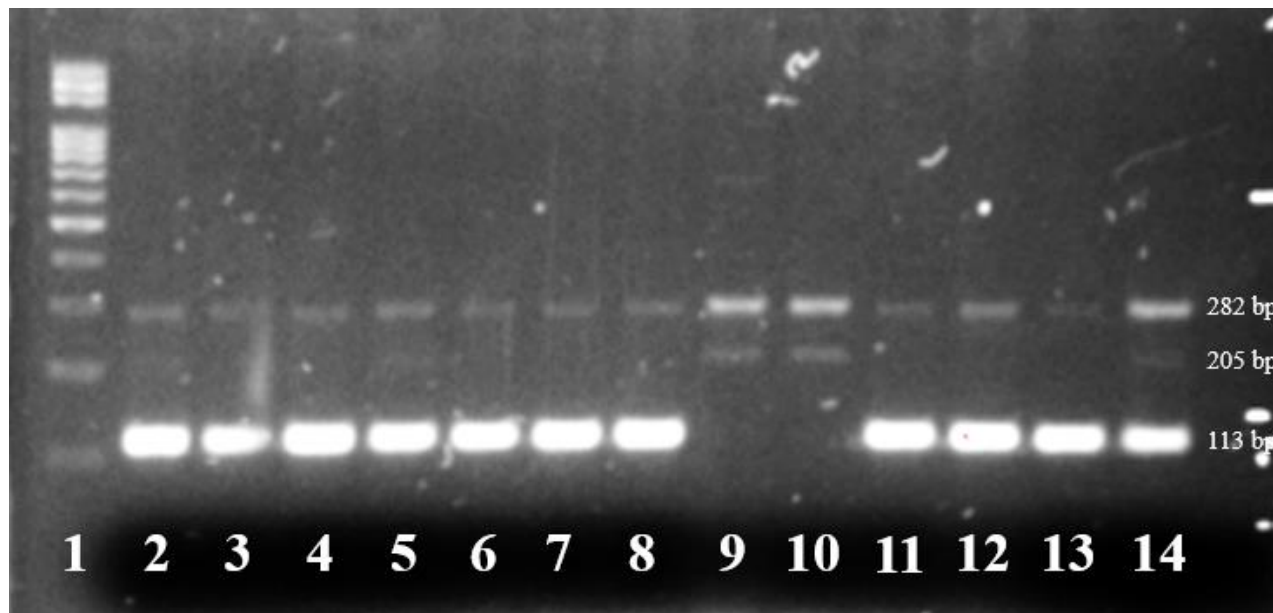
F1 5'-CCCTGATTTGGAGGTGCAGAACC-3'

R1 5'-GCGAACACGAGCTGCCGGA-3'

F2 5'-GGGGAGATGTGGACAGCG-3'

R2 5'-CTCCGTTTGCCTTTGACGAC-3'

Nakon što je formirana smeša prajmera i katalizatora njihovog vezivanja za odgovarajuće regione DNK, potom dodata DNK ispitanika, pomoću *Mastercycler gradient thermal cycler* (Eppendorf, Hamburg, Germany) kontrolisane su faze PCR. Prvo je učinjena denaturacija na 95 °C u trajanju od 10 minuta. Zatim je nastavljeno 30 ciklusa reakcije, i to po 1 minut na 95 °C, 58 °C, i 72 °C i dodatnih 5 minuta na 72 °C. Umnoženi PCR proizvodi odvojeni su i vizualizovani na 2% agaroznom gelu. Vizualizacija je omogućena dodavanjem *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) prilikom pravljenja gela, a potom su na gelu razdvojeni proizvodi vizualizovani pomoću *UV ChemiDoc* kamere (BioRad, Hercules, California, USA). Produkti odvojeni na visini od 282 i 113 baznih parova predstavljali su C/C genotip, na visini od 282, 205 i 113 baznih parova heterozigotni C/A genotip, a na visini od 282 i 205 baznih parova homozigotni A/A genotip. Prilikom svake genotipizacije, korišćene su poznate pozitivne i negativne kontrole.



**Slika 18.** Prikaz vizualizacije gela po odvajanju umnoženih PCR proizvoda tokom elektroforeze. U kolonama 2-8 i 11-13 uzorci su C/C genotipa, u kolonama 9 i 10 su A/A homozigotni nosioci, a u koloni 14 su heterozigoti C/A genotipa

### 3.6.2.2. Ispitivanje *GSTP1* polimorfizama rs1695 i rs1138272

Oba ispitivana *GSTP1* polimorfizma određena su kroz kvantitativnu PCR (qPCR) korišćenjem odgovarajućih proba a pomoću uređaja *Mastercycler ep realplex* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*). Reakcija se zasniva na principu da probe koje se vezuju za komplementarne sekvence unutar ispitivane DNK imaju za sebe vezane fluorescentne boje. Ako komplementarna sekvenca nukleotida postoji i probe se za nju vežu, nastavlja se dalja polimerizacija započete sekvence. Boja koja je vezana za tu probu, udaljava se od regiona koji je suprimira i počinje da fluorescira. Uređaj očitava pojavljivanje te boje (homozigoti za alel koji je obeležen datom bojom). Boja koja ostane vezana za svoj niz nukleotida, ostaje suprimirana i ne oslikava se. Ukoliko se obe probe vežu za komplementarnu sekvencu i nastavi njihova prolongacija, a posledično i odvajanje boja, u tom slučaju se registruju obe boje (heterozigotni nosioci).

Za oba polimorfizma korišćene su probe proizvođača *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) koje za sebe imaju vezane VIC i FAM boje. Za rs1695 broj proizvođačevog seta bio je C\_3237198\_20 u unutar njega date su VIC/FAM sekvence nukleotida:

CGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC[A/G]TCTCCCTCATCTACACCAACTATGT

Za polimorfizam rs1138272 korišćen je set broj C\_1049615\_20, a date su bojom obeležene sekvence:

ATACATGGTGGTGTCTGGCAGGAGG[C/T]GGGCAAGGATGACTATGTGAAGGCA

Protokol za qPCR sastojao se od inicijalne aktivacije enzima koja se odvijala na 95 °C tokom 10 minuta, nakon čega je nastavljano 40 ponavljanih ciklusa – denaturacija tokom 15 sekundi na 95 °C i ekstenzija u trajanju od 1 minuta na 60 °C.

Prilikom tumačenja dobijenih rezultata za rs1695, ukoliko je očitana samo VIC boja, ispitivani uzorak je obeležen kao homozigotni nosilac A/A alela koji u sintetisanom enzimu imaju izoleucin na mestu 105, a ako su registrovane obe boje, u pitanju su bili heterozigotni nosioci A/G koji su imali enzime sa izoleucinom i sa valinom. Za rs 1138272, samo pojavljivanje VIC boje predstavljalo je homozigotne nosioce C/C unutar čijeg enzima je na mestu 114 alanin, a očitavanje i VIC i FAM boje, heterozigotne nosioce C/A koji su imali enzime i sa alaninom i sa valinom.

### 3.6.2.3. Ispitivanje *SOD2* polimorfizama rs4880

Kao i u slučaju *GSTP1* polimorfizama, za tačno određivanje alela učinjena je kvantitativna PCR u skladu sa uputstvima proizvođača. Proba broj C\_8709053\_10 *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) obeležena je VIC i FAM bojama. Korišćene su sekvence nukleotida:

CTGCCTGGAGCCCAGATACCCCAA[A/G]CCGGAGCCAGCTGCCTGCTGGTGCT

Ciklusi su jednako kontrolisani kao u slučaju *GSTP1* polimorfizama. Očitavanje samo FAM boje značilo je da su u pitanju homozigotni nosioci G/G genotipa, što je značilo da se na

mestu 16 unutar enzima nalazi alanin, a očitavanje i VIC i FAM boje da su u pitanju heterozigoti G/A genotipa.

#### 3.6.2.4. Ispitivanje *GPX1* polimorfizama rs1050450

Jednakim protokolom kao za *GSTP1* i *SOD2* genotipiziran je i rs1050450 polimorfizam. Bojama obeležene probe su sintetisane po porudžbini i nosile su sekvence:

5' VIC-ACAGCTGGGCCCCTT-MGB 3'  
5' FAM-ACAGCTGAGCCCCTT-MGB 3'

Homozigotni nosioci C/C genotipa za sintezu enzima sa prolinom na poziciji 200 imali su očitano samo VIC boju, a heterozigotni nosioci C/T genotipa i VIC i FAM boju.

#### 3.7. Statistička obrada podataka

Za potrebe ovog ispitavanja korišćen je SPSS statistički softver u verziji 17.0 (*Chicago, IL, USA*). Kontinuirane varijable prikazane su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD) ili kao medijana sa opsegom od minimalnih do maksimalnih vrednosti. Frekvencija određenih varijabli korišćena je za prikaz kategorijalnih varijabli. Za ispitivanje razlike učestalosti kategorijalnih varijabli korišćen je  $\chi^2$  test. Normalnost raspodele ispitana je koristeći Kolmogorov-Smirnov test. Za svaki ispitivani polimorfizam ispitana je *Hardy-Weinberg* ekvilibrijum.

Rizik za nastanak svetloćelijskog carcinoma bubrežnog parenhima za svaku od ispitivanih genetičkih varijanti prikazan je izračunavanjem odnosa šansi (engl. *odds ratio*, OR) u okviru intervala poverenja od 95 % (IP) putem logističke regresione analize. Odnos šansi prilagođen je u odnosu na starosnu dob, pol, i varijable koje su prepoznati faktori rizika za nastanak sKBP jer one mogu biti potencijalni interferirajući faktori (gojaznost, povišen arterijski pritisak, pušačke navike). Analiza preživljavanja izvršena je pomoću *Kaplan-Meier* testa kako bi se dobila verovatnoća kumulativnog preživljavanja. Učinjen je *log-rank* test da bi se procenile razlike u preživljavanju u odnosu na različite varijable. Predikcija uticaja ispitivanih polimorfizama i varijantnih genotipova na mortalitet obolelih od sKBP proračunata je pomoću *Cox* proporcionalnih regresionih modela koji su prilagođeni prema kovarijablama. Korišćena su dva modela od kog je u prvom rizik prilagođen u odnosu na starosnu dob i pol pacijenata, a u drugom su kao kovarijable pored starosne dobi i pola korišćeni i faktori rizika za napredovanje KBP poput pušačkih navika (paklo cigareta konzumiranih po godini), indeksu telesne mase i postojanju povišenog arterijskog pritiska.

Za sve od navedenih statističkih analiza, statistički značajnom razlikom smatrana je p vrednost  $\leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike ispitanika i kontrolne grupe

Osnovne demografske karakteristike 223 obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima uključenih u istraživanje i 336 pripadnika kontrolne grupe nalaze se u Tabeli 4.1.

**Tabela 4.1.** Demografske karakteristike bolesnika sa sKBP i pripadnika kontrolne grupe

	<b>Bolesnici sa sKBP</b>	<b>Kontrolna grupa</b>	<b>OR<sup>a</sup> (95% IP<sup>b</sup>)</b>	<b>p</b>
<b>Starost</b> (godine) <sup>c</sup>	58,95 ± 11,65	60,44 ± 10,84	/	0,125
<b>Pol, n (%)</b>				
Ženski	73 (33)	138 (41)	1,00 <sup>d</sup>	
Muški	147 (67)	198 (59)	1,467 (0,756-2,847) <sup>e</sup>	0,258
<b>Gojaznost, n (%)<sup>f</sup></b>				
ITT (kg/m <sup>2</sup> )	26,61 ± 4,43	26,78 ± 4,08	/	0,677
ITT < 25	65 (36)	110 (35)	1,00 <sup>d</sup>	
ITT ≥ 25	115 (64)	204 (65)	0,866 (0,494-1,518) <sup>g</sup>	0,616
<b>Pušačke navike, n (%)<sup>f</sup></b>				
Bez	82 (44)	164 (49)	1,00 <sup>d</sup>	
Sa <sup>h</sup>	106 (56)	171 (51)	1,289 (0,863-1,925) <sup>i</sup>	0,215
<b>Paklo cigareta po godini<sup>j</sup></b>	31 (0,30-96,00)	30,00 (0,20-88,00)	/	0,131
<b>Hipertenzija, n (%)<sup>f</sup></b>				
Ne	83 (45)	211 (65)	1,00 <sup>d</sup>	
Da	102 (55)	116 (35)	2,450 (1,375-4,435) <sup>k</sup>	0,002

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*), odnos šansi; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> podaci prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija; <sup>d</sup> referentna grupa; <sup>e</sup> OR prilagođen prema varijablama starosti, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>f</sup> varijabla zasnovana na dostupnim podacima; <sup>g</sup> OR prilagođen prema varijablama starosti, polu, konzumiranom paklu cigareta po godini i hipertenziji; <sup>h</sup> minimalni period od 60 dana bilo kada pre otpočinjanja studije; <sup>i</sup> OR prilagođen prema varijabli starosti, pola, indeksa telesne težine i hipertenzije; <sup>j</sup> podaci prikazani kao medijana sa opsegom (minimum-maksimum); <sup>k</sup> OR prilagođen prema varijablama starosti, pola, indeksa telesne težine i konzumiranom paklu cigareta po godini



Ispitanici su upareni prema polu i starosnoj dobi te nema statistički značajne razlike u navedenim kategorijama. Među ispitanicima analizirano je prisustvo prepoznatih faktora rizika za nastanak sKBP kao što su gojaznost, sklonost pušačkim navikama i povišen arterijski pritisak. Nije uočena značajna razlika u pogledu gojaznosti i pušačkih navika ( $p > 0,05$ ) iako su ovo prihvaćeni faktori koji doprinose nastanku sKBP. Sa druge strane, ispitanici koji su imali povišen arterijski pritisak imali su 2,45 puta veći rizik za nastanak sKBP u poređenju sa ispitanicima sa normalnim vrednostima pritiska (95% IP = 1,375-4,435,  $p < 0,05$ ). Zabeleženo je da je preko 50% pacijenata sa sKBP imalo hipertenziju u poređenju sa 35% pripadnika kontrolne grupe.

Pacijenti oboleli od svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, u najvećem broju imali su karcinom drugog gradusa (106 pacijenata, 55%) a skoro isti broj pacijenata imao je pT1 (93 pacijenta, 45%) i pT3 (87 pacijenata, 42%) stadijum tumora (Tabela 4.2.).

**Tabela 4.2.** Kliničke karakteristike tumora bolesnika sa sKBP

<i>Stepen diferentovanosti, n (%)<sup>a</sup></i>	
Gradus 1	28 (15)
Gradus 2	106 (55)
Gradus 3	49 (26)
Gradus 4	8 (4)
<i>Stadijum tumora, n (%)<sup>a</sup></i>	
pT1	93 (45)
pT2	23 (11)
pT3	87 (42)
pT4	5 (2)

<sup>a</sup> naspram dostupnih podataka za stepen diferentovanosti i stadijum tumora prema TNM klasifikaciji u zavisnosti od patohistološke dijagnostike i stepena proširenosti tumora

#### 4.2. Povezanost ispitivanih genotipova rizika za nastanak sKBP

U okviru Tabele 4.3. prikazana je distribucija ispitivanih genotipova *Nrf2*, *SOD2*, *GPXI* i *GSTPI* među pacijentima i kontrolama. Nije pronađena statistički značajna razlika u riziku za nastanak sKBP među homozigotima za *C/C* genotip *Nrf2* polimorfizma, i ispitanicima koji su nosioci bilo *C/A* bilo *A/A* genotipa ( $p > 0,05$ ). Međutim, značajna razlika uočava se prilikom analiziranja *SOD2* rs4880 polimorfizma. Nosioci varijantnog genotipa sa barem jednim Val alelom (nosioci *Ala/Val* ili *Val/Val*) imali su 4,5 puta veći rizik za nastanak sKBP u odnosu na nosioce referentnog *Ala/Ala* genotipa (95% IP = 2,167-9,432,  $p < 0,001$ ). Takođe, osobe sa *Pro/Leu* ili *Leu/Leu* genotipom za *GPXI* bili su u manjem riziku za nastanak ovog karcinoma u odnosu na *Pro/Pro* nosioce (OR = 0,567, 95% IP 0,323-0,994,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.3.** Distribucija ispitivanih genotipova među bolesnicima s sKBP i među pripadnicima kontrolne grupe

Genotipovi	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> (rs6721961)</b>				
<i>C/C</i>	166 (77)	241 (72)	1,00 <sup>c</sup>	
<i>C/A + A/A</i>	50 (23)	95 (28)	0,692 (0,370-1,295) <sup>d</sup>	0,250
<b><i>SOD2</i> (rs4880)</b>				
<i>Ala/Ala</i>	45 (30)	111 (21)	1,00 <sup>c</sup>	
<i>Ala/Val + Val/Val</i>	175 (70)	225 (79)	4,521 (2,167-9,432) <sup>d</sup>	<0,001
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>				
<i>Pro/Pro</i>	109 (49)	142 (42)	1,00 <sup>c</sup>	
<i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	113 (51)	194 (58)	0,567 (0,323-0,994) <sup>d</sup>	0,048
<b><i>GSTPI</i> (rs1695 i rs1138272)</b>				
<i>(Ile/Ile) (Ala/Ala)</i>	54 (24)	144 (43)	1,00 <sup>c</sup>	
<i>(Ile/Ile) (Ala/Val + Val/Val)</i>	1 (1)	15 (4)	0,000 (NA) <sup>e</sup>	0,999
<i>(Ile/Val + Val/Val) (Ala/Ala)</i>	143 (64)	153 (46)	3,250 (1,668 – 6,331) <sup>d</sup>	0,001
<i>(Ile/Val + Val/Val) (Ala/Val + Val/Val)</i>	24 (11)	24 (7)	2,719 (0,970 – 7,624) <sup>d</sup>	0,057

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*), odnos šansi; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa; <sup>d</sup> OR prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>e</sup> NA (engl. *not applicable*), nije primenljivo

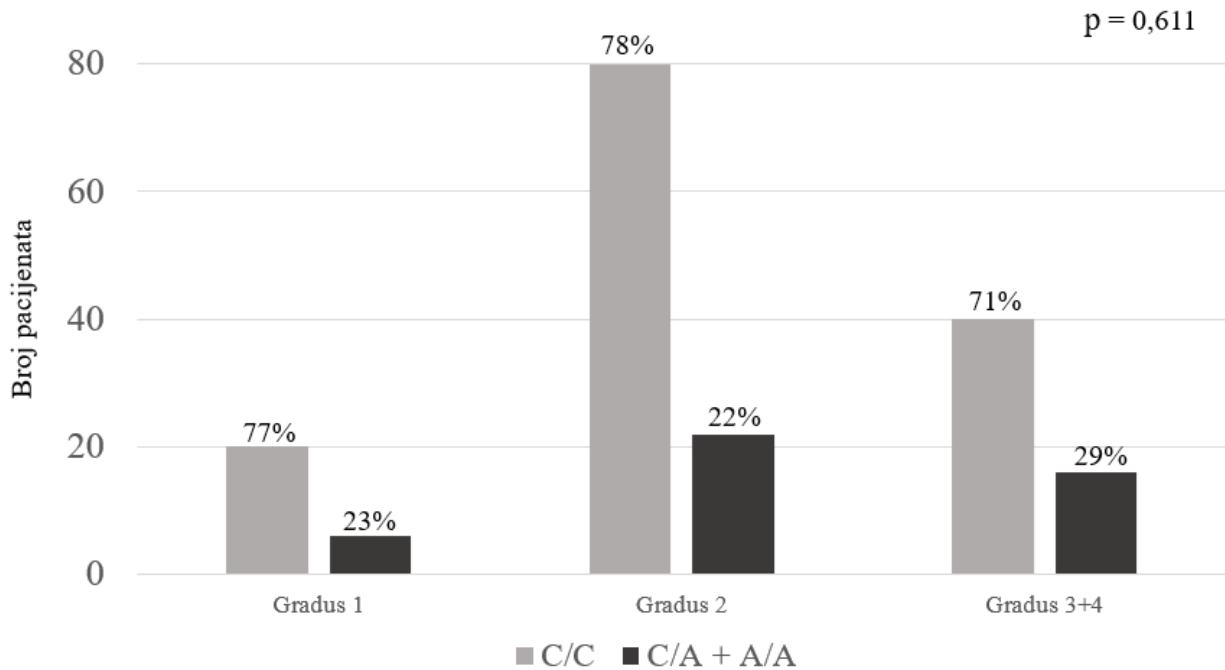
Kao dva najčešće ispitivana polimorfizma *GSTP1*, polimorfizmi rs1695 i rs1138272 posmatrani su u kombinaciji jedan sa drugim. Za kontrolnu grupu uzeti su nosioci referentnih genotipova oba polimorfizma (*Ile/Ile* za rs1695 i *Ala/Ala* za rs1138272). Kao što je prikazano u Tabeli 4.3, najvećem riziku za nastanak sKBP bile su osobe nosioci kombinacije referentnog genotipa rs1138272 i varijantnih genotipova za rs1695 (OR = 3,25, 95% IP = 1,668-6,331,  $p < 0,05$ ).

#### 4.3. Povezanost ispitivanih genotipova i fenotipskih karakteristika sKBP među obolelima

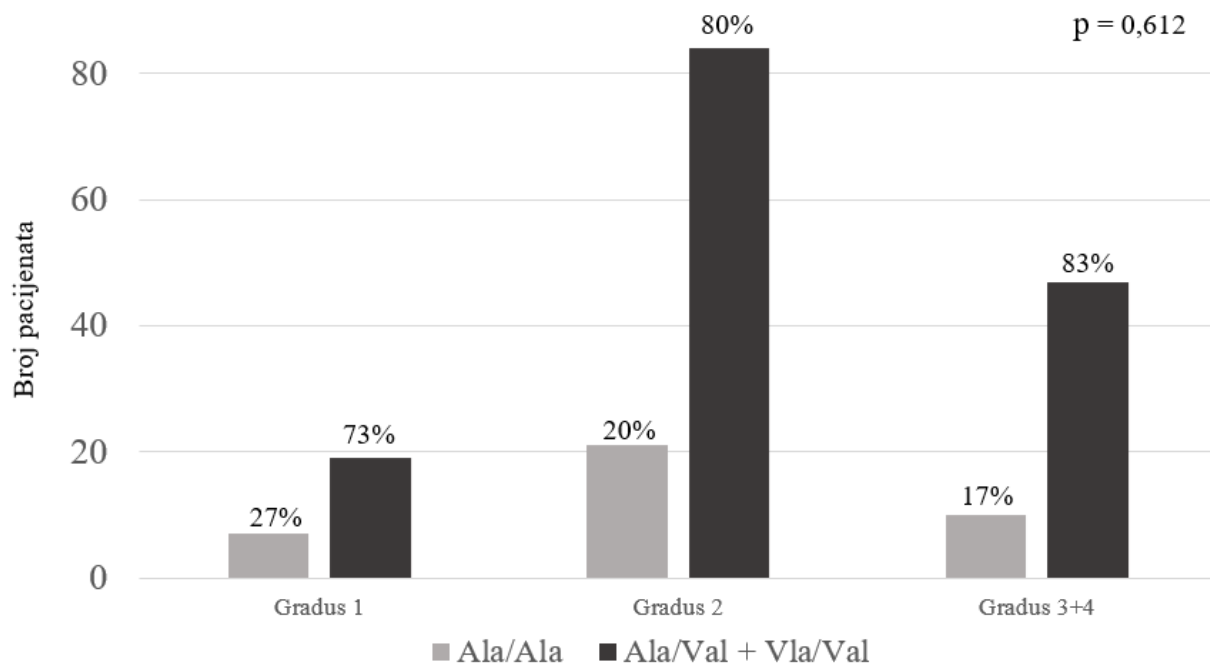
Osim ispitivanja povezanosti ispitivanih genotipova i rizika za inicijalni nastanak svetloćelijskog karcinoma, analizirano je takođe da li postoji povezanost sa fenotipskim karakteristikama i progresijom ovog tumora kod obolelih osoba. Ispitivano je da li prisustvo određenih genotipova ima povezanost sa određenim stepenom diferentovanosti tumorskog tkiva (grafik 4.1-4.4) a potom i sa određenim stadijumom dijagnostikovanog maligniteta (grafik 4.5-4.8).

Nije pronađena statistički značajna razlika u zastupljenosti varijantnih genotipova među različitim stepenima diferentovanosti tumorskog tkiva ni za jedan od ispitivanih genotipova (grafik 4.1-4.4). U slučaju polimorfizma *SOD2*, uočljivo je da više od 80% osoba sa tumorom trećeg i četvrtog gradusa jesu nosioci varijantnih *Ala/Val* i *Val/Val* genotipova, u odnosu na 73% slučajeva prvog stepena diferentovanosti, iako ova razlika nije od statističkog značaja (grafik 4.2).

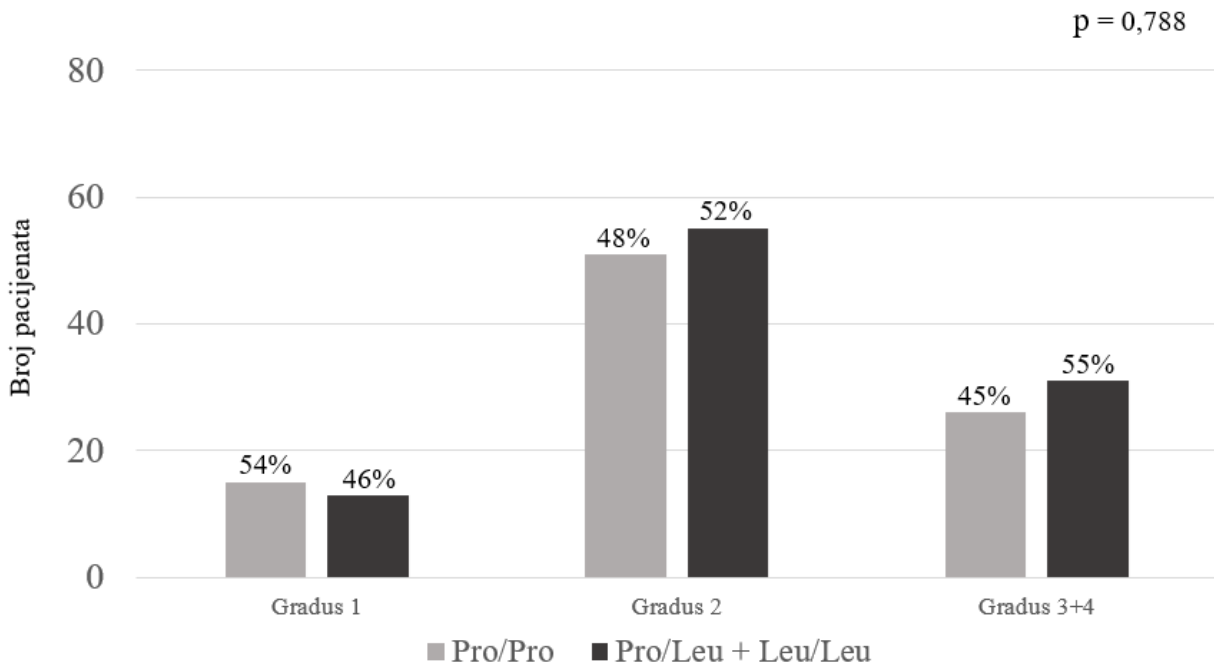
Kada je ispitivana povezanost polimorfizama i TNM stadijuma tumora, jednako kao i za stepen diferentovanosti, rezlike nisu dostigle statističku značajnost (grafik 4.5-4.8). Za *Nrf2* polimorfizam odskače da 82% osoba sa pT1 stadijumom imaju referentni *C/C* genotip, za razliku od 65% osoba sa pT2 stadijumom i 74% ispitanika sa pT 3 ili 4 stadijumima posmatranim zajedno (grafik 4.5). Slično, čak 84% pacijenata sa pT3 ili pT4 stadijumom nosioci su varijantnih *Ala/Val* ili *Val/Val* genotipova za *SOD2* rs4880 polimorfizam (grafik 4.6). U slučaju *GPX1* polimorfizma, raspodela zastupljenosti genotipova vrlo je ujednačena među grupama (grafik 4.7), dok je za ispitivane polimorfizme *GSTP1*, rs1695 i rs1138272, čak 87% pacijenata sa pT2 stadijumom tumora istovremeno imalo kombinaciju varijantnih genotipova (grafik 4.8)



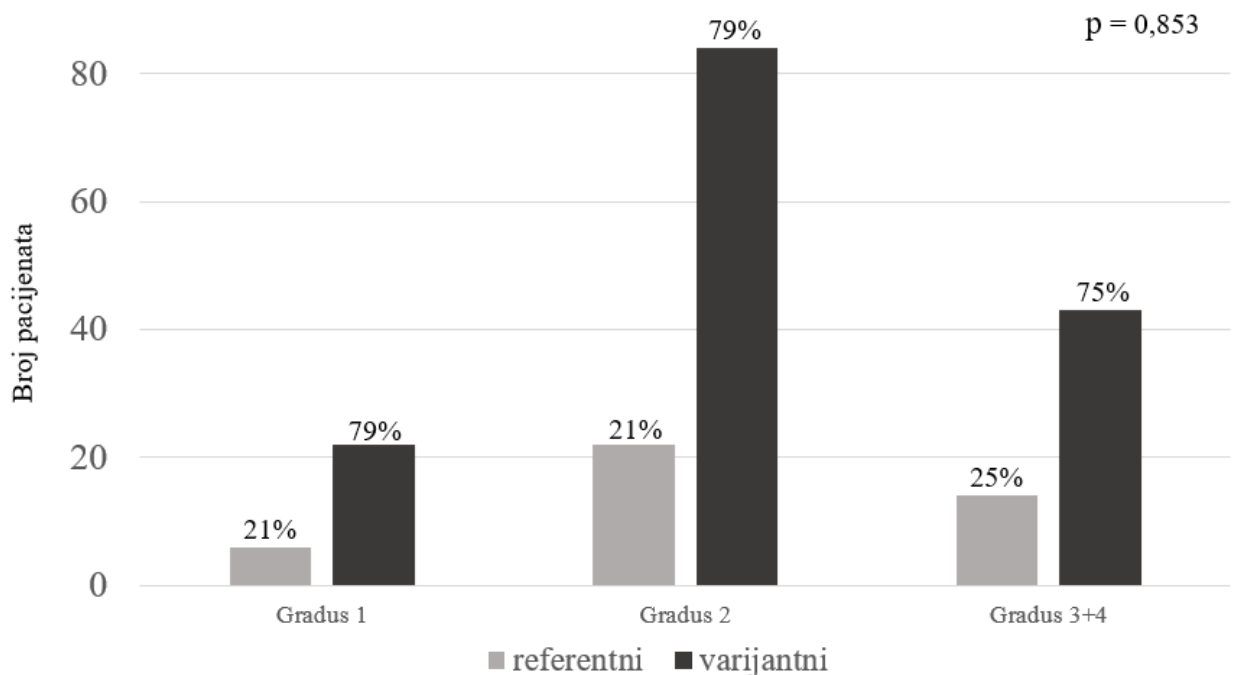
**Grafik 4.1.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *Nrf2* genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na stepen diferentovanosti tumora



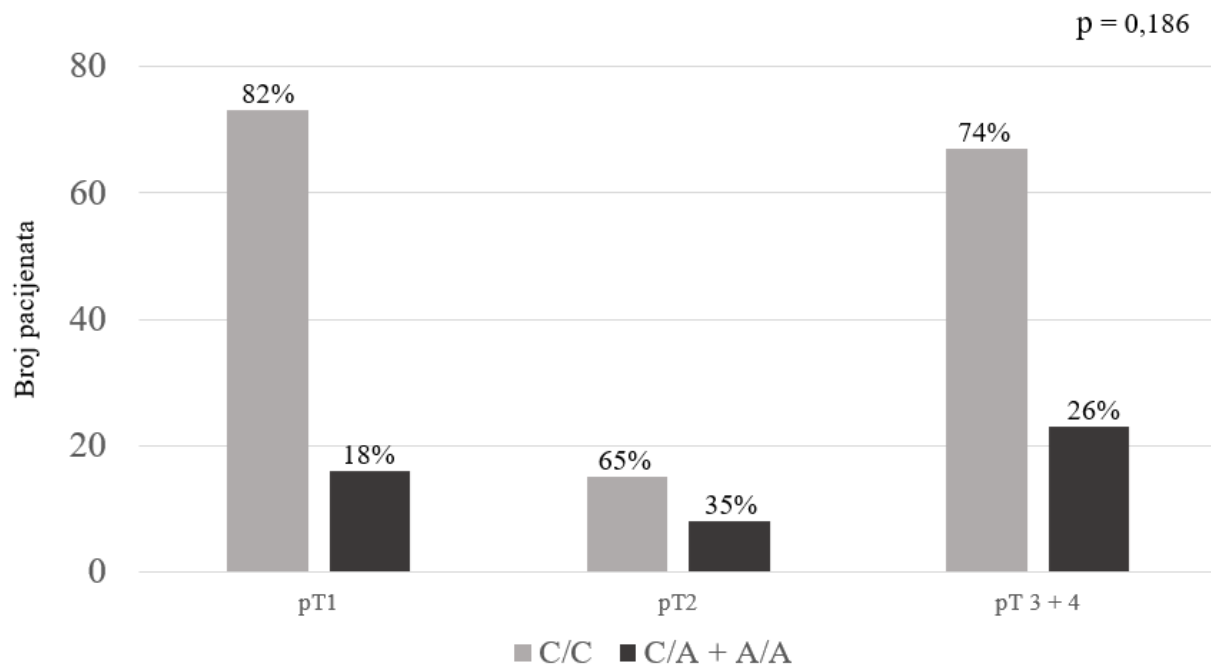
**Grafik 4.2.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *SOD2* genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na stepen diferentovanosti tumora



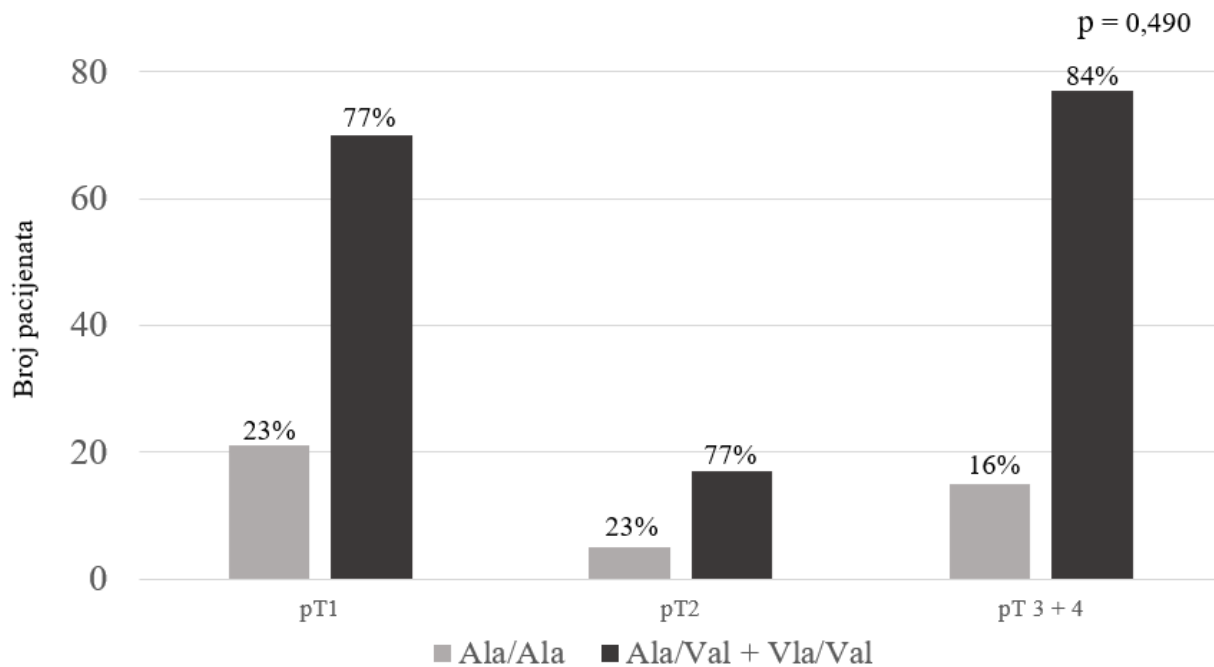
**Grafik 4.3.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *GPXI* genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na stepen diferentovanosti tumora



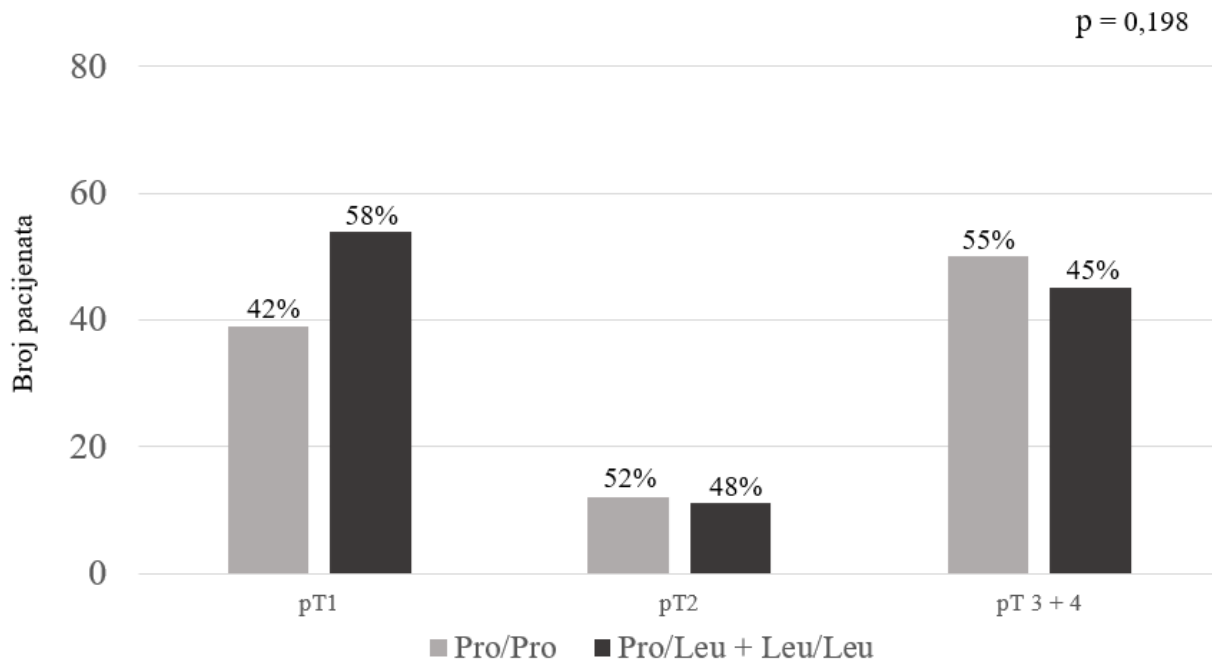
**Grafik 4.4.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *GSTP1* rs1695 i rs1138272 genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na stepen diferentovanosti tumora; *GSTP1*\*referentni genotip – (Ile/Ile) (Ala/Ala), *GSTP1*\*varijantni genotip – (Ile/Val + Val/Val)(Ala/Ala), (Ile/Ile)(Ala/Val + Val/Val), (Ile/Val + Val/Val)(Ala/Val + Val/Val)



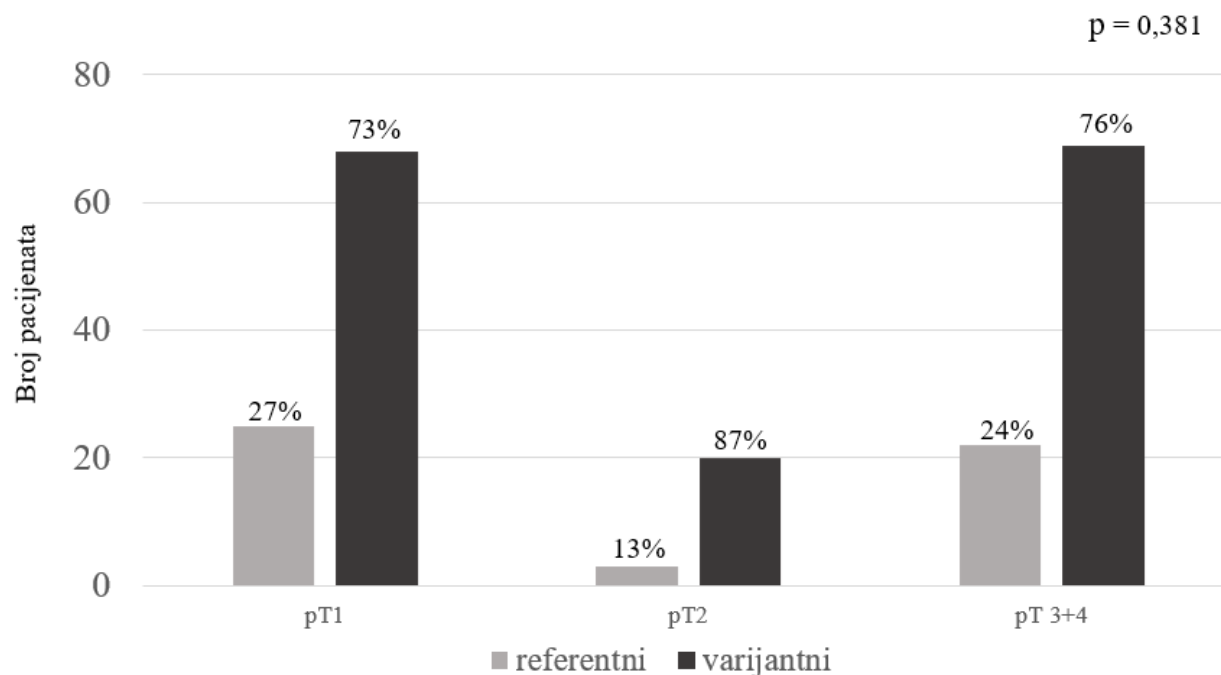
**Grafik 4.5.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *Nrf2* genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na TNM stadijum tumora



**Grafik 4.6.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *SOD2* genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na TNM stadijum tumora



**Grafik 4.7.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *GPXI* genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na TNM stadijum tumora



**Grafik 4.8.** Zastupljenost referentnog i varijantnih *GSTP1* rs1695 i rs1138272 genotipova među obolelima grupisanim u odnosu na TNM stadijum tumora; *GSTP1*\*referentni genotip – (Ile/Ile) (Ala/Ala), *GSTP1*\*varijantni genotip – (Ile/Val + Val/Val)(Ala/Ala), (Ile/Ile)(Ala/Val + Val/Val), (Ile/Val + Val/Val)(Ala/Val + Val/Val)

#### 4.4. Efekat kombinovanih genotipova na rizik za nastanak sKBP

##### 4.4.1. Uticaj kombinovanih genotipova na rizik za nastanak sKBP

Brojna istraživanja ukazuju na značaj proučavanja svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima kao jedne vrste metaboličkog oboljenja. Zbog toga se smatra da za inicijaciju nastanka tumora nije dovoljan samo jedan faktor rizika posmatran izolovano, već najpre više faktora u kombinaciji. Upravo zato učinjen je pregled uticaja kombinacija genotipova na rizik za nastanak sKBP.

**Tabela 4.4.** Efekat kombinacije *Nrf2* polimorfizma i rs1695 i rs1138272 *GSTP1* polimorfizama na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi	<i>Nrf2</i> (rs6721961)	
	<i>C/C</i>	<i>C/A + A/A</i>
<b><i>GSTP1</i> (rs1695)</b>		
<i>Ile/Ile</i>		
sKBP (%)	41 (19)	11 (5)
kontrole (%)	114 (34)	45 (13)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,385 (0,095-1,564)
<i>P</i>	-	0,182
<i>Ile/Val + Val/Val</i>		
sKBP (%)	125 (58)	39 (18)
kontrole (%)	127 (38)	50 (15)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	3,211 (1,513-6,814)	2,731 (1,107-6,739)
<i>p</i>	0,002	0,029
<b><i>GSTP1</i> (rs1138272)</b>		
<i>Ala/Ala</i>		
sKBP (%)	144 (67)	46 (21)
kontrole (%)	217 (65)	80 (24)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,835 (0,430-1,621)
<i>P</i>	-	0,594
<i>Ala/Val + Val/Val</i>		
sKBP (%)	21 (10)	4 (2)
kontrole (%)	24 (7)	15 (4)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,067 (0,41-2,779)	0,162 (0,019-1,408)
<i>p</i>	0,894	0,099

<sup>a</sup> *OR* (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> *IP*, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

Faktor 2 sličan nuklearnom eritroid-2 faktoru, *Nrf2*, kao transkripcioni faktor ima ulogu u integraciji signala nastalih po razvoju ćelijskog stresa. On utiče na transkripciju gena antioksidantnih enzima, između ostalih i na gene za glutation S-transferaze Pi klase. Kada je analiziran kombinovani uticaj genotipova *Nrf2* i *GSTP1* rs1695 što je prikazano u Tabeli 4.4, najveći rizik za nastanak sKBP imali su nosioci *C/C Nrf2* genotipa koji su istovremeno nosioci



*Ile/Val* ili *Val/Val* genotipa za rs1695 (OR = 3,211, 95% IP = 1,513-6,814,  $p < 0,05$ ). Najveći procenat obolelih od sKBP imao je kombinaciju *C/C* i *Ile/Val* ili *Val/Val* (125 pacijenata, 58%). Kombinovani uticaj *Nrf2* polimorfizma i *GSTP1* rs1138272 prikazan je u Tabeli 4.4. Iako bez statističke značajnosti, izgleda da su nosioci *C/A* ili *A/A* genotipova za *Nrf2* i varijantnih genotipova *Ala/Val* ili *Val/Val* za *GSTP1*, u manjem riziku za nastanak ovog karcinoma (OR = 0,162, 95% IP = 0,019-1,408,  $p > 0,05$ ).

S obzirom na značajnu ulogu superoksid dismutaze u uklanjanju superoksid anjona, *Nrf2* i *SOD2* zajednički utiču na redoks homeostazu u ćeliji. Interesantno je da kada su posmatrani njihovi polimorfizmi, što se vidi u Tabeli 4.5, ispitanici nosioci *C/C Nrf2* genotipa i varijantnih *SOD2* genotipova, bili su izloženi čak 3 puta većem riziku za nastanak sKBP (OR = 3,234, 95% IP = 1,436-7,280,  $p < 0,05$ ), a nosioci *C/A* i *A/A Nrf2* genotipa u kombinaciji sa varijantnim *Ala/Val* ili *Val/Val SOD2* genotipovima, u 2,9 puta većem riziku (OR = 2,918, 95% IP = 1,131-7,532,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.5.** Efekat kombinacije *Nrf2* polimorfizma i *SOD2* polimorfizma na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi	<i>Nrf2</i> (rs6721961)	
	<i>C/C</i>	<i>C/A + A/A</i>
<b><i>SOD2</i> (rs4880)</b>		
<i>Ala/Ala</i>		
sKBP (%)	38 (18)	6 (3)
kontrole (%)	76 (22)	36 (11)
OR <sup>a</sup> (95 % IP <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,308 (0,059-1,599)
<i>p</i>	-	0,161
<i>Ala/Val + Val/Val</i>		
sKBP (%)	126 (59)	44 (20)
kontrole (%)	165 (49)	59 (18)
OR <sup>a</sup> (95 % IP <sup>b</sup> )	3,234 (1,436-7,280)	2,918 (1,131-7,532)
<i>p</i>	0,005	0,027

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

Kako glutation peroksidaze sprečavaju nakupljanje vodonik peroksida i njegov štetni efekat, posmatran je mogući uticaj prisustva različitih kombinacija genotipova *Nrf2* i *GPX1* na rizik za nastanak sKBP (Tabela 4.6). Pokazano je da su smanjen rizik za nastanak ovog tumora

imali nosioci *C/C* genotipa za *Nrf2* koji su istovremeno nosioci *Pro/Leu* ili *Leu/Leu* genotipova za *GPXI* (OR = 0,440, 95% IP = 0,223-0,868,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.6.** Efekat kombinacije *Nrf2* polimorfizma i *GPXI* polimorfizma na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi	<i>Nrf2</i> (rs6721961)	
	<i>C/C</i>	<i>C/A + A/A</i>
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>		
<i>Pro/Pro</i>		
sKBP (%)	78 (36)	26 (12)
kontrole (%)	95 (28)	47 (14)
OR <sup>a</sup> (95 % IP <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,423 (0,158-1,133)
<i>p</i>	-	0,087
<i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>		
sKBP (%)	87 (41)	24 (11)
kontrole (%)	146 (44)	48 (14)
OR <sup>a</sup> (95 % IP <sup>b</sup> )	0,440 (0,223-0,868)	0,456 (0,188-1,057)
<i>p</i>	0,018	0,067

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

Najveći rizik za nastanak sKBP uočen je kada su posmatrani *SOD2* i *GSTP1* polimorfizmi u kombinaciji, kao što se može videti u Tabeli 4.7. Ispitanici nosioci varijantnog genotipa *SOD2*, bilo *Ala/Val* ili *Val/Val*, a istovremeno i varijantnog genotipa *GSTP1* rs1695 SNP, bili su u skoro 20 puta većem riziku nego nosioci kombinacije referentnih genotipova (OR = 19,724, 95% IP = 1,190-29,002,  $p < 0,05$ ). Posmatrano u kombinaciji *SOD2* i *GSTP1* rs1138272 polimorfizama, više od četiri puta veći rizik postoji u grupi nosilaca varijantnog genotipa za *SOD2* i referentnog genotipa *GSTP1* (OR = 4,374, 95% IP = 2,012-9,508,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.7.** Efekat kombinacije *SOD2* polimorfizma i rs1695 i rs1138272 *GSTP1* polimorfizama na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi	<i>SOD2</i> (rs4880)	
	<i>Ala/Ala</i>	<i>Ala/Val + Val/Val</i>
<b><i>GSTP1</i> (rs1695)</b>		
<i>Ile/Ile</i>		
sKBP (%)	8 (4)	47 (21)
kontrole (%)	45 (31)	114 (34)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	5,875 (1,190-29,002)
<i>p</i>	-	0,030
<i>Ile/Val + Val/Val</i>		
sKBP (%)	37 (17)	128 (58)
kontrole (%)	66 (20)	111 (33)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	4,796 (0,927-24,816)	19,724 (4,267-91,165)
<i>p</i>	0,002	<0,001
<b><i>GSTP1</i> (rs1138272)</b>		
<i>Ala/Ala</i>		
sKBP (%)	40 (18)	157 (70)
kontrole (%)	100 (30)	197 (59)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	4,374 (2,012-9,508)
<i>p</i>	-	<0,001
<i>Ala/Val + Val/Val</i>		
sKBP (%)	5 (2)	20 (9)
kontrole (%)	11 (3)	28 (8)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	0,594 (0,064-5,504)	3,290 (1,054-10,266)
<i>p</i>	0,646	0,040

<sup>a</sup> *OR* (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> *IP*, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

Superoksid dismutaze su zajedno sa glutation peroksidazama enzimi koji učestvuju u sukcesivnom nizu reakcija uklanjanja superoksid anjona gde inicijalnu reakciju nastanka vodonik peroksida katalizuju SOD, a potom GPX omogućavaju uklanjanje nakupljenih kiseoničnih radikala. Zato je ispitivano da li prisustvo genetskih polimorfizama koji utiču na aktivnost ova dva enzima mogu imati određeni efekat na kancerogenezu, posebno kada su prisutni u kombinaciji (Tabela 4.8).

Čak 39% pacijenata nosioci su referentnog genotipa za *GPXI* i varijantnog genotipa za *SOD2* u kombinaciji, naspram 29% kontrolne grupe. Ove osobe su u 3,6 puta većem riziku za nastanak sKBP u odnosu na referentnu grupu što se pokazalo kao statistički značajna razlika (*OR* = 3,653, 95% *IP* 1,148-11,630, *p* < 0,05). Iako nije postojala statistička značajnost, ispitanici koji su nosioci referentnog *SOD2* genotipa u kombinaciji sa varijantnim genotipom *GPXI* bili su izloženi manjem riziku nosilaca od referentne kombinacije (*OR* = 0,553, 95% *IP* 0,144-2,120, *p* > 0,05).

**Tabela 4.8.** Efekat kombinacije *SOD2* polimorfizma i *GPXI* polimorfizma na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi	<i>SOD2</i> (rs4880)	
	<i>Ala/Ala</i>	<i>Ala/Val</i> + <i>Val/Val</i>
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>		
<i>Pro/Pro</i>		
sKBP (%)	21 (10)	86 (39)
kontrole (%)	45 (13)	97 (29)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	3,653 (1,148-11,630)
<i>P</i>	-	0,028
<i>Pro/Leu</i> + <i>Leu/Leu</i>		
sKBP (%)	24 (11)	88 (40)
kontrole (%)	66 (20)	128 (38)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	0,553 (0,144-2,120)	2,533 (0,793-8,094)
<i>p</i>	0,388	0,117

<sup>a</sup> *OR* (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> *IP*, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

Kada se analizira istovremeno prisustvo različitih genskih varijanti *GPXI* polimorfizma u kombinaciji sa dva ispitivana polimorfizma *GSTP1*, najizraženija je razlika između nosilaca referentnog genotipa za *GPXI* uz varijantni genotip rs1695 za *GSTP1* u odnosu na nosioce oba referentna genotipa (*OR* = 5,476, 95% *IP* = 2,127-14,102, *p* < 0,05) što je prikazano u Tabeli 4.9. Međutim, kada su posmatrani *GPXI* i rs1138272 *GSTP1* polimorfizam u kombinaciji, nije pronađena statistički značajna razlika među pripadnicima različitih grupa.

**Tabela 4.9.** Efekat kombinacije *GPXI* polimorfizma i rs1695 i rs1138272 *GSTPI* polimorfizama na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi	<i>GPXI</i> (rs1050450)	
	<i>Pro/Pro</i>	<i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>
<b><i>GSTPI</i> (rs1695)</b>		
<i>Ile/Ile</i>		
sKBP (%)	26 (12)	29 (13)
kontrole (%)	68 (20)	91 (27)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,720 (0,239-2,165)
<i>p</i>	-	0,558
<i>Ile/Val + Val/Val</i>		
sKBP (%)	83 (37)	84 (38)
kontrole (%)	74 (22)	103 (31)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	5,476 (2,127-14,102)	2,194 (0,912-5,287)
<i>p</i>	<0,001	0,079
<b><i>GSTPI</i> (rs1138272)</b>		
<i>Ala/Ala</i>		
sKBP (%)	98 (44)	99 (45)
kontrole (%)	125 (37)	172 (51)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,585 (0,322-1,063)
<i>p</i>	-	0,079
<i>Ala/Val + Val/Val</i>		
sKBP (%)	11 (5)	14 (6)
kontrole (%)	17 (5)	22 (7)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	0,826 (0,238-2,868)	0,372 (0,115-1,199)
<i>p</i>	0,763	0,098

<sup>a</sup> *OR* (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> *IP*, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

U Tabeli 4.10. sažeto su prikazane sve kombinacije ispitivanih genotipova.

**Tabela 4.10.** Povezanost kombinacija ispitivanih genotipova sa rizikom za nastanak sKBP

Genotipovi	<i>Nrf2</i> (rs6721961)		<i>SOD2</i> (rs4880)		<i>GSTP1</i> (rs1695)		<i>GSTP1</i> (rs1138272)	
	<i>C/C</i>	<i>C/A + A/A</i>	<i>Ala/Ala</i>	<i>Ala/Val + Val/Val</i>	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ile/Val + Val/Val</i>	<i>Ala/Ala</i>	<i>Ala/Val + Val/Val</i>
<b><i>Nrf2</i> (rs6721961)</b>								
<i>C/C</i>								
sKBP (%) / kontrole (%)	-	-	-	-	41 (19) / 114 (34)	125 (58) / 127 (38)	144 (67) / 217 (65)	21 (10) / 24 (7)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	-	-	-	-	1,00 <sup>c</sup>	3,211 (1,513-6,814)	1,00 <sup>c</sup>	1,067 (0,41-2,779)
<i>p</i>	-	-	-	-	-	0,002	-	0,894
<i>C/A + A/A</i>								
sKBP (%) / kontrole (%)	-	-	-	-	11 (5) / 45 (13)	39 (18) / 50 (15)	46 (21) / 80 (24)	4 (2) / 15 (4)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	-	-	-	-	0,385 (0,095-1,564)	2,731 (1,107-6,739)	0,835 (0,430-1,621)	0,162 (0,019-1,408)
<i>p</i>	-	-	-	-	0,182	0,029	0,594	0,099
<b><i>SOD2</i> (rs4880)</b>								
<i>Ala/Ala</i>								
sKBP (%) / kontrole (%)	38 (18) / 76 (22)	6 (3) / 36 (11)	-	-	8 (4) / 45 (13)	37 (17) / 66 (20)	40 (18) / 100 (30)	5 (2) / 11 (3)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,308 (0,059-1,599)	-	-	1,00 <sup>c</sup>	4,796 (0,927-24,816)	1,00 <sup>c</sup>	0,594 (0,064-5,504)
<i>p</i>	-	0,161	-	-	-	0,062	-	0,646
<i>Ala/Val + Val/Val</i>								
sKBP (%) / kontrole (%)	126 (59) / 165 (49)	44 (20) / 59 (18)	-	-	47 (21) / 114 (34)	128 (58) / 111 (33)	154 (70) / 197 (59)	20 (9) / 28 (8)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	3,234 (1,436-7,280)	2,918 (1,131-7,532)	-	-	5,875 (1,190-29,002)	19,724 (4,267-91,165)	4,374 (2,012-9,508)	3,290 (1,054-10,266)
<i>p</i>	0,005	0,027	-	-	0,030	<0,001	<0,001	0,040
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>								
<i>Pro/Pro</i>								
sKBP (%) / kontrole (%)	78 (36) / 95 (28)	26 (12) / 47 (14)	21 (10) / 45 (13)	86 (39) / 97 (29)	26 (12) / 68 (20)	83 (37) / 74 (22)	98 (44) / 125 (37)	11 (5) / 17 (5)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	1,00 <sup>c</sup>	0,423 (0,158-1,133)	1,00 <sup>c</sup>	3,653 (1,148-11,630)	1,00 <sup>c</sup>	5,476 (2,127-14,102)	1,00 <sup>c</sup>	0,826 (0,238-2,868)
<i>p</i>	-	0,087	-	0,028	-	<0,001	-	0,763
<i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>								
sKBP (%) / kontrole (%)	87 (41) / 146 (44)	24 (11) / 48 (14)	24 (11) / 66 (20)	88 (40) / 128 (38)	29 (13) / 91 (27)	84 (38) / 103 (31)	99 (45) / 172 (51)	14 (6) / 22 (7)
<i>OR</i> <sup>a</sup> (95 % <i>IP</i> <sup>b</sup> )	0,440 (0,223-0,868)	0,456 (0,188-1,057)	0,553 (0,144-2,120)	2,533 (0,793-8,094)	0,720 (0,239-2,165)	2,194 (0,912-5,287)	0,585 (0,322-1,063)	0,372 (0,115-1,199)
<i>p</i>	0,018	0,067	0,388	0,117	0,558	0,079	0,079	0,098

<sup>a</sup> *OR* (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> *IP*, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

#### 4.4.2. Analiza haplotipa za ispitivane genetske polimorfizme *GSTPI*

Zbog blizine pozicije ispitivanih *GSTPI* SNP-ova rs1695 i rs1138272, učinjena i je analiza haplotipa *GSTPIABCD*. U analizi haplotipa, *GSTPIA* predstavlja kombinaciju *A313* i *C114* što podrazumeva da sintetisana forma enzima ima na poziciji 105 izoleucin a na 114 alanin. Haplotip *GSTPIB* obeležava postojanje *G313* i *C114* čiji je rezultat valin na poziciji 105 a alanin na 114. Kombinacija *G313* i *T114* obeležena je kao *GSTPIC* a unutar enzima i na mestu 105 i na 114 nalazi se valin, a ukoliko je na mestu 105 izoleucina a na 114 valin, onda je u pitanju *GSTPID* koji nastaje kao kombinacija *A313* i *T114*. Haplotip A procentualno je najzastupljeniji i među pacijentima i među kontrolama (pacijenti 56%, kontrole 64%). U Tabeli 4.11 se može videti da *GSTPIC* haplotip sa sobom nosi najveći rizik za razvoj ovog karcinoma što ima statističku značajnost (OR = 3,5, 95% IR = 1,49-8,22,  $p < 0,05$ ), mada je statistički značajno povećan rizik uočen i kod nosilaca *GSTPIB* haplotipa.

**Tabela 4.11.** Analiza haplotipa za genetske polimorfizme *GSTPI* rs1695 i rs1138272

Genotipovi			Distribucija haplotipova			
	rs1695	rs1138272	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<i>GSTPIA</i> <sup>d</sup>	*A	*C	56	64	1,00 <sup>c</sup>	
<i>GSTPIB</i> <sup>e</sup>	*G	*C	38	30	1,50 (1,10 – 2,05)	0,012
<i>GSTPIC</i> <sup>f</sup>	*G	*T	5	3	3,50 (1,49 – 8,22)	0,004
<i>GSTPID</i> <sup>g</sup>	*A	*T	1	3	0,00 (N/A <sup>h</sup> )	1,000

*p* vrednost za globalnu povezanost haplotipa <0.001

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*), odnos šansi, prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa; <sup>d</sup> *GSTPIA* genotip koji se sastoji iz *Ile105* i *Ala114*; <sup>e</sup> *GSTPIB* genotip koji se sastoji iz *Val105* i *Ala114*; <sup>f</sup> *GSTPIC* genotip koji se sastoji iz *Val105* i *Val114*; <sup>g</sup> *GSTPID* genotip koji se sastoji iz *Ile105* i *Val114*; <sup>h</sup> NA (engl. *not applicable*), nije primenljivo

#### 4.4.3. Kumulativni efekat ispitivanih polimorfizama

Na kraju, statistički je analiziran kumulativni efekat svih genskih varijanti koje se mogu dovesti u vezu sa rizikom za nastanak svetloćelijskog KBP što je prikazano Tabelom 4.12. Kao što se može videti u tabeli, uočava se porast rizika, iako bez statistički značajne razlike (OR = 3,468, 95% IP = 0,367-32,754,  $p < 0,05$ ) ukoliko su pacijenti nosioci samo jednog rizičnog genotipa – C/A ili A/A za *Nrf2*, Ala/Val ili Val/Val za *SOD2*, Pro/Leu ili Leu/Leu za *GPX1*, Ile/Val ili Val/Val za *GSTP1* rs1695, i Ala/Val ili Val/Val za *GSTP1* rs1138272. Za pacijente koji imaju dva rizična genotipa, rizik za obolevanje je veći 4 puta (OR = 4,146, 95% IP = 0,469-36,638,  $p < 0,05$ ), a za ispitanike nosioce tri rizična genotipa, 5,5 puta (OR = 5,531, 95% IP = 0,623-49,069,  $p < 0,05$ ). Približno jednako povećanje rizika imaju ispitanici nosioci 4 i 5 rizičnih genotipova u kombinaciji koji je veći od 7 puta, mada se ta razlika nije pokazala kao statistički značajna (OR = 7,775, 95% IP = 0,797-75,891,  $p < 0,05$ ; OR = 7,418, 95% IP = 0,188-292,173,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.12.** Kumulativni efekat ispitivanih polimorfizama povezanih sa rizikom za nastanak sKBP

Broj genotipova koji su povezani sa povećanim rizikom za nastanak sKBP	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
0	3 (1)	14 (4)	1,00 <sup>c</sup>	
1	29 (14)	64 (19)	3,468 (0,367-32,754)	0,278
2	86 (40)	137 (41)	4,146 (0,469-36,638)	0,201
3	66 (31)	94 (28)	5,531 (0,623-49,069)	0,125
4	27 (13)	25 (7)	7,775 (0,797-75,891)	0,078
5	2 (1)	2 (1)	7,418 (0,188-292,173)	0,285

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*), odnos šansi, prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa



#### 4.5. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na faktore rizika za nastanak sKBP

Kada su pacijenti i pripadnici kontrolne grupe razvrstani na osnovu prisustva prepoznatih faktora rizika za nastanak svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, razlika u zastupljenosti određenih genotipova je postala uočljivija (Grafik 4.1-4.4).

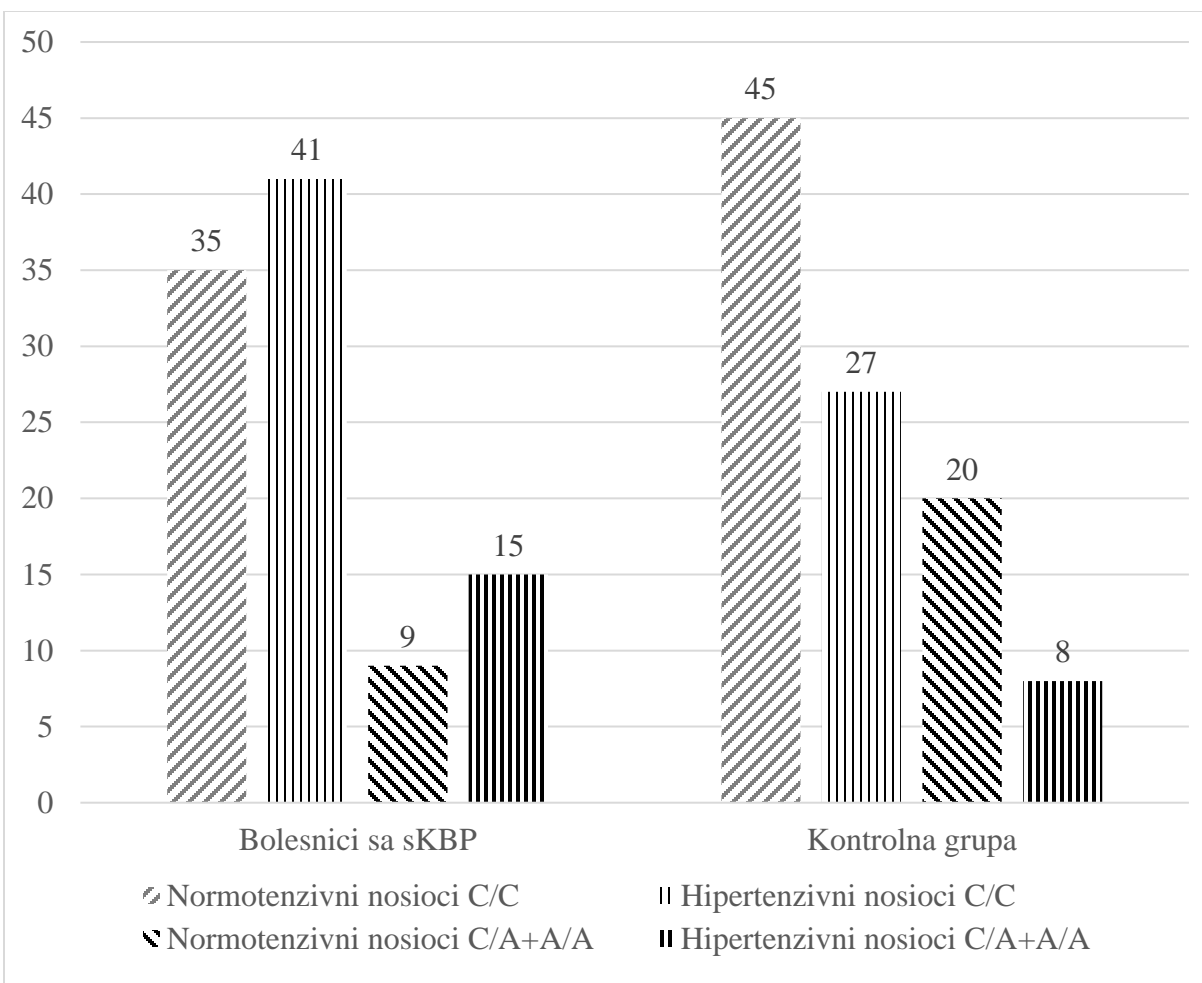
##### 4.5.1. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na povišen arterijski pritisak

Kako se među ispitanicima povišena vrednost arterijskog pritiska pokazala kao značajan faktor rizika zasebno, prvo je analiziran genetski profil normotenzivnih i hipertenzivnih osoba.

Kroz Grafik 4.9 može se uočiti da postoji značajna razlika u distribuciji *Nrf2* genotipova među normotenzivnim i hipertenzivnim pacijentima i pripadnicima kontrolne grupe. Unutar kontrolne grupe, čak 45% posmatranih ispitanika imaju normalne vrednosti arterijskog pritiska i istovremeno su nosioci *C/C* genotipa. Upečatljivo je da najveći procenat bolesnika sa sKBP ima povišen arterijski pritisak a da su nosioci referentnog *C/C* genotipa za *Nrf2*. Istovremeno, značajna je razlika u zastupljenosti ovog genotipa među hipertenzivnim nosiocima *C/C* unutar kontrolne grupe, što vodi tome da hipertenzivni nosioci referentnog genotipa imaju najveći rizika za razvoj sKBP ( $OR = 2,386$ , IP 95% 1,212-4,694,  $p < 0,05$ ) (Tabela 4.13).

Iako bez statistički značajne razlike, uočava se da je među obolelima od sKBP čak dva puta veći procenat hipertenzivnih nosilaca *C/A* ili *A/A* genotipa u odnosu na kontrolnu grupu (15% u odnosu na 8%).

Posmatrajući *SOD2* genotipove u kombinaciji sa povišenim arterijskim pritiskom (grafik 4.10), u grupi obolelih najviše je hipertenzivnih nosilaca varijantnih genotipova, bilo *Ala/Val* bilo *Val/Val* (41%), daleko više nego hipertenzivnih nosilaca referentnog *Ala/Ala* genotipa (14%). I statistički značajna razlika postoji u poređenju sa kontrolnom grupom (hipertenzivni nosioci *Ala/Val* ili *Val/Val* genotipa 23 %), tako da može se videti da su hipertenzivni nosioci varijantnih genotipova u više od 12 puta većem riziku za razvoj ovog karcinoma ( $OR = 12,338$ , IP 95% = 4,108-37,053,  $p < 0,05$ ). Unutar kontrolne grupe, najviše je normotenzivnih osoba koje su nosioci referentnog genotipa (44%), a najmanje normotenzivnih osoba koje imaju *Ala/Ala* *SOD2* genotip (12%) (Tabela 4.14).

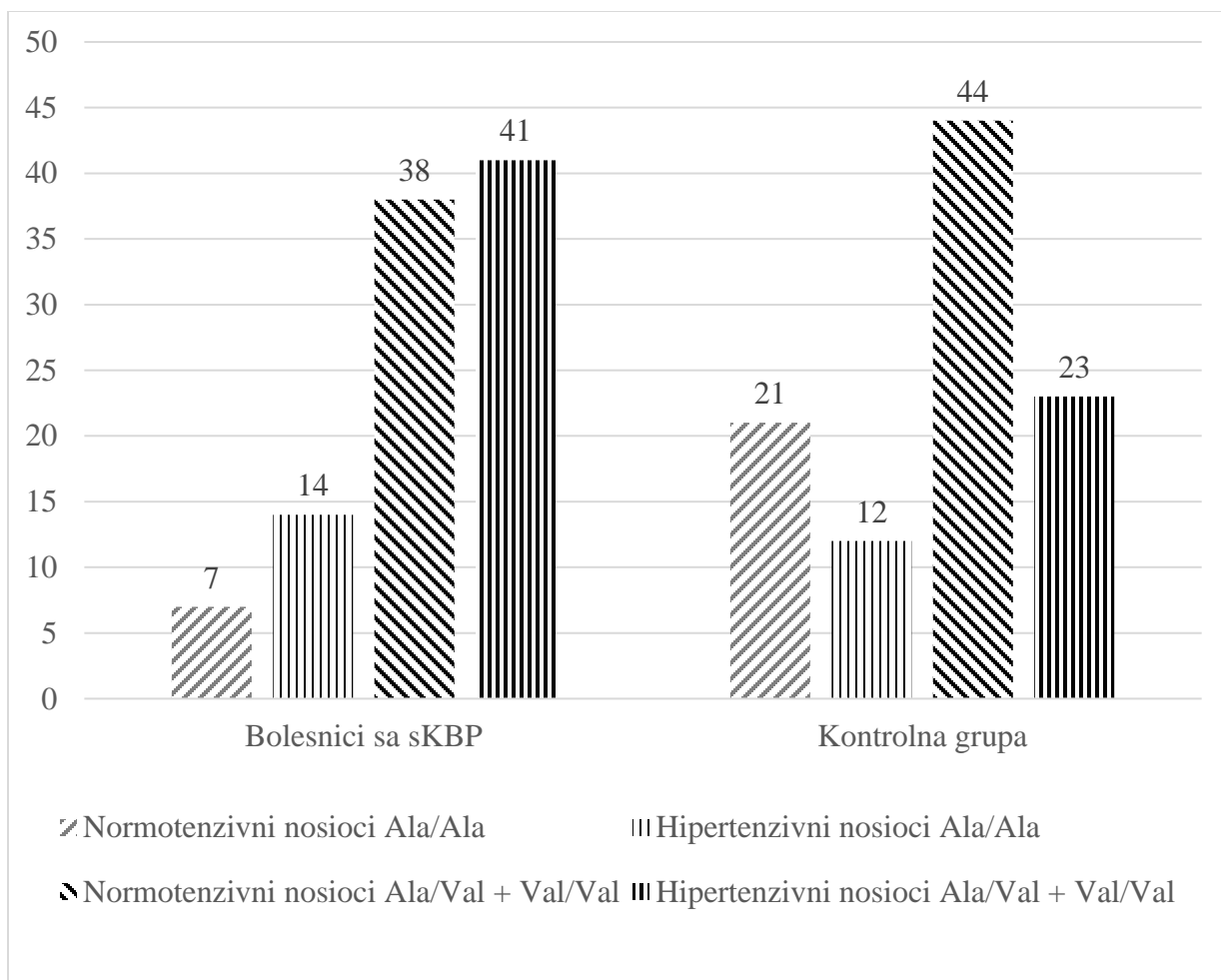


**Grafik 4.9.** Distribucija *Nrf2* genotipova unutar grupe obolelih od sKBP i kontrola u odnosu na vrednosti arterijskog pritiska

**Tabela 4.13.** Udruženi efekat ispitivanog *Nrf2* polimorfizma i povišenog arterijskog pritiska na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi i hipertenzija	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> (rs6721961)</b>				
Normotenzivni nosioci C/C	62 (35)	146 (45)	1,00 <sup>c</sup>	
Hipertenzivni nosioci C/C	74 (41)	88 (27)	2,386 (1,212-4,694)	0,012
Normotenzivni nosioci C/A + A/A	17 (9)	65 (20)	0,630 (0,280-1,415)	0,263
Hipertenzivni nosioci C/A + A/A	26 (15)	28 (8)	1,911 (0,730-5,003)	0,187

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa



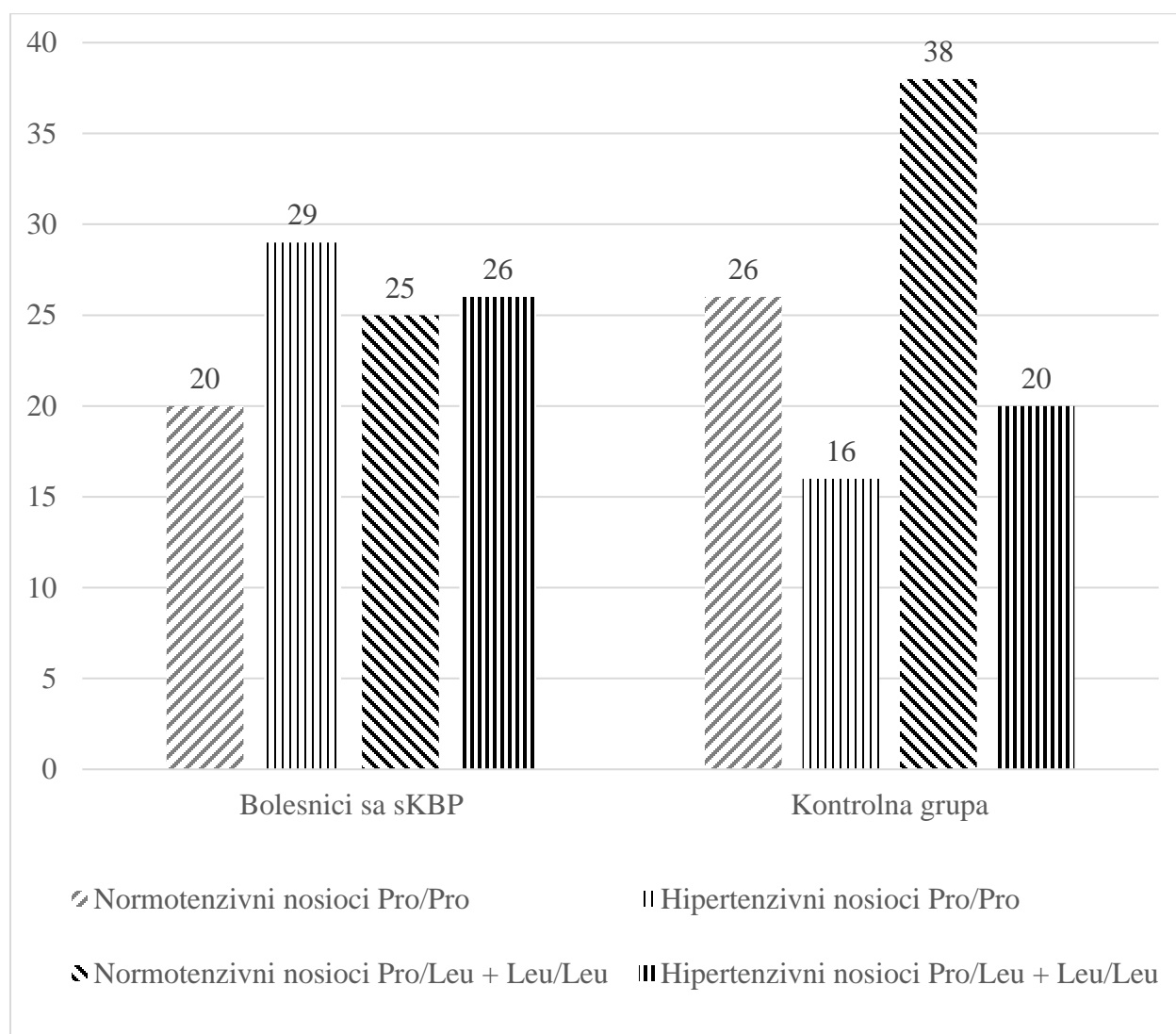
**Grafik 4.10.** Distribucija *SOD2* genotipova unutar grupe obolelih od sKBP i kontrola u odnosu na vrednosti arterijskog pritiska

**Tabela 4.14.** Udruženi efekat ispitivanog *SOD2* polimorfizma i povišenog arterijskog pritiska na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi i hipertenzija	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<b><i>SOD2</i> (rs4880)</b>				
Normotenzivni nosioci <i>Ala/Ala</i>	12 (7)	67 (21)	1,00 <sup>c</sup>	
Hipertenzivni nosioci <i>Ala/Ala</i>	25 (14)	41 (12)	2,691 (0,724-10,006)	0,140
Normotenzivni nosioci <i>Ala/Val + Val/Val</i>	70 (38)	144 (44)	4,462 (1,598-12,462)	0,004
Hipertenzivni nosioci <i>Ala/Val + Val/Val</i>	75 (41)	75 (23)	12,338 (4,108-37,053)	<0,001

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

Kao i kada je posmatran zasebno *GPXI* polimorfizam, i među normotenzivnim i hipertenzivnim pripadnicima ispitivane i kontrolne grupe, u manjem riziku za nastanak karcinoma su osobe koje su nosioci *Pro/Leu* ili *Leu/Leu* genotipa, bilo da imaju povišen pritisak ili ne. U Grafikonu 4.11 se vidi da je najveći procenat pripadnika kontrolne grupe imao normalne vrednosti arterijskog pritiska ako su pri tome nosioci varijantnih genotipova (38%), dok je najmanji broj pripadnika kontrolne grupe koji su imali povišen pritisak a nosioci su referentnog *Pro/Pro* *GPXI* genotipa (16%). Unutar grupe pacijenata, najviše je nosilaca referentnog *Pro/Pro* genotipa koji su imali povišen pritisak (29%). Ako se sve pomenuto posmatra u odnosu na podložnost za nastanak sKBP, upravo hipertenzivni nosioci referentnog genotipa izloženi su riziku većem od oko 3,5 puta u odnosu na normotenzivne nosioce referentnog genotipa (OR = 3,596, IP 95% = 1,486-8,701,  $p < 0,05$ ) što se pokazalo kao statistički značajna razlika (Tabela 4.15).



**Grafik 4.11.** Distribucija *GPXI* genotipova unutar grupe obolelih od sKBP i kontrola u odnosu na vrednosti arterijskog pritiska

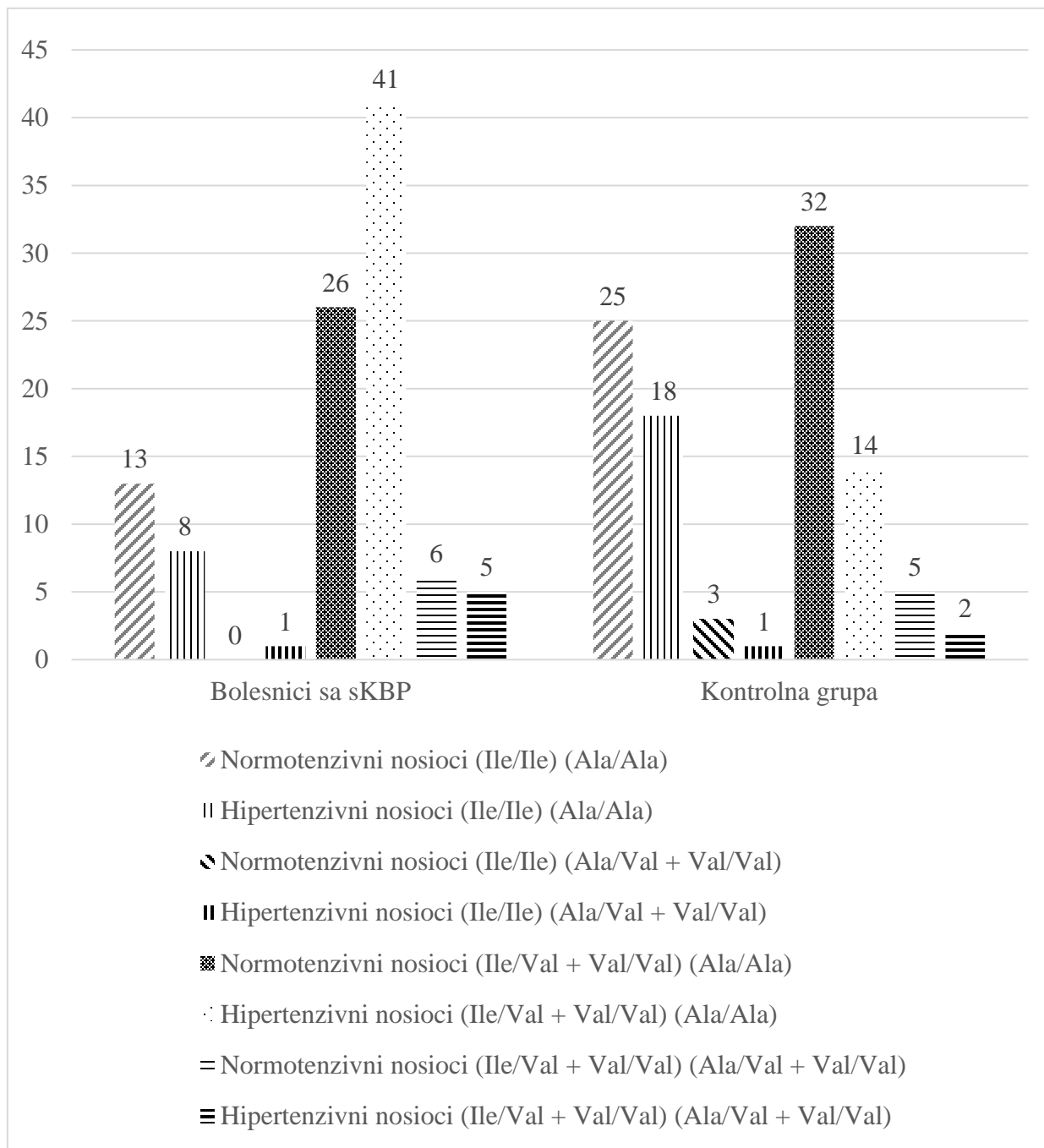
**Tabela 4.15.** Udruženi efekat ispitivanog *GPXI* polimorfizma i povišenog arterijskog pritiska na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi i hipertenzija	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>				
Normotenzivni nosioci <i>Pro/Pro</i>	36 (20)	86 (26)	1,00 <sup>c</sup>	
Hipertenzivni nosioci <i>Pro/Pro</i>	53 (29)	52 (16)	3,596 (1,486-8,701)	0,005
Normotenzivni nosioci <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	47 (25)	125 (38)	0,764 (0,371-1,572)	0,464
Hipertenzivni nosioci <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	48 (26)	64 (20)	1,269 (0,551-2,923)	0,576

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

Kada su analizirani *GSTPI* rs1695 i rs1138272 polimorfizmi u kombinaciji, ispitanici i kontrole razvrstani su u osam grupa u odnosu na različite kombinacije genotipova i njihovog statusa arterijskog pritiska (grafik 4.12).

Među obolelima od sKBP je jasno izražena razlika u zastupljenosti kombinacije varijantnog genotipa za rs1695 i referentnog genotipa za rs1138272 i hipertenzije kao faktora rizika, u odnosu na učestalost svih ostalih kombinacija genotipova i prisustva povišenog pritiska (41%). Ista kombinacija genotipova i hipertenzije unutar kontrolne grupe je daleko manje zastupljena (14%). Otuda i činjenica da su ove osobe u 9 puta većem riziku za nastanak svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima u odnosu na normotenzivne osobe koje su nosioci referentnih genotipova za oba polimorfizma (OR = 9,198, IP 95% 3,587-23,586,  $p < 0,05$ ). Veći rizik za nastanak ovog tumora imaju i nosioci varijantnih genotipova (*Ile/Val* i *Val/Val* za rs1695 a *Ala/Val* i *Val/Val* za rs1138272) bilo da imaju normalan arterijski pritisak bilo da boluju od hipertenzije (normotenzivni nosioci OR = 3,373, IP 95% = 0,976-11,650,  $p > 0,05$ , hipertenzivni nosioci OR = 1,209, IP 95% = 0,201-7,268,  $p > 0,05$ ) (Tabela 4.16).



**Grafik 4.12.** Distribucija ispitivanih *GSTP1* genotipova unutar grupe obolelih od sKBP i kontrola u odnosu na vrednosti arterijskog pritiska

**Tabela 4.16.** Udruženi efekat ispitivanih *GSTPI* polimorfizama i povišenog arterijskog pritiska na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi i hipertenzija	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<b><i>GSTPI</i> (rs1695 i rs1138272)</b>				
Normotenzivni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	24 (13)	81 (25)	1,00 <sup>c</sup>	
Hipertenzivni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	16 (8)	58 (18)	0,857 (0,258-2,841)	0,801
Normotenzivni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Val</i> + <i>Val/Val</i> )	0 (0)	11 (3)	0,000 (0,000)	0,999
Hipertenzivni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Val</i> + <i>Val/Val</i> )	1 (1)	4 (1)	0,000 (0,000)	0,999
Normotenzivni nosioci ( <i>Ile/Val</i> + <i>Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	48 (26)	104 (32)	1,650 (0,734-3,710)	0,226
Hipertenzivni nosioci ( <i>Ile/Val</i> + <i>Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	75 (41)	46 (14)	9,198 (3,587-23,586)	<0,001
Normotenzivni nosioci ( <i>Ile/Val</i> + <i>Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Val</i> + <i>Val/Val</i> )	11 (6)	15 (5)	3,373 (0,976-11,650)	0,055
Hipertenzivni nosioci ( <i>Ile/Val</i> + <i>Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Val</i> + <i>Val/Val</i> )	9 (5)	8 (2)	1,209 (0,201-7,268)	0,836

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

#### 4.5.2. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na gojaznost

Kada se posmatraju gojazni i normalno uhranjeni nosioci referentnih i varijantnih genotipova za pojedinačne polimorfizme, takođe se uočavaju razlike u distribuciji unutar grupe obolelih i kontrolne grupe (Tabela 4.17).

Najveći procenat pripadnika ispitivane grupe nosioci su referentnog *C/C* genotipa za *Nrf2* polimorfizam, a imaju indeks telesne mase veći od 25 (48%), dok su najmanji procenat nosioci varijantnih *C/A* ili *A/A* genotipa koji su normalno uhranjeni (8%). Slična je distribucija i u okviru kontrolne grupe – gojazni nosioci *C/C* genotipa su najbrojniji (46%) a najmanje je normalno uhranjenih nosilaca *C/A* ili *A/A* genotipa (10%). Među različitim podgrupama nije uočena statistički značajna razlika u riziku za nastanak sKBP.

Statistički značajna razlika postoji u distribuciji ispitivanih *SOD2* genotipova kada se ispitanici razvrstaju prema indeksu telesne mase. Naime, najveći procenat obolelih od sKBP imaju visok indeks telesne mase a nosioci su varijantnih *SOD2* genotipova, bilo *Ala/Val* bilo *Val/Val* (53%), dok je najmanje normalno uhranjenih nosilaca referentnog *Ala/Ala* genotipa (7%). Slična je distribucija i u kontrolnoj grupi, iako je razlika u zastupljenosti nešto manja (normalno uhranjeni nosioci referentnog genotipa 12% a gojazni nosioci varijantnog genotipa 43%). Povećan rizik za nastanak sKBP imaju i normalno uhranjeni i gojazni nosioci bilo *Ala/Val* bilo *Val/Val* genotipa (za normalno uhranjene ispitanike OR = 5,480, IP 95% = 1,723-17,432, *p* < 0,05, a za gojazne ispitanike OR = 4,406, IP 95% = 1,457-13,329, *p* < 0,05).

**Tabela 4.17.** Udruženi efekat ispitivanih polimorfizama i gojaznosti ispitanika na rizik za nastanak sKBP

Genotipovi i gojaznost	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> (rs6721961)</b>				
Normalno uhranjeni nosioci <i>C/C</i>	48 (27)	80 (25)	1,00 <sup>c</sup>	
Gojazni nosioci <i>C/C</i>	84 (48)	143 (46)	0,749 (0,387-1,450)	0,391
Normalno uhranjeni nosioci <i>C/A + A/A</i>	14 (8)	30 (10)	0,430 (0,152-1,213)	0,111
Gojazni nosioci <i>C/A + A/A</i>	29 (17)	61 (19)	0,699 (0,298-1,638)	0,410
<b><i>SOD2</i> (rs4880)</b>				
Normalno uhranjeni nosioci <i>Ala/Ala</i>	13 (7)	37 (12)	1,00 <sup>c</sup>	
Gojazni nosioci <i>Ala/Ala</i>	21 (12)	70 (22)	1,114 (0,297-4,177)	0,873
Normalno uhranjeni nosioci <i>Ala/Val + Val/Val</i>	50 (28)	73 (23)	5,480 (1,723-17,432)	0,004
Gojazni nosioci <i>Ala/Val + Val/Val</i>	93 (53)	134 (43)	4,406 (1,457-13,329)	0,009
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>				
Normalno uhranjeni nosioci <i>Pro/Pro</i>	31 (17)	43 (14)	1,00 <sup>c</sup>	
Gojazni nosioci <i>Pro/Pro</i>	54 (30)	87 (28)	0,884 (0,381-2,054)	0,775
Normalno uhranjeni nosioci <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	34 (19)	67 (21)	0,589 (0,246-1,410)	0,235
Gojazni nosioci <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	60 (34)	117 (37)	0,488 (0,215-1,110)	0,087
<b><i>GSTPI</i> (rs1695 i rs1138272)</b>				
Normalno uhranjeni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	10 (6)	43 (14)	1,00 <sup>c</sup>	
Gojazni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	28 (16)	89 (28)	0,936 (0,298-2,940)	0,910
Normalno uhranjeni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	0 (0)	4 (1)	0,000	0,999
Gojazni nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	0 (0)	10 (3)	0,000	0,999
Normalno uhranjeni nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	45 (25)	56 (18)	3,121 (1,094-8,903)	0,033
Gojazni nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	75 (42)	93 (30)	3,107 (1,152-8,382)	0,025
Normalno uhranjeni nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	10 (5)	7 (2)	4,611 (1,069-19,888)	0,040
Gojazni nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	11 (6)	12 (4)	1,376 (0,281-6,752)	0,694

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa



Slično kao i prilikom ispitivanja *Nrf2* polimorfizma, nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova za *GPXI* rs105450 polimorfizam. U grupi pacijenata najbrojniji su nosioci varijantnih genotipova *Pro/Leu* i *Leu/Leu* koji su imali povišen indeks telesne mase (34%), a takođe je ovo najzastupljenija podgrupa i unutar kontrolne grupe (37%). Najmanje je normalno uhranjenih nosilaca *Pro/Pro* genotipa koji imaju sKBP (17%), a sličan procenat je normalno uhranjenih nosilaca ovog genotipa i u kontrolnoj grupi (14%) (Tabela 4.17).

Kad je u pitanju kombinacija *GSTPI* genotipova, uočava se značajna razlika i povećan rizik za nastanak sKBP ukoliko su osobe nosioci varijantnih genotipova. Pa su tako, iznenađujuće, u najvećem riziku normalno uhranjeni nosioci varijantnih genotipova za oba ispitivana polimorfizma (OR = 4,611, IP 95% = 1,069-19,888,  $p < 0,05$ ). U grupi obolelih od sKBP najbrojniji su gojazni nosioci varijantnog genotipa za rs1695 u kombinaciji sa referentnim genotipom za rs1138272 (42%) (Tabela 4.17).

#### 4.5.3. Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na pušačke navike

Iako je pušenje prepoznat faktor rizika za nastanak brojnih tumora, pa i svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, u ispitivanoj grupi se nije pokazalo kao značajan faktor rizika, i posmatrano ponaosob, samo blago povećava rizik za nastanak ovog tumora (Tabela 4.1). Ipak, razlike u distribuciji određenih genotipova se primećuju kada se ispitanici razvrstaju prema njihovim pušačkim navikama (Tabela 4.18).

Najviše obolelih od sKBP jesu pušači koji su nosioci referentnog *C/C Nrf2* genotipa (45%). Naspram njih, daleko je manji procenat pušača nosilaca *C/C* genotipa u kontrolnoj grupi (36%) koji su jednako zastupljeni kao nepušači nosioci referentnog genotipa u kontrolnoj grupi (36%). Stoga, pušenje kao faktor rizika i *C/C* genotip zajedno, bez uočene statistički značajne razlike, povećavaju rizik za nastanak sKBP 1,5 puta (OR = 1,502, IP 95% = 0,942-2,395,  $p > 0,05$ ).

U najvećem riziku za razvoj sKBP su osobe koje su pušači, a pri tome nosioci *Ala/Val* ili *Val/Val SOD2* genotipa (OR = 2,141, IP 95% = 1,119-4,098,  $p < 0,05$ ). Njih je čak 48% u grupi pacijenata, dok je pušača nosilaca varijantnog genotipa u kontrolnoj grupi svega 31%.

Kada se pripadnici grupe obolelih od sKBP razvrstaju prema pušačkom statusu i *GPXI* genotipu, distribucija unutar svake podgrupe je prilično ujednačena. Naime, učestalost pušača koji su nosioci referentnog i varijantnog genotipa (pušači nosioci *Pro/Pro* genotipa 28% a pušači nosioci *Pro/Leu* i *Leu/Leu* genotipa 28%) je jednaka. Kao što je prikazano, najmanje je nepušača koji imaju *Pro/Pro GPXI* genotip (20%), a nijedna od podgrupa nije u statistički povećanom riziku za nastanak sKBP.

Najveći rizik za obolevanje od sKBP nose osobe koje su nosioci nekog od varijantnih genotipova i za rs1695 i za rs1138272 *GSTPI* polimorfizme, bilo da su pušači bilo da su nepušači. Nepušači koji su nosioci varijantnih genotipova za oba ispitivana polimorfizma imaju čak 6,5 puta veći rizik za razvoj ovog tumora (OR = 6,566, IP 95% = 1,847-23,335,  $p < 0,05$ ) a pušači skoro 4 puta veći rizik (OR = 3,970, IP 95% = 1,493-10,561,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.18.** Povezanost ispitivanih polimorfizama u kombinaciji za pušačkim statusom ispitanika sa rizikom za nastanak sKBP

Genotipovi i pušenje	Bolesnici sa sKBP n (%)	Kontrolna grupa n (%)	OR <sup>a</sup> (95% IP <sup>b</sup> )	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> (rs6721961)</b>				
Nepušači nosioci <i>C/C</i>	58 (32)	120 (36)	1,00 <sup>c</sup>	
Pušači nosioci <i>C/C</i>	81 (45)	121 (36)	1,502 (0,942-2,395)	0,087
Nepušači nosioci <i>C/A + A/A</i>	21 (11)	44 (13)	1,101 (0,581-2,086)	0,767
Pušači nosioci <i>C/A + A/A</i>	22 (12)	50 (15)	1,011 (0,539-1,897)	0,973
<b><i>SOD2</i> (rs4880)</b>				
Nepušači nosioci <i>Ala/Ala</i>	22 (12)	44 (13)	1,00 <sup>c</sup>	
Pušači nosioci <i>Ala/Ala</i>	16 (8)	67 (20)	0,471 (0,207-1,067)	0,071
Nepušači nosioci <i>Ala/Val + Val/Val</i>	59 (32)	120 (36)	1,165 (0,607-2,235)	0,646
Pušači nosioci <i>Ala/Val + Val/Val</i>	88 (48)	104 (31)	2,141 (1,119-4,098)	0,022
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>				
Nepušači nosioci <i>Pro/Pro</i>	37 (20)	76 (23)	1,00 <sup>c</sup>	
Pušači nosioci <i>Pro/Pro</i>	53 (28)	65 (19)	1,751 (0,978-3,135)	0,060
Nepušači nosioci <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	45 (24)	88 (26)	1,034 (0,583-1,831)	0,909
Pušači nosioci <i>Pro/Leu + Leu/Leu</i>	52 (28)	106 (32)	1,029 (0,587-1,805)	0,920
<b><i>GSTP1</i> (rs1695 i rs1138272)</b>				
Nepušači nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	19 (10)	77 (23)	1,00 <sup>c</sup>	
Pušači nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	21 (11)	67 (20)	1,473 (0,697-3,116)	0,311
Nepušači nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	1 (1)	5 (1)	0,000	0,999
Pušači nosioci ( <i>Ile/Ile</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	0 (0)	10 (3)	0,000	0,999
Nepušači nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	53 (28)	76 (23)	2,769 (1,437-5,336)	0,002
Pušači nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Ala</i> )	72 (39)	76 (23)	3,792 (1,966-7,316)	<0,001
Nepušači nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	9 (5)	6 (2)	6,566 (1,847-23,335)	0,004
Pušači nosioci ( <i>Ile/Val + Val/Val</i> ) ( <i>Ala/Val + Val/Val</i> )	12 (6)	18 (5)	3,970 (1,493-10,561)	0,006

<sup>a</sup> OR (engl. *odds ratio*) odnos šansi prilagođen prema varijablama starosti, polu, indeksu telesne težine, konzumiranom paklu cigareta po godini, hipertenziji; <sup>b</sup> IP, interval poverenja; <sup>c</sup> referentna grupa

#### 4.6. Distribucija ispitivanih genotipova među preživelim i preminulim ispitanicima

Za 215 (96%) od 223 ispitivanih obolelih od sKBP prikupljeni su podaci o preživljavanju za period od 2005. godine do 2018. godine. Zabeleženo je da je preminulo 80 pacijenata (37%) a 135 pacijenata imalo je pozitivan ishod za srednji period od  $67,31 \pm 37,68$  meseci (u opsegu od 1 do 161 meseca). U tabeli 4.19 prikazana je distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na njihov ishod za navedeni period praćenja.

**Tabela 4.19.** Distribucija ispitivanih genotipova u odnosu na preživljavanje pacijenta sa sKBP

Genotip	Živi pacijenti, n (%)	Preminuli pacijenti, n (%)	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> (rs6721961)</b>			
<i>C/C</i> <sup>a</sup>	99 (76)	59 (75)	
<i>C/A + A/A</i> <sup>b</sup>	31 (24)	19 (25)	0,530
<b><i>SOD2</i> (rs4880)</b>			
<i>Ala/Ala</i> <sup>c</sup>	31 (24)	12 (15)	
<i>Ala/Val + Val/Val</i> <sup>d</sup>	101 (76)	68 (85)	0,093
<b><i>GPXI</i> (rs1050450)</b>			
<i>Pro/Pro</i> <sup>e</sup>	57 (43)	46 (57)	
<i>Pro/Leu + Leu/Leu</i> <sup>f</sup>	77 (57)	34 (43)	0,024
<b><i>GSTP1</i> (rs1695 i rs1138272)</b>			
<i>(Ile/Ile) (Ala/Ala)</i> <sup>g</sup>	41 (31)	12 (15)	
<i>(Ala/Ala)(Pro/Leu + Leu/Leu)</i> <i>(Ala/Val + Val/Val)(Pro/Pro)</i> <i>(Ala/Val + Val/Val)(Pro/Leu + Leu/Leu)</i> <sup>h</sup>	93 (69)	68 (85)	0,007

<sup>a</sup> *C/C* – nosioci oba referentna alela; <sup>b</sup> *C/A* i *A/A* – nosioci barem jednog varijantnog alela; <sup>c</sup> *Ala/Ala* – nosioci oba referentna alela; <sup>d</sup> *Ala/Val* i *Val/Val* – nosioci barem jednog varijantnog alela; <sup>e</sup> *Pro/Pro* – nosioci oba referentna alela; <sup>f</sup> *Pro/Leu* i *Leu/Leu* – nosioci barem jednog varijantnog alela; <sup>g</sup> *(Ile/Ile) (Ala/Ala)* – nosioci oba referentna alela i za rs1695 i za rs1138272; <sup>h</sup> nosioci barem jednog varijantnog alela bilo za rs1695 bilo za rs1138272

Približno je jednak procenat zastupljenosti referentnog i varijantnog genotipa *Nrf2* rs6721961 polimorfizma među živim i preminulim pacijentima sa sKBP koji su bili uključeni u istraživanje. I u grupi preživelih a i preminulih pacijenata, upečatljivo je veći procenat pacijenata koji su nosioci *C/C* genotipa u odnosu na nosioce varijantnih *C/A* i *A/A* genotipove. Nije zabeležena statistički značajna razlika u distribuciji ovih genotipova ( $p > 0,05$ ). Kada je u pitanju *SOD2* polimorfizam, upečatljivo je više nosilaca varijantnih genotipova i među preživelim i među preminulim (76% među živim pacijentima i 85% među preminulim pacijentima). Međutim, ni ova razlika nije nosila sa sobom statističku značajnost ( $p > 0,05$ ).

Značajna razlika postoji u distribuciji referentnog i varijantnog genotipa *GPXI* kod pacijenata sa sKBP u odnosu na preživljavanje. Dok je u grupi živih pacijenata veći procenat nosilaca varijantnih *Pro/Leu* i *Leu/Leu* genotipova (57%) u odnosu na nosioce *Pro/Pro* genotipa (43%), u grupi preminulih pacijenata potpuno je obrnuta distribucija (nosioci referentnog genotipa 57% a nosioci varijantnih genotipova 43%) što je predstavljalo statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Dva ispitivana *GSTPI* polimorfizma posmatrana su zajedno kako bi se uočilo da li u kombinaciji postoji razlika u distribuciji nosilaca ovih genotipova u odnosu na preživljavanje pacijenata sa sKBP. U Tabeli 4.19 može se videti da su nosioci barem jednog varijantnog genotipa za bilo koji od dva polimorfizma bili mnogo brojniji, i činili su 69% grupe preživelih pacijenata, naspram 31% nosilaca referentnih genotipova za oba polimorfizma. Svega 15% preminulih pacijenata bili su nosioci referentnih genotipova za oba polimorfizma, a čak 85% bili su nosioci barem jednog varijantnog genotipa. Ova razlika u distribuciji pokazala se statistički značajnom –  $p < 0,05$ .

#### 4.6.1. Povezanost ispitivanih polimorfizama sa rizikom za mortalitet pacijenata obolelih od sKBP

U Tabelama 4.20 i 4.21 prikazana je povezanost ispitivanih polimorfizama *Nrf2*, *SOD2*, *GPXI* i *GSTPIABCD* i njihovih genotipova sa mortalitetom pacijenata obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima. Kroz različite modele *Cox* analize, nijedan od ispitivanih polimorfizama nije nosio značajno povećan rizik za nastanak smrtnog ishoda. Najviši stepen rizika ispoljen je kod pacijenata koji su nosioci barem jednog od varijantnih genotipova bilo za rs1695 bilo za rs1138272 *GSTPI* polimorfizme (unutar modela 1  $HR = 1,627$  za IP 95% = 0,664-3,986, a unutar modela 2  $HR = 3,897$  za IP 95% = 0,681-22,304) iako ni u prvom ni u drugom modelu analize nije dobijena statistička značajnost ( $p > 0,05$ ). Za ostala tri ispitivana polimorfizma opseg opasnosti pokazao se još niži nego za *GSTPI* polimorfizme.

**Tabela 4.20.** Povezanost ispitivanih polimorfizama i njihovih genotipova sa mortalitetom pacijenata obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, Model 1

<b>Model 1</b>	
<i>HR</i> (IP 95%)	<i>p</i>
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>Nrf2</i>-varijantnog<sup>c</sup> i <i>Nrf2</i>-referentnog<sup>d</sup> genotipa</b>	
1,030 (0,579 – 1,833)	0,919
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>SOD2</i>- varijantnog<sup>e</sup> i <i>SOD2</i>-referentnog<sup>f</sup> genotipa</b>	
1,290 (0,676 – 2,461)	0,440
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>GPXI</i>-varijantnog<sup>g</sup> i <i>GPXI</i>-referentnog<sup>h</sup> genotipa</b>	
0,737 (0,462 – 1,177)	0,201
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>GSTP1</i>-varijantnog<sup>i</sup> i <i>GSTP1</i>-referentnog<sup>j</sup> genotipa</b>	
1,627 (0,664 – 3,986)	0,287

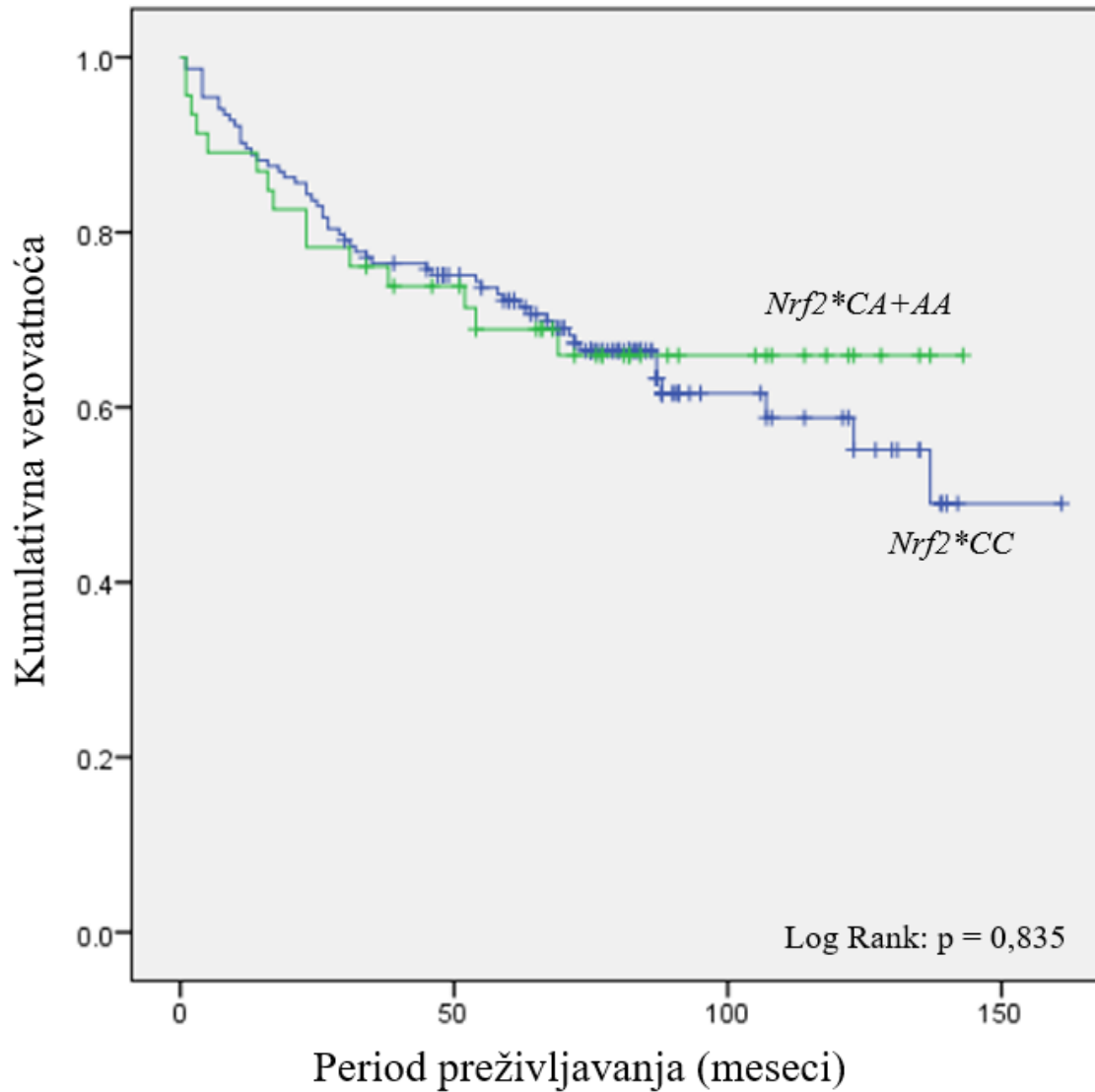
<sup>a</sup> Model 1 prilagođen u odnosu na starost i spol; <sup>c</sup> *Nrf2* varijantni genotip – C/A +A/A; <sup>d</sup> *Nrf2* referentni genotip – C/C; <sup>e</sup> *SOD2* varijantni genotip – Ala/Val + Val/Val; <sup>f</sup> *SOD2* referentni genotip – Ala/Ala; <sup>g</sup> *GPXI* varijantni genotip – Pro/Leu + Leu/Leu; <sup>h</sup> *GPXI* referentni genotip – Pro/Pro; <sup>i</sup> *GSTP1* varijantni genotip – kombinacija genotipova rs1695 i rs1138272 (*Ile/Val* + *Val/Val*) (*Ala/Val* + *Val/Val*); <sup>j</sup> *GSTP1* referentni genotip – kombinacija referentnih genotipova za rs1695 i rs1138272 (*Ile/Ile*) (*Ala/Ala*); HR, hazard ratio; IP, interval poverenja

**Tabela 4.21.** Povezanost ispitivanih polimorfizama i njihovih genotipova sa mortalitetom pacijenata obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, Model 2

<b>Model 2</b>	
<i>HR</i> (IP 95%)	<i>p</i>
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>Nrf2</i>-varijantnog<sup>c</sup> i <i>Nrf2</i>-referentnog<sup>d</sup> genotipa</b>	
1,104 (0,456 – 2,674)	0,826
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>SOD2</i>- varijantnog<sup>e</sup> i <i>SOD2</i>-referentnog<sup>f</sup> genotipa</b>	
1,687 (0,494 – 5,755)	0,404
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>GPXI</i>-varijantnog<sup>g</sup> i <i>GPXI</i>-referentnog<sup>h</sup> genotipa</b>	
1,388 (0,654 – 2,946)	0,393
<b>Rizik za sveukupni mortalitet među nosiocima <i>GSTP1</i>-varijantnog<sup>i</sup> i <i>GSTP1</i>-referentnog<sup>j</sup> genotipa</b>	
3,897 (0,681 – 22,304)	0,126

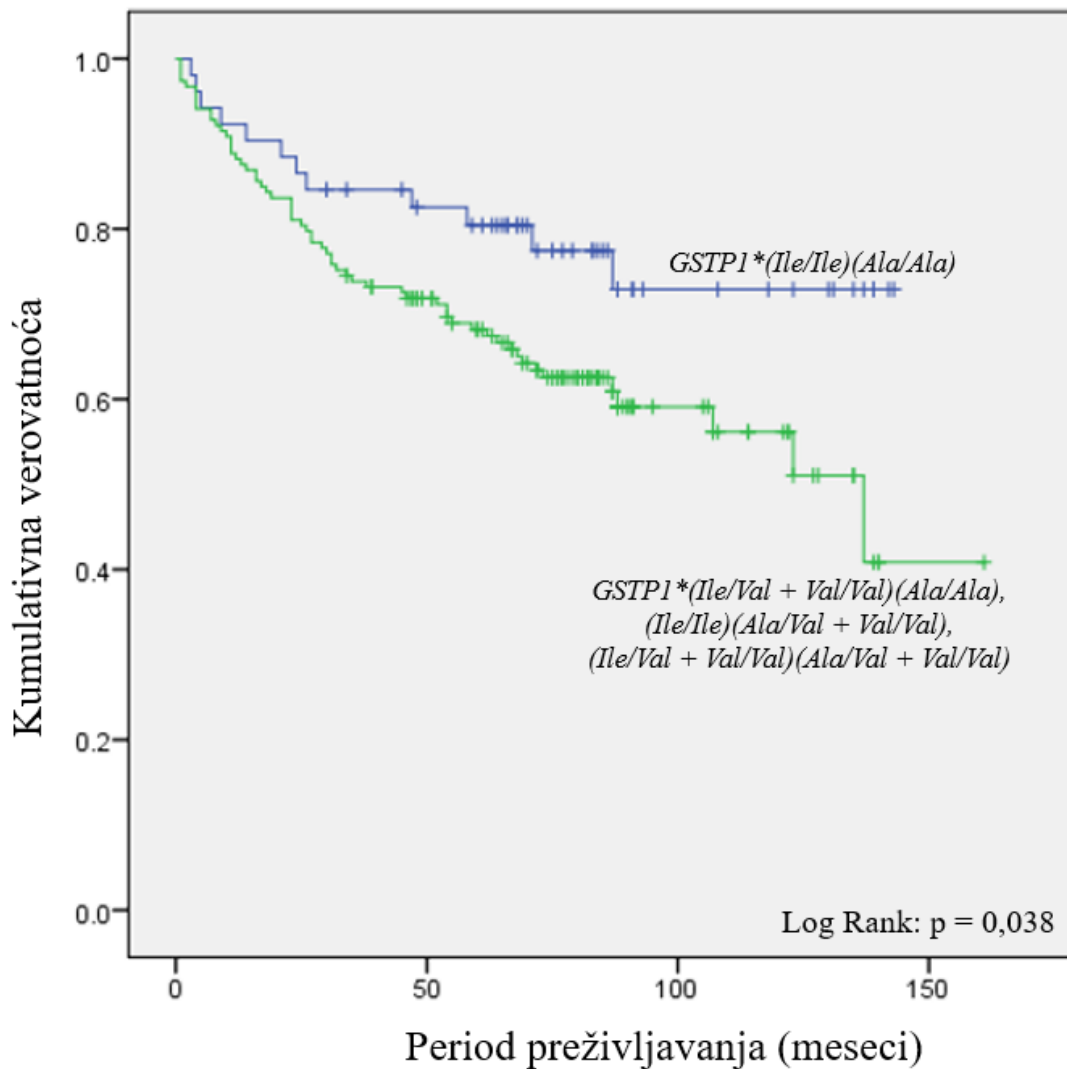
Model 2 je prilagođen u odnosu na varijable Model 1 i na faktore rizika za razvoja sKBP (paklo cigareta po godini, BMI, hipertenzija); <sup>c</sup> *Nrf2* varijantni genotip – C/A +A/A; <sup>d</sup> *Nrf2* referentni genotip – C/C; <sup>e</sup> *SOD2* varijantni genotip – Ala/Val + Val/Val; <sup>f</sup> *SOD2* referentni genotip – Ala/Ala; <sup>g</sup> *GPXI* varijantni genotip – Pro/Leu + Leu/Leu; <sup>h</sup> *GPXI* referentni genotip – Pro/Pro; <sup>i</sup> *GSTP1* varijantni genotip – kombinacija genotipova rs1695 i rs1138272 (*Ile/Val* + *Val/Val*) (*Ala/Val* + *Val/Val*); <sup>j</sup> *GSTP1* referentni genotip – kombinacija referentnih genotipova za rs1695 i rs1138272 (*Ile/Ile*) (*Ala/Ala*); HR, hazard ratio; IP, interval poverenja

U grafiku 4.13. prikazana je procena funkcije preživljavanja *Kaplan-Meier* za ispitivani rs6721961 polimorfizam *Nrf2*. Uočljivo je da je kumulativna verovatnoća preživljavanja ispitanika sa varijantnim genotipom *C/A* ili *A/A* viša u odnosu na ispitanike koji su nosioci referentnog *C/C* genotipa, iako ne postoji statistički značajna razlika (log-rank  $p > 0,05$ ).



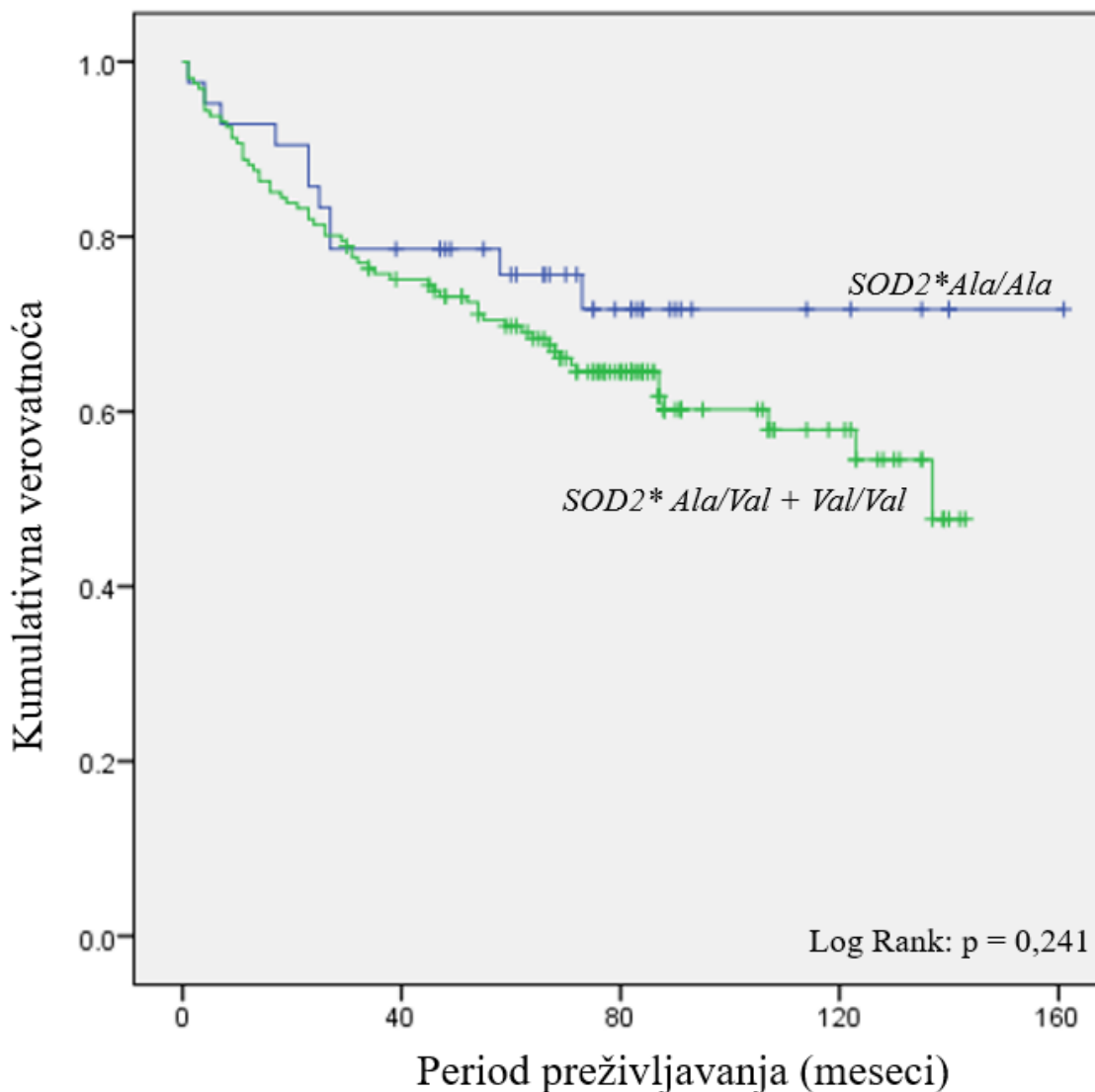
**Grafikon 4.13.** *Kaplan-Meier* kriva preživljavanja za ukupni mortalitet kod pacijenata sa sKBP koji su nosioci različitih *Nrf2* genotipova

Uticaj dva ispitivana polimorfizma za *GSTP1* (rs1695 i rs1138272) na preživljavanje pacijenata obolelih od sKBP posmatrana su u kombinaciji što je prikazano na Grafikonu 4.14. Pacijenti su podeljeni u dve grupe od kojih jednu čine osobe nosioci referentnih genotipova za oba ispitivana polimorfizma (*Ile/Ile* za rs1695 i *Ala/Ala* za rs1138272), a u drugoj grupi su nosioci varijantnih genotipova bilo za jedan, bilo za oba navedena polimorfizma. Kao što se jasno vidi, među ovim grupama postoji statistički značajna razlika u kumulativnoj verovatnoći preživljavanja u korist pacijenata koji su nosioci oba referentna genotipa. Nosioci varijantnog genotipa za jedan ili oba polimorfizma u kombinaciji, imali su sveukupno kraći period preživljavanja (log-rank  $p < 0,05$ ).



**Grafikon 4.14.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja za ukupni mortalitet kod pacijenata sa sKBP koji su nosioci različitih *GSTP1* genotipova za polimorfizme rs1695 i rs1138272 u kombinaciji, *GSTP1*\*referentni genotip – (*Ile/Ile*) (*Ala/Ala*), *GSTP1*\*varijantni genotip – (*Ile/Val + Val/Val*)(*Ala/Ala*), (*Ile/Ile*)(*Ala/Val + Val/Val*), (*Ile/Val + Val/Val*)(*Ala/Val + Val/Val*)

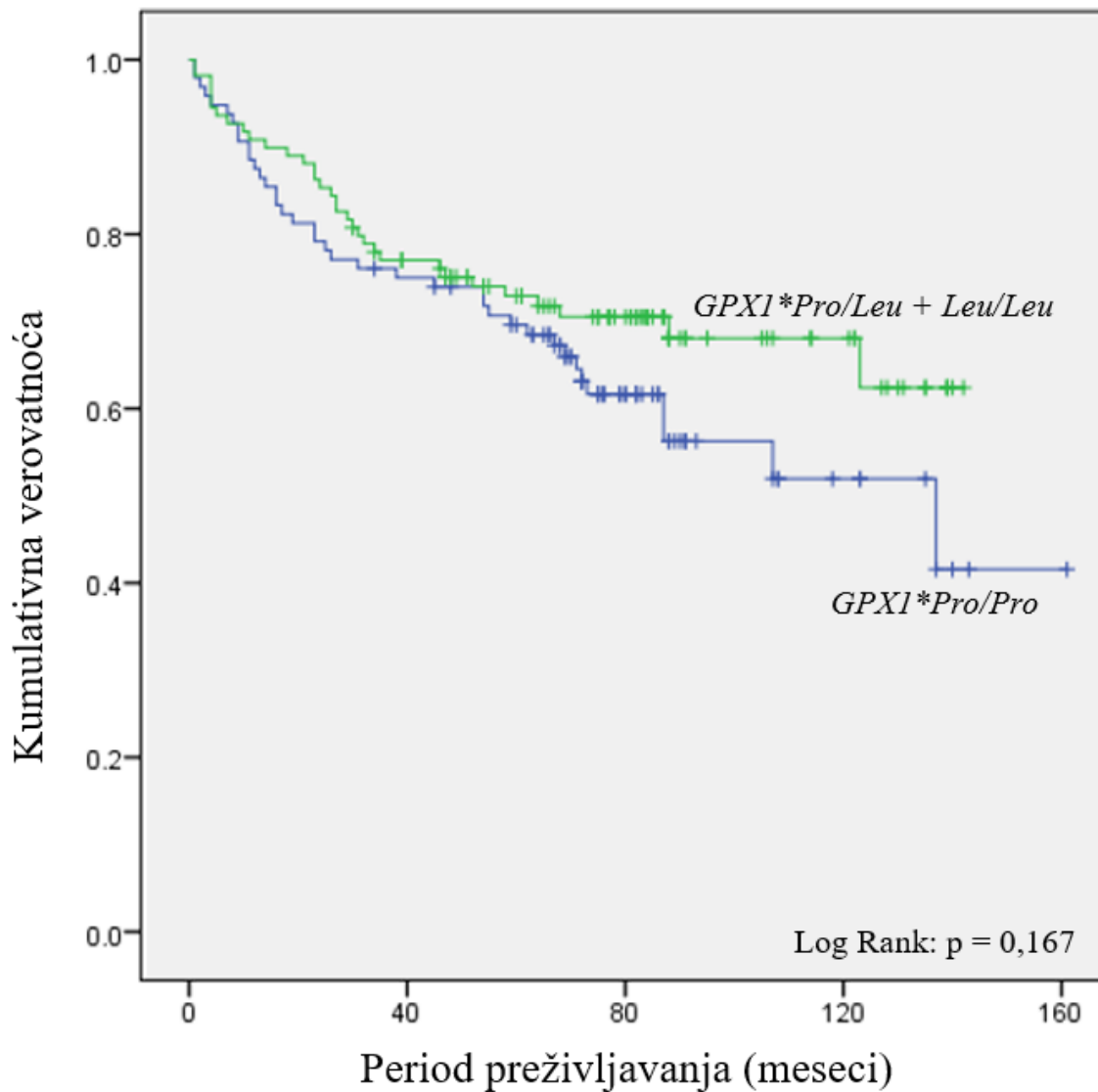
*Kaplan-Meier* verovatnoća preživljavanja za ispitivani *SOD2* polimorfizam prikazana je u Grafikonu 4.15. Iako bez statistički značajne razlike (log-rank  $p > 0,05$ ), kao i u slučaju *Nrf2* polimorfizma, pokazano je da je kumulativna verovatnoća preživljavanja ispitanika nosilaca referentnog *Ala/Ala* genotipa veća u odnosu na nosioce *Ala/Val* ili *Val/Val* genotipa, tako da ne samo da su nosioci varijantnih genotipa u većem riziku za nastanak sKBP, već ukoliko obole, potencijalno se može razmatrati da ovaj genotip nosi veću verovatnoću i za lošiji ishod.



**Grafikon 4.15.** *Kaplan-Meier* kriva preživljavanja za ukupni mortalitet kod pacijenata sa sKBP koji su nosioci različitih *SOD2* genotipova



Na kraju, kada je posmatran *GPXI* rs105450 polimorfizam i njegovi genotipovi, ne uočava se statistički značajan uticaj na kumulativnu verovatnoću preživljavanja (log-rank  $p > 0,05$ ), mada se u Grafikonu 4.16. vidi da su nosioci referentnog *Pro/Pro* genotipa imali nižu kumulativnu verovatnoću preživljavanja u odnosu na nosioce *Pro/Leu* i *Leu/Leu* genotipova.



**Grafikon 4.16.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja za ukupni mortalitet kod pacijenata sa sKBP koji su nosioci različitih *GPXI* genotipova

## 5. DISKUSIJA

Da bi bilo koji tumor nastao i širio se, potrebno je da dođe do čitavog niza genetskih, epigenetskih i somatskih mutacija koje izmenjenim ćelijama omogućavaju da se nekontrolisano umnožavaju uprkos postojanju inhibitornih faktora i nedovoljnoj količini hranljivih materija, da izbegnu imunski sistem i kontrolisanu ćelijsku smrt, a takođe i da invadiraju okolno tkivo a potom udaljeno metastaziraju [19]. Pored promena koje se odvijaju na nivou genetičkog materijala i molekula u ćeliji, ćelijsko okruženje u kojem se nalaze fibroblasti, endotelne ćelije, ćelije imunskog sistema, od izuzetnog je značaja za metastatski potencijal, a smatra se da je za razvoj rezistencije na hemioterapiju esencijalna stalna komunikacija malignih ćelija i strome [153,154]. Shvatanje uloge *Von Hippel Lindau* gena i uticaja hipoksije na kancerogenezu svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, doprinelo je razumevanju ovog maligniteta i razvoju terapijskih strategija za uznapredovale forme bolesti [95,155,156]. Danas je jasno da saznanja o genetskim i biohemijskim promenama u ćelijama sKBP čine ključ za dalji napredak u borbi protiv ove bolesti. Uz to, sve se više potencira da bi identifikacija molekularnih specifičnosti u perspektivi mogla da pomogne u prepoznavanju i izdvajanju osoba koje su više podložne za nastanak bolesti, kao i pacijenata sa sKBP koji će imati lošiji i komplikovaniji tok bolesti [128,157–159]. S obzirom na to da određena metabolička reprogramiranja karakterišu različite stadijume razvoja maligniteta [126], odabir terapije bi u budućnosti mogao biti značajno usavršen sticanjem saznanja o biomolekularnim karakteristikama određenog tumora.

Više od decenije unazad, istraživački timovi širom sveta sprovode ispitivanja kako bi pronašli prognostičke markere svetloćelijskog KBP sa ciljem da se na vreme prepoznaju oboleli sa većim rizikom za lošiji ishod bolesti. Razvoj tehnologije omogućava da se analizira skoro celi genetski transkriptom i ispita kakav je značaj pojedinačnih varijacija u nastanku sKBP [160]. Najviše pažnje posvećuje se upravo markerima povezanim sa ćelijskim ciklusom, angiogenezom, imunskim odgovorom, hipoksijom i narušenom redoks homeostazom [160]. Za dalju individualizaciju pristupa pacijentu neophodno je još preciznije znanje o genomskim karakteristikama pacijenata obolelih od sKBP [161].

Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida u genetici su odabrani za mapiranje složenih genetičkih varijacija, jer većina SNP-ova lokalizovanih u kodirajućim ili regulatornim regionima gena ima funkcionalni značaj i može se analizirati povezanost samih varijanti i ispoljenih fenotipova [162]. Iako još uvek nije do kraja neosporno potvrđen negativan efekat SNP-ova gena za transkripcione faktore i antioksidantne enzime na kancerogenezu sKBP, jasno je da različite genske varijante menjaju rizik za nastanak i napredovanje ovog maligniteta.

Ovo istraživanje, po prvi put u literaturi, ispituje uticaj genskih polimorfizama *Nrf2* (rs6721961), *SOD2* (rs4880), *GPXI* (rs1050450) kao i *GSTP1* (rs1695, rs1138272), individualno i u međusobnoj kombinaciji, na rizik za nastanak svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima. Kao enzimi uključeni u različite stepene detoksikacije kiseoničnih radikala, njihova uzajamna genetička povezanost mogla bi biti u osnovi narušavanja redoks homeostaze, za koju je poznato da je od izuzetnog značaja za kancerogenezu sKBP.

Posmatrajući osnovne karakteristike grupe ispitanika i kontrolne grupe u ovom istraživanju, nije zabeležena značajna razlika po pitanju distribucije gojaznih osoba i osoba normalnog indeksa telesne mase, iako se povećan indeks telesne mase izdvaja kao faktor rizika za nastanak sKBP [88]. Slično, distribucija osoba koje imaju pušačke navike i onih koje nisu pušači među grupom pacijenata i kontrolnom grupom, takođe nije uticala na promenu rizika za razvoj tumora, kao ni količina konzumiranih cigareta po godini. Povišene vrednosti arterijskog pritiska

su i ranije ispitivan i dokazan faktor rizika za nastanak ove maligne bolesti [113], pa su tako i u našoj grupi ispitanika osobe sa povišenim krvnim pritiskom bile u skoro 2,5 puta većem riziku za razvoj oboljenja što je bilo od statističkog značaja.

Kada je u pitanju rizik koji sa sobom nose nosioci određenih genotipova, iz rezultata ovog istraživanja se može videti da su u povećanom riziku bile osobe nosioci varijantnih genotipova *Ala/Val* i *Val/Val* za *SOD2* rs4880, kao i kombinacije varijantnog i referentnog genotipa za *GSTP1* polimorfizme rs1695 i rs1138272 (*Ile/Val* i *Val/Val* za rs1695 zajedno sa *Ala/Ala* za rs1138272) u odnosu na nosioce referentnih genotipova za oba SNP-a. Rizik za razvoj sKBP značajno je potenciran i u kombinaciji varijantnih genotipova za *SOD2* i za *GSPT1* rs1695. Analizom haplotipa za rs1695 i rs1138272 *GSTP1*, zabeležen je izražen rizik za razvoj ovog tumora među nosiocima varijantnih formi oba polimorfizma. Nasuprot ovim polimorfizmima, nosioci varijantnih genotipova za *GPXI* rs1050450 imali su umanjjen rizik za nastanak sKBP u odnosu na referentni genotip što se pokazalo kao statistički značajno. Na kraju, nije pronađena značajna razlika u distribuciji genotipova za *Nrf2* polimorfizam rs6721961.

Analizom povezanosti kombinacija ispitivanih genotipova i prepoznatih faktora rizika za nastanak sKBP, čak 12 puta bio je povećan rizik među osobama koje imaju povišen arterijski pritisak a nosioci su *Ala/Val* ili *Val/Val* genotipa za rs4880 *SOD2*, u odnosu na normotenzivne nosioce homozigote za referentni *Ala/Ala* genotip. Rizik je potenciran i do 9 puta ukoliko su osobe sa hipertenzijom bile nosioci varijantnih genotipova (*Ile/Val* i *Val/Val*) za rs1695 a referentnog (*Ala/Ala*) genotipa za rs1138272 *GSTP1*. Za iste genotipove statistički značajno povećan rizik je ukoliko su te osobe imale povišen indeks telesne mase ili ukoliko su bile pušači, iako ne toliko upečatljivo koliko u slučaju hipertenzije.

Statistički značajan uticaj ispitivanih genotipa na preživljavanje obolelih od svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, pronađen je jedino u slučaju kombinacije rs1695 i rs1138272 *GSTP1* genotipova. Osobe koje su nosioci bilo koje od kombinacija – (*Ile/Val* + *Val/Val*)(*Ala/Ala*), (*Ile/Ile*)(*Ala/Val* + *Val/Val*), (*Ile/Val* + *Val/Val*)(*Ala/Val* + *Val/Val*), imale su kraći period preživljavanja u odnosu na referentne homozigote i za rs1695 i rs1138272 genotip. Različitim modelima ispitivanja rizika za nastanak smrtnog ishoda u zavisnosti od prisustva različitih alela, nije pronađena statistički značajan rizik ni za jedan ciljnih genotipova.

Nedostatak funkcionalnog *Nrf2* kao transkripcionog faktora, umanjuje mogućnost bilo kog tkiva da reaguje i štiti se u slučaju nastanka oksidativnog stresa [163]. Ovo je posledica izostajanja njegove funkcije u regulaciji ekspresije gena za enzime koje učestvuju u antioksidativnoj zaštiti, poput glutation S-transferaza, katalaza, superoksid dizmutaza [35]. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida rs6721961 za gen koji kodira *Nrf2*, nalazi se u okviru ushodnog promotornog regiona samog gena, u sredini ARE motiva, tako da izmenjenost ove sekvence potencijalno menja afinitet *Nrf2* faktora da se veže za ARE i time omogući aktivaciju kaskadnog odgovora ako se naruši redoks homeostaza [164]. Smatra se da ovaj SNP modifikuje i mogućnost da već aktiviran *Nrf2* reguliše dalju ekspresiju sopstvenog gena i time kontroliše sopstvenu dalju sintezu [164].

Dosadašnja istraživanja govore u prilog povezanosti polimorfizma rs6721961 sa razvojem oboljenja koja u osnovi imaju oksidativni stres. Pronađena je veza između ovog polimorfizma i rizika za razvoj povišenog arterijskog pritiska, kao i za razvoj preeklampsije kod trudnica [152,165,166]. U slučaju karcinoma dojke, ovaj genotip nosi veći rizik za razvoj tumora [167], dok su nosioci varijantnog *A/A* genotipa imali lošiji ishod među obolelima od sitnoćelijskog karcinoma pluća [164]. Smatra se da bi polimorfizam rs6721961 mogao biti razmotren kao prognostički biomarker među pacijentima sa adenokarcinomom pluća [168]. Kada su u pitanju tumori urogenitalnog sistema, *Reszka* i sar. nisu zabeležili značajan uticaj *Nrf2* polimorfizma

rs6721961 na rizik za nastanak karcinoma mokraćne bešike [143]. Takođe, *Dokić* i sar. nisu uočili značajnu razliku u riziku za nastanak karcinoma prostate u zavisnosti od genotipa ovog polimorfizma [169]. Ne postoje istraživanja koja ispituju uticaj -617C/A polimorfizma na rizik za inicijalni razvoj sKBP i ovo je prvo istraživanje koje to proučava. Naši rezultati nisu pokazali značajnu razliku u distribuciji genotipova među pacijentima i pripadnicima kontrolne grupe. U kombinaciji sa gojaznošću i pušačkim navikama kao faktorima rizika, osobe nosioci određenih *Nrf2* genotipova nisu bile izložene statistički značajno većem riziku. Ali zato, hipertenzivni nosioci referentnog C/C genotipa imali su skoro 2,5 puta veći rizik za nastanak ovog tumora u odnosu na normotenzivne ispitanike nosioce referentne homozigote što jeste bilo statistički značajno.

U literaturi postoji neusaglašenost da li nosioci varijantnih C/A i A/A genotipova rs6721961 *Nrf2* imaju smanjenu ili pak povećanu ekspresiju ovog faktora u odnosu na referentni C/C genotip. Naime, *Suzuki* i sar. pokazali su da među obolelima od sitnoćelijskog karcinoma pluća, unutar tumorskog tkiva pacijenata sa A/A genotipom postoji smanjen nivo mRNK što doprinosi slabijoj aktivnosti ovog transkripcionog faktora [164]. Nasuprot njihovim rezultatima, u slučajevima metastatskih formi svetloćelijskog KBP, *Yamaguchi* i sar. su na uzorku od 50 pacijenata uočili da nosioci varijantnih genotipova imaju povećanu ekspresiju *Nrf2* [142]. Takođe, *Yuki* i sar. su analizirajući 89 ispitanika sa karcinomom bubrežnog parenhima, zabeležili da je povećana ekspresija *Nrf2* povezana sa varijantnim genotipom, a u kliničkom kontekstu, sa kraćim periodom preživljavanja nakon nefrektomije pacijenata obolelih od sKBP [170]. U našem uzorku koji obuhvata 223 obolelih od sKBP, praćenjem i analizom preživljavanja nakon učinjene nefrektomije, iako bez statističke značajnosti, zabeleženo je da su pacijenti nosioci referentnog C/C genotipa imali kraći period preživljavanja u odnosu na nosioce C/A ili A/A genotipova. Za očekivati je da će uvećanje ispitivanog uzorka uz kvantitativnu analizu ekspresije *Nrf2* pronaći pravi odgovor da li su referentni ili varijantni genotip odgovorni za smanjenu ili povećanu ekspresiju, odnosno povezani sa skraćanjem perioda preživljavanja pacijenata obolelih od sKBP.

Vezivanjem za ARE sekvence DNK, *Nrf2* kontroliše ekspresiju većeg broja antioksidantnih enzima, među kojima su glutation S-transferaze. Zbog toga, želeli smo da ispitamo uticaj i najznačajnijih genetskih polimorfizama za *GSTP1* na razvoj i progresiju sKBP.

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida rs1695 *GSTP1* ispitivan je za veći broj maligniteta, poput karcinoma usne duplje, jednjaka, uroepitelijalnih tumora, karcinoma prostate [148,171–177]. Dosadašnjim ispitivanjima nije pronađena veza između rs1695 i rizika za nastanak karcinoma usne duplje i ezofegaelnog karcinoma [148,176]. Pojedinačne studije ukazale su na povećan rizik za nastanak karcinoma dojke među homozigotnim nosiocima *Val/Val* genotipa, dok je meta analizom postalo jasno da ovaj polimorfizam utiče na podložnost obolevanju od ovog tumora samo među pripadnicama azijske populacije, koje su nosioci varijantnog genotipa [174,175]. *Stoehlmacher* i saradnici, ispitivanjem uticaja polimorfizma rs1695 na dužinu preživljavanja pacijenata sa karcinomom kolona, pronašli su da nosioci *Val/Val* genotipa imaju duži period preživljavanja u odnosu na pacijente bilo sa *Ile/Ile* bilo *Ile/Val* genotipom [178]. Sa druge strane, povezanost između ovog polimorfizma i karcinoma mokraćne bešike nije uočena u pojedinačnim ispitivanjima, ali je zato meta analizom 34 studije ta veza ipak potvrđena, takođe za varijantni genotip [172,173]. Kada je u pitanju karcinom bubrežnog parenhima, slično kao za karcinom dojke, pojedinačne studije govore o povećanom riziku među nosiocima varijantnog genotipa ovog SNP-a [179], dok meta analize nisu pokazale značajnu povezanost između *GSTP1* rs1695 polimorfizma i rizika za nastanak ovog karcinoma [136,180].

Isto tako, polimorfizam za *GSTP1* rs1138272 pobuđuje pažnju i često se ispituje njegov uticaj na bolesti povezane sa oksidativnim stresom. *Pavlovic* i saradnici opisali su da nosioci

varijantnih genotipova *Ala/Val* i *Val/Val* imaju oko 3,5 puta veći rizik za nastanak dijabetes melitusa tip 2 [181]. *Ding* i saradnici su sveobuhvatnim proučavanjem povezanosti genotipova ovog polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma među različitim etničkim populacijama, ukazali da je varijantni *Val/Val* genotip povezan za većom podložnošću za nastanak karcinoma među azijskom i afričkom populacijom, a da su pripadnici bele populacije nosioci ovog genotipa posebno skloni nastanku kolorektalnog karcinoma i karcinoma glave i vrata [145]. Takođe, pretpostavili su da heterozigotni *Ala/Val* genotip najviše povećava podložnost za razvoj karcinoma pluća među belom populacijom [145]. Žene homozigoti za *Val/Val* genotip mogu imati čak tri puta veći rizik za razvoj karcinoma dojke [175]. Dodatno, prilikom analize distribucije ovog polimorfizma među pacijentima obolelim od planocelularnog karcinoma usne duplje, *Singh* i sar. pronašli su da je varijantni *Val/Val* genotip je oko 4 puta zastupljeniji [77]. Kada je reč o malignim oboljenjima urinarnog sistema, nosioci varijantnih *Ala/Val* i *Val/Val* genotipova su u skoro pet puta većem riziku za nastanak karcinoma prostate [177].

Usled lokalizacije blizine polimorfizama rs1695 i rs1138272 *GSTP1*, distribucija njihovih varijantnih i referentnih genotipova može se posmatrati u kombinaciji. Naime, čak 3 puta većem riziku izložene su osobe koje su istovremeno nosioci varijantnog genotipa za rs1695, a referentnog genotipa za rs1138272 što se pokazalo kao statistički značajan rizik. Dodatno, analiza haplotipa kao kombinacije alela na jednom hromozomu (naziv potiče od *Haploid Genotip*) izvršena je kako bi se ispitao rizik za razvoj ovog karcinoma u zavisnosti od toga u kojim kombinacijama na hromozomu aleli postoje. Definisana su četiri haplotipa *GSTP1 - ABCD*. *Maniglia* i sar. su ispitivanjem ovog haplotipa u slučaju skvamocelularnog karcinoma glave i vrata, pronašli značajno veću razliku u učestalosti kombinacija *GSTPIA* i *GSTPID* među obolelima nego u kontrolnoj grupi [182]. *Santric* i sar. navode da kombinacija *GSTPIC* sa sobom nosi skoro 5,5 puta veći rizik za razvoj karcinoma prostate [177]. Među našim ispitanicima, kombinacija *GSTPIC* dovodi do 3,5 puta većeg rizik za razvoj svetloćelijskog KBP u odnosu na osobe nosioce *GSTPIA*. Literatura opisuje da supstitucija alanina valinom na poziciji 114 potencira efekat supstitucije izoleucina valinom na mestu 105 [54], i da se ovaj haplotip može posmatrati kao izraženiji inhibitor c-Jun N-terminalne kinaze 1 u odnosu na referentni haplotip [146].

Pi klasa glutation S-transferaza već je prepoznata kao inhibitor c-Jun-N-terminalne kinaze (JNK). Smatra se da pomoću ovog efekta ostvaruje svoje anti-apoptotsko dejstvo [183]. Kada se posmatra ekspresija *GSTP1* proteina unutar tumorskih tkiva, beleži se postepen porast njegove ekspresije, a takođe i manji nivo aktivnosti JNK1/2 u tumorskim tkivima u odnosu na zdravo tkivo bubrega [139]. Takođe, ekspresija egzekutornog molekula, kaspaze-3, koja ćeliju i dovodi do apoptoze, značajno je slabije eksprimirana u tumorskim tkivima u odnosu na netumorsko tkivo. Na kraju, unutar tumorskih tkiva sKBP može da se registruje *GSTP1:JNK1/2* protein:protein kompleks [139]. Osim u tkivu sKBP, ovaj kompleks pronađen je i u uzorcima karcinoma mokraćne bešike, karcinoma jetre, neuroblastoma [184]. U saglasnosti sa pretpostavkom da su varijantni genotipovi rs1695 i rs1138272 potentniji inhibitori JNK, jesu i naši rezultati da su nosioci varijantnih genotipova imali manju kumulativnu verovatnoću preživljanja po učinjenoj nefrektomiji u odnosu na nosioce referentnog genotipa.

Među superfamilijom glutation S-transferaza, Pi klasa nije izolovan slučaj u pogledu mogućnosti interakcije sa molekulima koji su deo ćelijske putanje aktivacije apoptoze. Upravo su ispitivanjem protein:proteinskih interakcija u tkivu svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, *Coric* i saradnici po prvi put potvrdili postojanje *GSTM1:ASK1-1* kompleksa [179]. Kinaza 1 uključena u signalnu regulaciju apoptoze (engl. *Apoptosis signal-regulating kinase 1*, ASK1), ima sposobnost aktivacije osovine c-Jun-N-terminalne kinaza/stresom aktivirana protein

kinaza, kao i p38 putanju [185]. U slučaju umanjene ekspresije GSTM1 proteina, ASK1 ima pojačanu aktivnost jer izostaje stvaranje GSTM1:ASK1-1 kompleksa koji inhibira ASK1, tako da je unutar tumora izraženija apoptotska aktivnost, dok u slučaju pojačane ekspresije GSTM1, tumorsko tkivo izraženije ploriferiše što dovodi progresije i lošije prognoze među pacijentima KBP [179].

Kao jedan od prvih enzima koji učestvuje u reakcijama detoksikacije superoksid anjona i katalizaciji stvaranja vodonik peroksida, od samog početka ispitivanja kako redoks homeostaza utiče na nastanak različitih bolesti, superoksid dizmutaze zauzele su centralno mesto u istraživanjima. Značaj koji ovi katalizatori imaju u ispitivanjima za sve oksidativne bolesti, i dalje je vrlo očigledan i interesovanje vremenom ne slabi. Od tri klase koje postoje, druga je najčešće proučavana kao mitohondrijalna SOD neophodna za život u aerobnim uslovima.

Kao i prethodno analizirani enzimi i genske sekvence koje ih kodiraju, tako i gen za SOD2 ima svoje polimorfizme pojedinačnog nukleotida. Među njima je najviše proučavan SNP rs4880 koji dovodi do zamene alanina valinom u krajnjem amino-kiselinskom lancu [150]. Ova promena onemogućava transport sintetisanog proteina u mitohondrijalni citosol i tako „zaglavljen“ enzim postepeno biva razgrađen [150], što slabi sposobnost mitohondrija da se štite od nastalog superoksid anjona.

*Jones* i saradnici pronašli su povezanost između varijantnog *Val/Val* genotipa rs4880 i postojanja 2 puta većeg rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja među ženama, dok među muškarcima nije pronađen povećan rizik [186]. Takođe, među ženama je *Val/Val* genotip bio povezan sa povećanim stepenom oksidativnog stresa unutar plazme [186]. Sa druge strane, *Yari* i sar. nisu pronašli povezanost između ovog polimorfizma i rizika za nastanak oštećenja koronarnih arterija u iranskoj populaciji [187]. Istraživanja koncentrisana na četiri najčešća polimorfizma *SOD2*, među kojima je i rs4880, pronašla su povezanost između prisustva različitih genotipova i rizika za razvoj Alchajmerove bolesti [188].

Kako je oksidativni stres zajedno sa inflamacijom od izuzetnog značaja za progresiju hronične bolesti bubrega, *Jerotic* i sar. ispitivali su vezu između polimorfizma *SOD2* i rizika za nastanak terminalnog stadijuma bolesti bubrega. Pronašli su da su nosioci *Val/Val* genotipa bili u dva puta većem riziku za progresiju bolesti ka terminalnoj fazi u odnosu na nosioce referentnog, *Ala/Ala* genotipa [189]. Dodatno, *Dragicevic* i saradnici zabeležili su da su osobe homozigotni nosioci varijantnog genotipa u oko 2,5 puta većem riziku za razvoj balkanske endemske nefropatije u odnosu na nosioce referentnog genotipa [190].

Među onkološkim pacijentima, polimorfizam rs4880 ispitivan je kao biomarker za karcinom dojke, pluća, kolona, prostate [169,191,192]. Iako su pojedinačna ispitivanja govorila u prilog povećanom riziku za nastanak karcinoma dojke među ženama nosiocima varijantnih genotipova, meta-analizom u koju je bilo uključeno 17 studija slučajeva i kontrola, povezanost između ovog polimorfizma i karcinoma dojke nije pronađen [192]. Slično kao za karcinom dojke, iako su *Meplan* i sar. uočili da su nosioci bilo *Ala/Val* bilo *Val/Val* genotipa u više od tri puta većem riziku za kolorektalni karcinom [193], promenjen rizik u zavisnosti od zastupljenog genotipa nije potvrđen meta-analizama [194,195]. Međutim, prilikom ispitivanja nivoa proteina unutar tumorskog tkiva kolona, *Miar* i saradnici zabeležili su povećan nivo ekspresije *SOD2*, i da u slučajevima metastatske forme bolesti ovaj enzim dostiže najviši stepen aktivnosti [191], što bi govorilo u prilog činjenici da ovaj enzim i njegova aktivnost imaju ulogu u progresiji kolorektalnog karcinoma. U slučaju karcinoma pluća, ukazano je na to da su *Ala/Ala* i *Ala/Val* genotipovi povezani sa naprednim stadijumom tumora i sa razvijenom metastatskom formom

bolesti [196]. Kao i za kolorektalni karcinom, i u metastazama karcinoma pluća, stepen aktivnosti SOD2 je značajno veći [191].

Kada su u pitanju karcinomi urinarnog sistema, *Djokic* i saradnici primetili su skoro 2 puta veći rizik za nastanak karcinoma prostate kod nosilaca referentnog *Ala/Ala* genotipa, ili *Ala/Val* heterozigota, u odnosu na nosioce *Val/Val* genotipa [169], dok *Nikic* i sar. nisu zabeležili statistički značajnu razliku u distribuciji ovih genotipova među obolelima od karcinoma mokraćne bešike u odnosu na pripadnike kontrolne grupe [197]. Našim istraživanjem pokazano je da u slučaju svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima, varijantni *Val* genotip rs4880 nosi sa sobom 4,5 puta veći rizik za razvoj ovog tumora. Rizik se povećava i do 12 puta za osobe koje imaju povišen arterijski pritisak a nosioci su *Ala/Val* ili *Val/Val* genotipa. Interesantno je da su pacijenti oboleli od sKBP, imali kraći period preživljavanja ukoliko su bili nosioci varijantnih genotipova, iako ovaj rezultat nije bio statistički značajan. Pretpostavlja se da pacijenti koji imaju veću ekspresiju SOD2 imaju sklonost ka razvoju agresivnijih formi KBP i da bi za ove pacijente pravi izbor terapije morao biti usmeren ka hemioterapeuticima koji inhibišu mitohondrijalnu aktivnost i vode ćeliju ka indukovanoj smrti zbog uslova u kojima postoji nedostatak glukoze, poput etomoksira i buformina [198].

Po sintezi vodonik peroksida, glutathion peroksidaze katalizuju reakciju neutralizacije ovog prekursora kiseoničnih radikala, tako da rezultat reakcije jeste stvaranje molekula vode. Zahvaljujući glutathion peroksidazama, u ćelijama se vrlo brzo i efikasno uklanja vodonik peroksid. Prvi izoenzim, GPX1, najviše je eksprimiran u citosolu i u mitohondrijama, a ekspresija njegovog gena pod uticajem je koncentracije dostupnog kiseonika [69]. Najviše je ispitivan polimorfizam rs1050450 usled čije zamene citozina timinom dolazi do promene prolina leucinom na mestu 200. Rezultat promene je narušena konformacija enzima i onemogućavanje stvaranja posebnog zavoja, petlje, pri sekundarnoj strukturi što posledično menja aktivnost GPX1 [151].

Danska studija koja je ispitivala uticaj polimorfizma rs1050450 *GPX1* na dugovečnost, pokazala je da su osobe nosioci *Pro/Leu* i *Leu/Leu* genotipa sveukupno imale manji mortalitet u odnosu na osobe koje su imale *Pro/Pro* genotip [199]. Naizgled kontradiktorno, *Tang* i saradnici pronašli su dva puta veći rizik za nastanak oboljenja koronarnih arterija među osobama koje su nosioci *Pro/Leu* ili *Leu/Leu* genotipa [200], dok *Yeh* i sar. ovu povezanost među svojim ispitanicima nisu zabeležili [201]. Kao i za prethodno ispitivane polimorfizme, moguće je da etnička pripadnost značajno modifikuje uticaj polimorfizma. Kada je ispitivan rizik za progresiju hronične bubrežne bolesti ka terminalnoj fazi, nosioci *Leu/Leu* genotipa nosili su 3 puta veći rizik za lošiji ishod [189]. Slično, trudne ispitanice nosioci varijantnih genotipova u poređenju sa referentnim homozigotima, imale su 1,7 puta veći rizik za razvoj preeklampsije [202].

Meta analizom ovaj polimorfizam se pokazao kao značajan faktor koji doprinosi riziku za nastanak onkoloških oboljenja [203,204]. Kao rizičan genotip posmatran je varijantni *Leu* alel, tako da je veći rizik prepoznat među heterozigotima i homozigotima za *Leu* [203]. Sa druge strane, *Meplan* i sar. uočili su da je *Leu* alel povezan sa smanjenim rizikom za nastanak kolorektalnog karcinoma [193]. Meta analizom izdvojeno je da su nosioci *Leu/Leu* genotipa bili u čak 3,5 puta većem riziku za razvoj karcinoma mokraćne bešike u odnosu na nosioce barem jednog referentnog alela [204,205], ali nasuprot njima, *Nikic* i sar. nisu pronašli značajnu razliku među ispitanicima u slučajevima metastatskih formi karcinoma mokraćne bešike [197]. Slično kao za kolorektalni karcinom, i u našoj studiji za svetloćelijski karcinom bubrežnog parenhima, *Pro/Leu* i *Leu/Leu* genotipovi pokazali su da je rizik za razvoj ovog karcinoma umanjen u odnosu na referentni genotip. I mada bez statističke razlike, nosioci barem jednog varijantnog alela imali su kraći period preživljavanja. Za sada je ovo teško objasniti, ali moguće je da će rasvetljavanje uloge vodonik

peroksida u prenosu ćelijskih signala i regulaciji ekspresije gena koji učestvuju u preživljavanju ćelije, doneti odgovor i za to na koji način GPX1 modifikuje rizik za nastanak sKBP.

Dugogodišnjim ispitivanjima karcinoma bubrežnog parenhima, prepoznato je da je ovo veoma heterogen malignitet u smislu intratumorskih i intertumorskih genetskih varijanti. Svetloćelijski KBP posmatran zasebno, može se posmatrati kao metaboličko oboljenje kome promene u genetskom, epigenetskom i proteomičkom profilu čine osnovu za izmenu fenotipa ćelija, njihovu konverziju u ćelije sa onkogenim potencijalom, nastanak maligniteta i konačno njegovu progresiju. Doprinosi faktori mogu se pronaći u svim koracima kontrole redoks homeostaze, ćelijskog ciklusa, preživljavanja i programirane smrti, počev od gubitka funkcije *von Hippel Lindau* proteina, preko izmena u aktivnosti transkripcionog faktora Nrf2, sve do prilagođavanja na novonastale uslove modifikacijom aktivnosti enzima koji učestvuju u antioksidantnoj zaštiti, poput superoksid dizmutaza, glutation peroksidaza i glutation S-transferaza. Postojeće genske varijante koje utiču na ekspresiju proteina koje kodiraju i samim tim na aktivnost ćelijskih signalnih puteva, dovode do izražaja ne samo različitosti među tumorskim tkivima, već i među samim pacijentima. Ovim ispitivanjem po prvi put je ispitana uloga polimorfizama pojedinačnih nukleotida za gene koji kodiraju transkripcioni faktor Nrf2, enzime uključene u antioksidantne procese – SOD2 i GPX1, kao i haplotip *GSTP1ABCD*, u patofiziologiji nastanka i razvoja sKBP. Mogućnosti epigenetike i proteomike, kao i istraživanja na velikom broju ispitanika, u budućnosti mogu doneti još odgovora i razrešenje pitanja koja bi omogućila razvoj dijagnostičkih metodologija, kao i ciljane i personalizovane terapije za obolele od sKBP, čemu se moderna medicina svakodnevno bliži.



## 6. ZAKLJUČCI

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

- Pokazano je da prisustvo povišenih vrednosti arterijskog pritiska predstavlja nezavisni faktor rizika za razvoj svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima.
  - Osobe sa povišenim arterijskim pritiskom imale su 2,45 puta veći rizik za nastanak sKBP u odnosu na osobe koje nisu hipertenzivne;
- Uočena je statistički značajna povezanost varijantnih genotipova *SOD2* polimorfizma rs4880, koji dovode do smanjene antioksidantne aktivnosti *SOD2* unutar mitohondrija, sa rizikom za nastanak sKBP.
  - Osobe nosioci varijantnih genotipova *Ala/Val* i *Val/Val SOD2* rs4880 polimorfizma bile su 4,5 puta većem riziku za nastanak sKBP u odnosu na homozigotne nosioce referentnog *Ala/Ala* genotipa;
- Analizom distribucije *GPX1* polimorfizma rs1050450, usled kog nastaju promene u konformaciji enzima i samim tim njegovoj aktivnosti, primećeno je da su nosioci varijantnih genotipova imali umanjn rizik za nastanak sKBP.
  - Osobe nosioci varijantnih genotipova *Pro/Leu* i *Leu/Leu GPX1* rs1050450 polimorfizma imale su 2 puta umanjn rizik za nastanak sKBP u odnosu na homozigotne nosioce referentnog *Pro/Pro* genotipa;
- Kombinacija varijantnih genotipova *GSTP1* rs1695 i referentnog genotipa *GSTP1* rs1138272, pokazala se kao nezavisni faktor rizika za nastanak sKBP.
  - Osobe nosioci varijantnih genotipova *Ile/Val* i *Val/Val GSTP1* rs1695 polimorfizma, koje su istovremeno nosioci referentnog genotipa *Ala/Ala GSTP1* rs1138272, bile su u 3,2 puta većem riziku za nastanak sKBP u odnosu na nosioce oba referentna genotipa;
  - Analizom haplotipa *GSTPIABCD* pokazano je da su u 3,5 puta većem riziku osobe nosioci *Val105* i *Val114* genotipa u odnosu na nosioce referentne kombinacije *Ile105* i *Ala114*, što bi moglo biti rezultat izraženije inhibicije c-Jun N-terminalne kinaze 1;
- Određene kombinacije ispitivanih genotipova doprinosile su povećanju rizika za nastanak sKBP.
  - Osobe koje su nosioci referentnog *C/C* genotipa *Nrf2* rs6721961 i varijantnih genotipova *Ala/Val* i *Val/Val SOD2* rs4880 polimorfizma imaju 3,2 puta veći rizik za razvoj ovog tumora u odnosu na nosioce oba referentna genotipa;
  - Osobe koje su nosioci referentnog *C/C* genotipa *Nrf2* rs6721961 i varijantnih genotipova *Ile/Val* i *Val/Val GSTP1* rs1695 polimorfizma imaju 3,2 puta veći rizik za razvoj ovog tumora u odnosu na nosioce oba referentna genotipa;
  - Osobe koje su nosioci varijantnih genotipova *Ala/Val* i *Val/Val SOD2* rs4880 polimorfizma i varijantnih genotipova *Ile/Val* i *Val/Val GSTP1* rs1695 polimorfizma imaju 19,7 puta veći rizik za razvoj sKBP u odnosu na nosioce oba referentna genotipa;

- Osobe koje su nosioci varijantnih genotipova *Ala/Val* i *Val/Val SOD2* rs4880 polimorfizma i referentnog genotipa *Ala/Ala GSTP1* rs1138272 polimorfizma imaju 4,3 puta veći rizik za razvoj sKBP u odnosu na nosioce oba referentna genotipa;
- Ispitivanjem kumulativnog efekta svih ispitivanih genskih varijanti uočava se trend uvećanja rizika ukoliko su pacijenti nosioci pet rizičnih genotipova (*C/A* ili *A/A Nrf2* polimorfizma rs6721961, *Ala/Val* ili *Val/Val SOD2* polimorfizma rs4880, *Pro/Leu* ili *Leu/Leu GPXI* polimorfizma rs1050450, *Ile/Val* ili *Val/Val GSTP1* polimorfizma rs1695, i *Ala/Val* ili *Val/Val GSTP1* polimorfizma rs1138272) u odnosu na osobe koje nemaju nijedan rizičan genotip (*C/C Nrf2*, *Ala/Ala SOD2*, *Pro/Pro GPXI*, *Ile/Ile GSTP1* rs1695 i *Ala/Ala GSTP1* rs1138272), iako taj rizik nije statistički značajan.
- Ispitivani genotipovi povećavaju rizik za nastanak sKBP, što je potencirano prisutnom hipertenzijom među ispitanicima.
  - Nosioci referentnog *C/C* genotipa za *Nrf2* koji boluju od hipertenzije imaju 2,3 puta povećan rizik za razvoj sKBP u odnosu na normotenzivne ispitanike sa istim homozigotnim genotipom;
  - Osobe koje imaju povišen arterijski pritisak a uz to su nosioci varijantnih genotipova za *SOD2*, u 12 puta većem riziku su za nastanak sKBP u odnosu na osobe bez povišenog arterijskog pritiska nosioce referentnog genotipa;
  - Uvećan rizik za sKBP imaju hipertenzivni nosioci referentnog genotipa za *GPXI*;
  - Kombinacija varijantnih genotipova za rs1695 i referentnog genotipa rs1138272 za *GSTP1*, povećava rizik za 9 puta ukoliko osobe imaju povišen pritisak;
- Ispitivani polimorfizmi *GPXI* i *GSTP1* predstavljaju značajne prognostičke faktore nakon nefrektomije kod pacijenata obolih od sKBP.
  - Distribucija nosilaca referentnog *Pro/Pro* genotipa i varijantnih *Pro/Leu* ili *Leu/Leu GPXI* genotipova u grupi živih pacijenata obrnuta je u odnosu na distribuciju unutar grupe preminulih pacijenata što se pokazalo kao statistički značajna razlika;
  - Nosioci barem jednog varijantnog genotipa za bilo koji od dva ispitivana *GSTP1* polimorfizma značajno su brojniji u odnosu na nosioce referentnih genotipova i u grupi živih i u grupi preminulih pacijenata, ali je razlika u distribuciji ovih genotipova statistički značajno različita;
- U slučaju kombinacije rs1695 i rs1138272 *GSTP1* genotipova, osobe koje su nosioci bilo koje od kombinacija varijantnih genotipova (kombinacije - (*Ile/Val* + *Val/Val*)(*Ala/Ala*), (*Ile/Ile*)(*Ala/Val* + *Val/Val*), (*Ile/Val* + *Val/Val*)(*Ala/Val* + *Val/Val*)), imale su kraći period preživljavanja u odnosu na referentne homozigote za oba genotipa (*Ile/Ile*) (*Ala/Ala*);
- Iz svega navedenog se može zaključiti da potenciranje narušene redoks homeostaze izmenom aktivnosti antioksidantnih enzima *SOD2* i *GSTP1* usled prisustva varijantnih genotipova funkcionalnih polimorfizama rs4880 za gen *SOD2* i polimorfizama rs1695 i rs1138272 za gen *GSTP1*, može imati značaja u proceni rizika za nastanak sKBP, kao i proceni postoperativne prognoze.

## LITERATURA

- [1] Banfalvi, G. *Homeostasis - Tumor - Metastasis*; Banfalvi, G., Ed.; Springer, **2014**.
- [2] Ursini, F.; Maiorino, M.; Forman, H.J. Redox Homeostasis: The Golden Mean of Healthy Living. *Redox Biol.*, **2016**, *8*, 205–215.
- [3] Kenelly, P.J.; Botham, K.M.; McGuinness, O.P.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A. *Harper's Illustrated Biochemistry*; Kenelly, P.J.; Botham, K.M.; McGuinness, O.P.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A., Eds.; 32nd ed.; Mc Graw Hill, **2023**.
- [4] Dayem, A.A.; Hossain, M.K.; Lee, S. Bin; Kim, K.; Saha, S.K.; Yang, G.M.; Choi, H.Y.; Cho, S.G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*, 1–21.
- [5] Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller, F.J.; Krause, K.H. Reactive Oxygen Species: From Health to Disease. *Swiss Med. Wkly.*, **2012**, *142*, 1–14.
- [6] Nathan, C.; Cunningham-Bussel, A. Beyond Oxidative Stress: An Immunologist's Guide to Reactive Oxygen Species. *Nat Rev Immunol*, **2013**, *13*, 349–361.
- [7] Valavanidis, A.; Vlachogianni, T.; Fiotakis, C. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **2009**, *27*, 120–139.
- [8] Hayes, J.D.; McMahon, M. NRF2 and KEAP1 Mutations: Permanent Activation of an Adaptive Response in Cancer. *Trends Biochem. Sci.*, **2009**, *34*, 176–188.
- [9] SIES, H. Strategies of Antioxidant Defense. *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *215*, 213–219.
- [10] Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, *86*, 715–748.
- [11] Moloney, J.N.; Cotter, T.G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2018**, *80*, 50–64.
- [12] Srinivas, U.S.; Tan, B.W.Q.; Vellayappan, B.A.; Jeyasekharan, A.D. ROS and the DNA Damage Response in Cancer. *Redox Biol.*, **2019**, *25*, 101084.
- [13] Liou, G.Y.; Storz, P. *Reactive Oxygen Species in Cancer*; **2010**; Vol. 44.
- [14] Srinivasan, R.; Ricketts, C.J.; Sourbier, C.; Linehan, W.M. New Strategies in Renal Cell Carcinoma: Targeting the Genetic and Metabolic Basis of Disease. *Clin Cancer Res*, **2015**, *21*, 10–17.
- [15] Schieber, M.; Chandel, N.S. ROS Function in Redox Signaling. *Curr. Biol.*, **2014**, *24*, 453–462.
- [16] Vaupel, P.; Multhoff, G. Revisiting the Warburg Effect: Historical Dogma versus Current Understanding. *J. Physiol.*, **2021**, *599*, 1745–1757.
- [17] Figueira, T.R.; Barros, M.H.; Camargo, A.A.; Castilho, R.F.; Ferreira, J.C.B.;

- Kowaltowski, A.J.; Sluse, F.E.; Souza-Pinto, N.C.; Vercesi, A.E. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. *Antioxidants Redox Signal.*, **2013**, *18*, 2029–2074.
- [18] De Berardinis, R.J.; Chandel, N.S. Fundamentals of Cancer Metabolism. *Sci. Adv.*, **2016**, *2*.
- [19] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*, **2011**, *144*, 646–674.
- [20] Schönberger, T.; Fandrey, J.; Prost-Fingerle, K. Ways into Understanding HIF Inhibition. *Cancers (Basel)*, **2021**, *13*, 1–16.
- [21] Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 Is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O<sub>2</sub> Tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1995**, *92*, 5510–5514.
- [22] Jiang, B.H.; Zheng, J.Z.; Leung, S.W.; Roe, R.; Semenza, G.L. Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ : Modulation of Transcriptional Activity by Oxygen Tension. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 19253–19260.
- [23] Mihailović, S.; Džamić, Z.; Plješa-Ercegovac, M. The Role of Redox Homeostasis Biomarkers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Development and Progression. *Med.Podml*, **2022**, *73*, 34–39.
- [24] Basak, P.; Sadhukhan, P.; Sarkar, P.; Sil, P.C. Perspectives of the Nrf-2 Signaling Pathway in Cancer Progression and Therapy. *Toxicol. Reports*, **2017**, *4*, 306–318.
- [25] Sporn, M.B.; Liby, K.T. NRF2 and Cancer: The Good, the Bad and the Importance of Context. *Nat. Rev. Cancer*, **2012**, *12*, 564–571.
- [26] Li, K.; Zhong, C.; Wang, B.; He, J.; Bi, J. Nrf2 Expression Participates in Growth and Differentiation of Endometrial Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. *J. Mol. Histol.*, **2014**, *45*, 161–167.
- [27] Clerici, S.; Boletta, A. Role of the Keap1-Nrf2 Axis in Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*, **2020**, *12*, 1–25.
- [28] Padmanabhan, B.; Tong, K.I.; Ohta, T.; Nakamura, Y.; Scharlock, M.; Ohtsuji, M.; Kang, M. II; Kobayashi, A.; Yokoyama, S.; Yamamoto, M. Structural Basis for Defects of Keap1 Activity Provoked by Its Point Mutations in Lung Cancer. *Mol. Cell*, **2006**, *21*, 689–700.
- [29] Fetoni, A.R.; Paciello, F.; Mezzogori, D.; Rolesi, R.; Eramo, S.L.M.; Paludetti, G.; Troiani, D. Molecular Targets for Anticancer Redox Chemotherapy and Cisplatin-Induced Ototoxicity: The Role of Curcumin on PSTAT3 and Nrf-2 Signalling. *Br. J. Cancer*, **2015**, *113*, 1434–1444.
- [30] Geismann, C.; Arlt, A.; Sebens, S.; Schäfer, H. Cytoprotection “Gone Astray”: Nrf2 and Its Role in Cancer. *Onco. Targets. Ther.*, **2014**, *7*, 1497–1518.
- [31] He, F.; Antonucci, L.; Karin, M. NRF2 as a Regulator of Cell Metabolism and

- Inflammation in Cancer. *Carcinogenesis*, **2020**, *41*, 405–416.
- [32] 600492 @ Www.Omim.Org.
- [33] Cho, H.Y.; Marzec, J.; Kleeberger, S.R. Functional Polymorphisms in Nrf2: Implications for Human Disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **2015**, *88*, 362–372.
- [34] Zenkov, N.K.; Kozhin, P.M.; Chechushkov, A. V.; Martinovich, G.G.; Kandalintseva, N. V.; Menshchikova, E.B. Mazes of Nrf2 Regulation. *Biochem.*, **2017**, *82*, 556–564.
- [35] Namani, A.; Li, Y.; Wang, X.J.; Tang, X. Modulation of NRF2 Signaling Pathway by Nuclear Receptors: Implications for Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **2014**, *1843*, 1875–1885.
- [36] Baird, L.; Yamamoto, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **2020**, *40*, 1–23.
- [37] Chartoumpakis, D.V.; Wakabayashi, N.; Kensler, T.W. Keap1/Nrf2 Pathway in the Frontiers of Cancer and Non-Cancer Cell Metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, **2015**, *43*, 639–644.
- [38] Camp, N.D.; James, R.G.; Dawson, D.W.; Yan, F.; Davison, J.M.; Houck, S.A.; Tang, X.; Zheng, N.; Major, M.B.; Moon, R.T. Wilms Tumor Gene on X Chromosome (WTX) Inhibits Degradation of NRF2 Protein through Competitive Binding to KEAP1 Protein. *J. Biol. Chem.*, **2012**, *287*, 6539–6550.
- [39] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Genomic Characterization of Squamous Cell Lung Cancers. *Nature*, **2012**, *489*, 519–525.
- [40] Oo Khor, T.; Fuentes, F.; Shu, L.; Paredes-Gonzales, X.; Yuqing Yang, A.; Liu, Y.; Smiraglia, D.J.; Yegnasubramanian, S.; Nelson, W.G.; Tony Kong, A.-N. Epigenetic DNA Methylation of Anti-Oxidative Stress Regulator NRF2 in Human Prostate Cancer. *Cancer Prev Res*, **2014**, *7*, 1186–1197.
- [41] Krajka-Kuźniak, V.; Paluszczak, J.; Baer-Dubowska, W. The Nrf2-ARE Signaling Pathway: An Update on Its Regulation and Possible Role in Cancer Prevention and Treatment. *Pharmacol. Reports*, **2017**, *69*, 393–402.
- [42] He, F.; Ru, X.; Wen, T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 1–23.
- [43] Raghunath, A.; Sundarraj, K.; Nagarajan, R.; Arfuso, F.; Bian, J.; Kumar, A.P.; Sethi, G.; Perumal, E. Antioxidant Response Elements: Discovery, Classes, Regulation and Potential Applications. *Redox Biol.*, **2018**, *17*, 297–314.
- [44] Chauhan, W.; Zennadi, R. Keap1-Nrf2 Heterodimer: A Therapeutic Target to Ameliorate Sickle Cell Disease. *Antioxidants*, **2023**, *12*.
- [45] Liska, D.A.J. The Detoxification Enzyme Systems. *Altern. Med. Rev.*, **1998**, *3*, 187–198.
- [46] Bartolini, D.; Galli, F. The Functional Interactome of GSTP: A Regulatory Biomolecular Network at the Interface with the Nrf2 Adaption Response to Oxidative Stress. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2016**, *1019*, 29–44.

- [47] Habig, W.; Pabst, M.; Jakoby, W. Glutathione S-Transferase The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 7130–7139.
- [48] Simic, T.; Savic-Radojevic, A.; Pljesa-Ercegovac, M.; Matic, M.; Mimic-Oka, J. Glutathione S-Transferases in Kidney and Urinary Bladder Tumors. *Nat. Rev. Urol.*, **2009**, *6*, 281–289.
- [49] Hayes, J.D.; Flanagan, J.U.; Jowsey, I.R. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2005**, *45*, 51–88.
- [50] Chatterjee, A.; Gupta, S. The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Cancer. *Cancer Lett.*, **2018**, *433*, 33–42.
- [51] Wu, B.; Dong, D. Human Cytosolic Glutathione Transferases: Structure, Function, and Drug Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2012**, *33*, 656–668.
- [52] Homo, S.; Ncbi, G.; Homo, S. GSTP1 glutathione S-transferase pi 1 [ Homo sapiens (human) ] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2950>.
- [53] Hayes, J.D.; McMahon, M.; Chowdhry, S.; Dinkova-kostova, A.T. Through the Keap1 – Nrf2 Pathway. *Antioxid.Redox.Signal.*, **2010**, *13*.
- [54] Holley, S.I.; Fryer, A.A.; Haycock, J.W.; Grubb, S.E.W.; Strange, R.C.; Hoban, P.R. Differential Effects of Glutathione S-Transferase Pi (GSTP1) Haplotypes on Cell Proliferation and Apoptosis. *Carcinogenesis*, **2007**, *28*, 2268–2273.
- [55] Duvoix, A.; Morceau, F.; Delhalle, S.; Schmitz, M.; Schnekenburger, M.; Galteau, M.M.; Dicato, M.; Diederich, M. Induction of Apoptosis by Curcumin: Mediation by Glutathione S-Transferase P1-1 Inhibition. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *66*, 1475–1483.
- [56] Tew, K.D.; Manevich, Y.; Grek, C.; Xiong, Y.; Uys, J.; Townsend, D.M. The Role of Glutathione S-Transferase P in Signaling Pathways and S-Glutathionylation in Cancer Kenneth. *Free Radic Biol Med*, **2011**, *51*, 299–313.
- [57] McIlwain, C.C.; Townsend, D.M.; Tew, K.D. Glutathione S-Transferase Polymorphisms: Cancer Incidence and Therapy. *Oncogene*, **2006**, *25*, 1639–1648.
- [58] Pettigrew, N.E.; Colman, R.F. Heterodimers of Glutathione S-Transferase Can Form between Isoenzyme Classes Pi and Mu. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *396*, 225–230.
- [59] Kim, H.J.; Lee, J.H.; Lee, K.B.; Shin, J.W.; Kwon, M. ae; Lee, S.; Jeong, E.M.; Cho, S.Y.; Kim, I.G. Transglutaminase 2 Crosslinks the Glutathione S-Transferase Tag, Impeding Protein–Protein Interactions of the Fused Protein. *Exp. Mol. Med.*, **2021**, *53*, 115–124.
- [60] Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide Dismutases: Dual Roles in Controlling ROS Damage and Regulating ROS Signaling. *J. Cell Biol.*, **2018**, *217*, 1915–1928.
- [61] Holmström, K.M.; Finkel, T. Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox-Dependent Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2014**, *15*, 411–421.
- [62] Meitzler, J.L.; Konaté, M.M.; Doroshov, J.H. Hydrogen Peroxide-Producing NADPH Oxidases and the Promotion of Migratory Phenotypes in Cancer. *Arch. Biochem. Biophys.*,

- 2019**, 675, 108076.
- [63] Levanon, D.; Lieman-Hurwitz, J.; Dafni, N.; Wigderson, M.; Sherman, L.; Bernstein, Y.; Laver-Rudich, Z.; Danciger, E.; Stein, O.; Groner, Y. Architecture and Anatomy of the Chromosomal Locus in Human Chromosome 21 Encoding the Cu/Zn Superoxide Dismutase. *EMBO J.*, **1985**, 4, 77–84.
- [64] Folz, R.J.; Crapo, J.D. Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3): Tissue-Specific Expression, Genomic Characterization, and Computer-Assisted Sequence Analysis of the Human EC SOD Gene. *Genomics*, **1994**, 22, 162–171.
- [65] Wan, X.S.; Devalaraja, M.N.; St. Clair, D.K. Molecular Structure and Organization of the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. *DNA Cell Biol.*, **1994**, 13, 1127–1136.
- [66] Carlioz, A.; Touati, D. Isolation of Superoxide Dismutase Mutants in Escherichia Coli: Is Superoxide Dismutase Necessary for Aerobic Life? *EMBO J.*, **1986**, 5, 623–630.
- [67] Borrelli, A.; Schiattarella, A.; Bonelli, P.; Tuccillo, F.M.; Buonaguro, F.M.; Mancini, A. The Functional Role of MnSOD as a Biomarker of Human Diseases and Therapeutic Potential of a New Isoform of a Human Recombinant MnSOD. *Biomed Res. Int.*, **2014**, 2014.
- [68] Venkataraman, S.; Jiang, X.; Weydert, C.; Zhang, Y.; Zhang, H.J.; Goswami, P.C.; Ritchie, J.M.; Oberley, L.W.; Buettner, G.R. Manganese Superoxide Dismutase Overexpression Inhibits the Growth of Androgen-Independent Prostate Cancer Cells. *Oncogene*, **2005**, 24, 77–89.
- [69] Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D.E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants Redox Signal.*, **2011**, 15, 1957–1997.
- [70] Sillanpää, M. *Advanced Water Treatment: Advanced Oxidation Processes*; **2020**.
- [71] Ursini, F.; Maiorino, M. *Glutathione Peroxidases*; 2nd ed.; Elsevier Inc., **2013**.
- [72] Brigelius-Flohé, R.; Maiorino, M. Glutathione Peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **2013**, 1830, 3289–3303.
- [73] Brigelius-Flohé, R.; Kipp, A. Glutathione Peroxidases in Different Stages of Carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **2009**, 1790, 1555–1568.
- [74] Battenberg, E.F.; Hoffer, B.J.; Bloom, F.E.; Steiner, A.L.; Gessa, G.L.; Hoffer, B.J.; Siggins, G.R.; Hoffer, B. Central Adrenergic Responses. **1962**, 588–590.
- [75] GPX1 glutathione peroxidase 1 [ Homo sapiens (human) ]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2876>.
- [76] Cho, C.; Lee, J.S.; Gladwin, M.T.; Rhee, S.G. Hydroxyurea-Induced Expression. *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, 13, 1–11.
- [77] Singh, A.; Rangasamy, T.; Thimmulappa, R.K.; Lee, H.; Osburn, W.O.; Brigelius-Flohé, R.; Kensler, T.W.; Yamamoto, M.; Biswal, S. Glutathione Peroxidase 2, the Major Cigarette Smoke-Inducible Isoform of GPX in Lungs, Is Regulated by Nrf2. *Am. J.*

- Respir. Cell Mol. Biol.*, **2006**, *35*, 639–650.
- [78] Baliga, M.S.; Wang, H.; Zhuo, P.; Schwartz, J.L.; Diamond, A.M. Selenium and GPx-1 Overexpression Protect Mammalian Cells against UV-Induced DNA Damage. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2007**, *115*, 227–241.
- [79] Vibet, S.; Goupille, C.; Bougnoux, P.; Steghens, J.P.; Goré, J.; Mahéo, K. Sensitization by Docosahexaenoic Acid (DHA) of Breast Cancer Cells to Anthracyclines through Loss of Glutathione Peroxidase (GPx1) Response. *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, *44*, 1483–1491.
- [80] Ho, J.C.; Chan-Yeung, M.; Ho, S.P.; Mak, J.C.; Ip, M.S.; Ool, G.C.; Wong, M.P.; Tsang, K.W.; Lam, W.K. Disturbance of Systemic Antioxidant Profile in Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Eur. Respir. J.*, **2007**, *29*, 273–278.
- [81] Cheng, Y.; Xu, T.; Li, S.; Ruan, H. GPX1, a Biomarker for the Diagnosis and Prognosis of Kidney Cancer, Promotes the Progression of Kidney Cancer. *Aging (Albany. NY)*, **2019**, *11*, 12165–12176.
- [82] Liu, J.; Hinkhouse, M.M.; Sun, W.; Weydert, C.J.; Ritchie, J.M.; Oberley, L.W.; Cullen, J.J. Redox Regulation of Pancreatic Cancer Cell Growth: Role of Glutathione Peroxidase in the Suppression of the Malignant Phenotype. *Hum. Gene Ther.*, **2004**, *15*, 239–250.
- [83] Lee, J.R.; Roh, J.L.; Lee, S.M.; Park, Y.; Cho, K.J.; Choi, S.H.; Nam, S.Y.; Kim, S.Y. Overexpression of Glutathione Peroxidase 1 Predicts Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2017**, *143*, 2257–2265.
- [84] Sosa, V.; Moliné, T.; Somoza, R.; Paciucci, R.; Kondoh, H.; LLeonart, M.E. Oxidative Stress and Cancer: An Overview. *Ageing Res. Rev.*, **2013**, *12*, 376–390.
- [85] Wallace, M. Anatomy and Physiology of the Kidney. *AORN J.*, **1998**, *68*, 799–820.
- [86] Protzel, C.; Maruschke, M.; Hakenberg, O.W. Epidemiology, Aetiology, and Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol. Suppl.*, **2012**, *11*, 52–59.
- [87] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.*, **2021**, *71*, 209–249.
- [88] Ljungberg, B.; Albiges, L.; Abu-Ghanem, Y.; Bensalah, K.; Dabestani, S.; Montes, S.F.P.; Giles, R.H.; Hofmann, F.; Hora, M.; Kuczyk, M.A.; Kuusk, T.; Lam, T.B.; Marconi, L.; Merseburger, A.S.; Powles, T.; Staehler, M.; Tahbaz, R.; Volpe, A.; Bex, A. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur. Urol.*, **2019**, *75*, 799–810.
- [89] Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Wagle, N.S.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2023. *CA. Cancer J. Clin.*, **2023**, *73*, 17–48.
- [90] Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.*, **2019**, *69*, 7–34.
- [91] Ljungberg B; Albiges L; Bedke J; Bex A; Capitanio U; Giles RH; Hora M; Klatter T; Marconi L; Powles T; Volpe A. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma. *Eur. Assoc.*



- Urol.*, **2023**, 1–100.
- [92] Huang, J.; Leung, D.K.W.; Chan, E.O.T.; Lok, V.; Leung, S.; Wong, I.; Lao, X.Q.; Zheng, Z.J.; Chiu, P.K.F.; Ng, C.F.; Wong, J.H.M.; Volpe, A.; Merseburger, A.S.; Powles, T.; Teoh, J.Y.C.; Wong, M.C.S. A Global Trend Analysis of Kidney Cancer Incidence and Mortality and Their Associations with Smoking, Alcohol Consumption, and Metabolic Syndrome. *Eur. Urol. Focus*, **2022**, *8*, 200–209.
- [93] Hegemann, M.; Kroeger, N.; Stenzl, A.; Bedke, J. Rare and Changeable as a Chameleon: Paraneoplastic Syndromes in Renal Cell Carcinoma. *World J. Urol.*, **2018**, *36*, 849–854.
- [94] Levi, F.; Ferlay, J.; Galeone, C.; Lucchini, F.; Negri, E.; Boyle, P.; La Vecchia, C. The Changing Pattern of Kidney Cancer Incidence and Mortality in Europe. *BJU Int.*, **2008**, *101*, 949–958.
- [95] Bhatt, J.R.; Finelli, A. Landmarks in the Diagnosis and Treatment of Renal Cell Carcinoma. *Nat. Rev. Urol.*, **2014**, *11*, 517–525.
- [96] Sacco, E.; Pinto, F.; Sasso, F.; Racioppi, M.; Gulino, G.; Volpe, A.; Bassi, P. Paraneoplastic Syndromes in Patients with Urological Malignancies. *Urol. Int.*, **2009**, *83*, 1–11.
- [97] Harding, G.; Cella, D.; Robinson, D.; Mahadevia, P.J.; Clark, J.; Revicki, D.A. Symptom Burden among Patients with Renal Cell Carcinoma (RCC): Content for a Symptom Index. *Health Qual. Life Outcomes*, **2007**, *5*, 1–12.
- [98] Kovacs, G.; Akhtar, M.; Beckwith, J.B.; Bugert, P.; Cooper, C.S.; Delahunt, B.; Eble, J.N.; Fleming, S.; Ljungberg, B.; Medeiros, L.J.; H. Moch, V.E.R.; E. Ritz, G.R.; Schmidt, D.; Srigley, J.R.; Störkel, S.; Berg, E. Van Den; Zbar, B. Editorial the Heidelberg Classification of Renal Cell. *Am. J. Surg. Pathol.*, **1997**, *133*, 131–133.
- [99] Delahunt, B.; Eble, J.N.; Samaratunga, H.; Thunders, M.; Yaxley, J.W.; Egevad, L. Staging of Renal Cell Carcinoma: Current Progress and Potential Advances. *Pathology*, **2021**, *53*, 120–128.
- [100] Amin, M.B.; Greene, F.L.; Edge, S.B.; Compton, C.C.; Gershenwald, J.E.; Brookland, R.K.; Meyer, L.; Gress, D.M.; Byrd, D.R.; Winchester, D.P. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge from a Population-Based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging. *CA. Cancer J. Clin.*, **2017**, *67*, 93–99.
- [101] Gomella, P.T.; Linehan, W.M.; Ball, M.W. Precision Surgery and Kidney Cancer: Knowledge of Genetic Alterations Influences Surgical Management. *Genes (Basel)*, **2021**, *12*, 1–9.
- [102] Motzer, R.J.; Escudier, B.; Tomczak, P.; Hutson, T.E.; Michaelson, M.D.; Negrier, S.; Oudard, S.; Gore, M.E.; Tarazi, J.; Hariharan, S.; Chen, C.; Rosbrook, B.; Kim, S.; Rini, B.I. Axitinib versus Sorafenib as Second-Line Treatment for Advanced Renal Cell Carcinoma: Overall Survival Analysis and Updated Results from a Randomised Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.*, **2013**, *14*, 552–562.
- [103] Motzer, R.J.; Hutson, T.E.; Cella, D.; Reeves, J.; Hawkins, R.; Guo, J.; Nathan, P.; Staehler, M.; de Souza, P.; Merchan, J.R.; Boleti, E.; Fife, K.; Jin, J.; Jones, R.; Uemura,

- H.; De Giorgi, U.; Harmenberg, U.; Wang, J.; Sternberg, C.N.; Deen, K.; McCann, L.; Hackshaw, M.D.; Crescenzo, R.; Pandite, L.N.; Choueiri, T.K. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **2013**, *369*, 722–731.
- [104] Makhov, P.; Joshi, S.; Ghatalia, P.; Kutikov, A.; Uzzo, R.G.; Kolenko, V.M. Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Mol. Cancer Ther.*, **2018**, *17*, 1355–1364.
- [105] Zama, I.N.; Hutson, T.E.; Elson, P.; Cleary, J.M.; Choueiri, T.K.; Heng, D.Y.C.; Ramaiya, N.; Michaelson, M.D.; Garcia, J.A.; Knox, J.J.; Escudier, B.; Rini, B.I. Sunitinib Rechallenge in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients. *Cancer*, **2010**, *116*, 5400–5406.
- [106] Chow, W.H.; Dong, L.M.; Devesa, S.S. Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *Nat. Rev. Urol.*, **2010**, *7*, 245–257.
- [107] Franco, C.; Sciatti, E.; Favero, G.; Bonomini, F.; Vizzardì, E.; Rezzani, R. Essential Hypertension and Oxidative Stress: Novel Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*.
- [108] Guzik, T.J.; Touyz, R.M. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. *Hypertension*, **2017**, *70*, 660–667.
- [109] Korsager Larsen, M.; Matchkov, V. V. Hypertension and Physical Exercise: The Role of Oxidative Stress. *Med.*, **2016**, *52*, 19–27.
- [110] Capitanio, U.; Bensalah, K.; Bex, A.; Boorjian, S.A.; Bray, F.; Coleman, J.; Gore, J.L.; Sun, M.; Wood, C.; Russo, P. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma [Figure Presented]. *Eur. Urol.*, **2019**, *75*, 74–84.
- [111] Corrao, G.; Scotti, L.; Bagnardi, V.; Sega, R. Hypertension, Antihypertensive Therapy and Renal-Cell Cancer: A Meta-Analysis. *Curr. Drug Saf.*, **2008**, *2*, 125–133.
- [112] Zhang, G.M.; Zhu, Y.; Ye, D.W. Metabolic Syndrome and Renal Cell Carcinoma. *World J. Surg. Oncol.*, **2014**, *12*, 1–9.
- [113] Weikert, S.; Boeing, H.; Pischon, T.; Weikert, C.; Olsen, A.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Becker, N.; Linseisen, J.; Trichopoulou, A.; Moutakalakis, T.; Trichopoulos, D.; Sieri, S.; Palli, D.; Vineis, P.; Panico, S.; Peeters, P.H.M.; Bueno-De-Mesquita, H.B.; Verschuren, W.M.M.; Ljungberg, B.; Hallmans, G.; Berglund, G.; González, C.A.; Dorronsoro, M.; Barricarte, A.; Tormo, M.J.; Allen, N.; Roddam, A.; Bingham, S.; Khaw, K.T.; Rinaldi, S.; Ferrari, P.; Norat, T.; Riboli, E. Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Epidemiol.*, **2008**, *167*, 438–446.
- [114] Sharifi, N.; Farrar, W.L. Perturbations in Hypoxia Detection: A Shared Link between Hereditary and Sporadic Tumor Formation? *Med. Hypotheses*, **2006**, *66*, 732–735.
- [115] Gago-Dominguez, M.; Castelao, J.E.; Yuan, J.M.; Ross, R.K.; Yu, M.C. Lipid Peroxidation: A Novel and Unifying Concept of the Etiology of Renal Cell Carcinoma (United States). *Cancer Causes Control*, **2002**, *13*, 287–293.
- [116] Li, M.; Bu, R. Biological Support to Obesity Paradox in Renal Cell Carcinoma: A Review. *Urol. Int.*, **2020**, *104*, 837–848.

- [117] Renehan, A.G.; Tyson, M.; Egger, M.; Heller, R.F.; Zwahlen, M. Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Lancet*, **2008**, *371*, 569–578.
- [118] Lee, D.H.; Giovannucci, E.L. The Obesity Paradox in Cancer : Epidemiologic Insights and Perspectives. **2019**, 175–181.
- [119] Turco, F.; Tucci, M.; Di Stefano, R.F.; Samuelly, A.; Bungaro, M.; Audisio, M.; Pisano, C.; Di Maio, M.; Scagliotti, G.V.; Buttigliero, C. Renal Cell Carcinoma (RCC): Fatter Is Better? A Review on the Role of Obesity in RCC. *Endocr. Relat. Cancer*, **2021**, *28*, R207–R216.
- [120] Sanchez, A.; Sloan, M.; Cancer, K.; Furberg, H.; Sloan, M.; Cancer, K.; Kuo, F.; Platform, P.O.; Sloan, M.; Cancer, K.; Vuong, L.; Platform, P.O.; Sloan, M.; Cancer, K.; Ged, Y.; Sloan, M.; Cancer, K.; Patil, S.; Sloan, M.; Cancer, K.; Ostrovnya, I. Transcriptomic Signatures Related to the Obesity Paradox in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Retrospective Cohort Study. *Lancet Oncol*, **2020**, *21*, 283–293.
- [121] Theis, R.P.; Grieb, S.M.D.; Burr, D.; Siddiqui, T.; Asal, N.R. Smoking, Environmental Tobacco Smoke, and Risk of Renal Cell Cancer: A Population-Based Case-Control Study. **2008**, *11*, 1–11.
- [122] Hoffmann, D.; Ph, D.; Djordjevic, M. V; Ph, D.; Hoffmann, I. The Changing Cigarette 1. **1997**, *434*, 427–434.
- [123] Xiao, Y.; Meierhofer, D. Glutathione Metabolism in Renal Cell Carcinoma Progression and Implications for Therapies. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*, 1–20.
- [124] Warren, A.Y.; Harrison, D. WHO/ISUP Classification, Grading and Pathological Staging of Renal Cell Carcinoma: Standards and Controversies. *World J. Urol.*, **2018**, *36*, 1913–1926.
- [125] Qiu, B.; Ackerman, D.; Sanchez, D.J.; Li, B.; Ochocki, J.D.; Grazioli, A.; Bobrovnikova-Marjon, E.; Alan Diehl, J.; Keith, B.; Celeste Simon, M. HIF2 $\alpha$ -Dependent Lipid Storage Promotes Endoplasmic Reticulum Homeostasis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Discov.*, **2016**, *5*, 653–667.
- [126] Wettersten, H.I.; Hakimi, A.A.; Morin, D.; Bianchi, C.; Johnstone, M.E.; Donohoe, D.R.; Trott, J.F.; Abu Aboud, O.; Stirdivant, S.; Neri, B.; Wolfert, R.; Stewart, B.; Perego, R.; Hsieh, J.J.; Weiss, R.H. Grade-Dependent Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer Revealed by Combined Proteomics and Metabolomics Analysis. *Cancer Res*, **2015**, *75*, 2541–2552.
- [127] Chen, F.; Zhang, Y.; Şenbabaoglu, Y.; Ciriello, G.; Yang, L.; Reznik, E.; Shuch, B.; Micevic, G.; De Velasco, G.; Shinbrot, E.; Noble, M.S.; Lu, Y.; Covington, K.R.; Xi, L.; Drummond, J.A.; Muzny, D.; Kang, H.; Lee, J.; Tamboli, P.; Reuter, V.; Shelley, C.S.; Kaiparettu, B.A.; Bottaro, D.P.; Godwin, A.K.; Gibbs, R.A.; Getz, G.; Kucherlapati, R.; Park, P.J.; Sander, C.; Henske, E.P.; Zhou, J.H.; Kwiatkowski, D.J.; Ho, T.H.; Choueiri, T.K.; Hsieh, J.J.; Akbani, R.; Mills, G.B.; Hakimi, A.A.; Wheeler, D.A.; Creighton, C.J. Multilevel Genomics-Based Taxonomy of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep.*, **2016**, *14*, 2476–2489.

- [128] Pandey, N.; Lanke, V.; Vinod, P.K. Network-Based Metabolic Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Sci. Rep.*, **2020**, *10*, 5955.
- [129] Pljesa-Ercegovac, M.; Savic-Radojevic, A.; Coric, V.; Radic, T.; Simic, T. Glutathione Transferase Genotypes May Serve as Determinants of Risk and Prognosis in Renal Cell Carcinoma. *BioFactors*, **2020**, *46*, 229–238.
- [130] Glasker, S.; Vergauwen, E.; Koch, C.A.; Kutikov, A.; Vortmeyer, A.O. Von Hippel-Lindau Disease : Current Challenges and Future Prospects. **2020**, 5669–5690.
- [131] Nickerson, M.L.; Jaeger, E.; Shi, Y.; Durocher, J.A.; Mahurkar, S.; Zaridze, D.; Matveev, V.; Janout, V.; Kollarova, H.; Bencko, V.; Navratilova, M.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Mates, D.; Mukeria, A.; Holcatova, I.; Schmidt, L.S.; Toro, J.R.; Karami, S.; Hung, R.; Gerard, G.F.; Linehan, W.M.; Merino, M.; Zbar, B.; Boffetta, P.; Brennan, P.; Rothman, N.; Chow, W.H.; Waldman, F.M.; Moore, L.E. Improved Identification of von Hippel-Lindau Gene Alterations in Clear Cell Renal Tumors. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 4726–4734.
- [132] Young, A.C.; Craven, R.A.; Cohen, D.; Taylor, C.; Booth, C.; Harnden, P.; Cairns, D.A.; Astuti, D.; Gregory, W.; Maher, E.R.; Knowles, M.A.; Joyce, A.; Selby, P.J.; Banks, R.E. Analysis of VHL Gene Alterations and Their Relationship to Clinical Parameters in Sporadic Conventional Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **2009**, *15*, 7582–7592.
- [133] Zhang, T.; D, M.; Zhu, J.; D, M.; George, D.J.; D, M.; Nixon, A.B.; Ph, D. Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma : Circulating Biomarkers to Guide Antiangiogenic and Immune Therapies. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, **2016**, 1–9.
- [134] Fabrizio, F.P.; Costantini, M.; Copetti, M.; Sparaneo, A.; Fontana, A.; Poeta, L.; Gallucci, M.; Sentinelli, S.; Graziano, P.; Parente, P.; Pompeo, V.; De, L.; Simone, G.; Papalia, R.; Picardo, F.; Balsamo, T.; Paranita, F.; Muscarella, L.A.; Fazio, V. Keap1/Nrf2 Pathway in Kidney Cancer: Frequent Methylation of Keap1 Gene Promoter in Clear Renal Cell Carcinoma. *Oncotarget*, **2016**, *8*, 11187–11198.
- [135] Cairns, P. Renal Cell Carcinoma. *Cancer Biomarkers*, **2011**, *9*, 461–473.
- [136] Yang, X.; Long, S.; Deng, J.; Deng, T.; Gong, Z.; Hao, P. Glutathione S-Transferase Polymorphisms (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and Their Susceptibility to Renal Cell Carcinoma: An Evidence-Based Meta-Analysis. *PLoS One*, **2013**, *8*, e63827.
- [137] Radic, T.M.; Coric, V.M.; Pljesa-Ercegovac, M.S.; Basta-Jovanovic, G.M.; Radojevic-Skodric, S.M.; Dragicevic, D.P.; Matic, M.G.; Bogdanovic, L.M.; Dzamic, Z.M.; Simic, T.P.; Savic-Radojevic, A.R. Concomitance of Polymorphisms in Glutathione Transferase Omega Genes Is Associated with Risk of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.*, **2018**, *246*, 35–44.
- [138] Coric, V.; Pljesa-Ercegovac, M.; Dzamic, Z. The Role of Glutathione Transferases in Renal Cell Carcinoma. *Med. Podml.*, **2016**, *67*, 42–48.
- [139] Mihailovic, S.; Coric, V.; Radic, T.; Radojevic, A.S.; Matic, M.; Dragicevic, D.; Djokic, M.; Vasic, V.; Dzamic, Z.; Simic, T.; Hadzi-Djokic, J.; Ercegovac, M.P. The Association of Polymorphisms in Nrf2 and Genes Involved in Redox Homeostasis in the Development

- and Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **2021**, 2021.
- [140] Yoshida, T.; Kageyama, S.; Isono, T.; Yuasa, T.; Kushima, R.; Kawauchi, A.; Chano, T. Superoxide Dismutase 2 Expression Can Predict Prognosis of Renal Cell Carcinoma Patients. *Cancer Biomarkers*, **2018**, 22, 755–761.
- [141] Marzec, J.M.; Christie, J.D.; Reddy, S.P.; Jedlicka, A.E.; Vuong, H.; Lancken, P.N.; Aplenc, R.; Yamamoto, T.; Yamamoto, M.; Cho, H.-Y.; Kleeberger, S.R. Functional Polymorphisms in the Transcription Factor NRF2 in Humans Increase the Risk of Acute Lung Injury. *FASEB J.*, **2007**, 21, 2237–2246.
- [142] Yamaguchi, Y.; Kamai, T.; Higashi, S.; Murakami, S.; Arai, K.; Shirataki, H.; Yoshida, K.I. Nrf2 Gene Mutation and Single Nucleotide Polymorphism Rs6721961 of the Nrf2 Promoter Region in Renal Cell Cancer. *BMC Cancer*, **2019**, 19, 1–9.
- [143] Reszka, E.; Jablonowski, Z.; Wieczorek, E.; Jablonska, E.; Krol, M.B.; Gromadzinska, J.; Grzegorzczak, A.; Sosnowski, M.; Wasowicz, W. Polymorphisms of NRF2 and NRF2 Target Genes in Urinary Bladder Cancer Patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2014**, 140, 1723–1731.
- [144] Jerotić, Đ.; Matic, M.; McClements, L. The Importance of Polymorphisms of Regulatory and Catalytic Antioxidant Proteins in Chronic Kidney Disease. *Med. Podml.*, **2021**, 72, 25–33.
- [145] Ding, F.; Li, J.P.; Zhang, Y.; Qi, G.H.; Song, Z.C.; Yu, Y.H. Comprehensive Analysis of the Association between the Rs1138272 Polymorphism of the GSTP1 Gene and Cancer Susceptibility. *Front. Physiol.*, **2019**, 9, 1–12.
- [146] Thévenin, A.F.; Zony, C.L.; Bahnson, B.J.; Colman, R.F. GST Pi Modulates JNK Activity through a Direct Interaction with JNK Substrate, ATF2. *Protein Sci.*, **2011**, 20, 834–848.
- [147] Moyer, A.M.; Salavaggione, O.E.; Wu, T.-Y.; Moon, I.; Eckloff, B.W.; Hildebrandt, M.A.T.; Schaid, D.J.; Wieben, E.D.; Weinshilboum, R.M. Glutathione S-Transferase P1: Gene Sequence Variation and Functional Genomic Studies. *Cancer Res*, **2008**, 68, 4791–4801.
- [148] Li, D.; Dandara, C.; Parker, M.I. The 341C/T Polymorphism in the GSTP1 Gene Is Associated with Increased Risk of Oesophageal Cancer. *BMC Genet.*, **2010**, 11, 47.
- [149] Ćorić, V. The Association of Glutathione Polymorphisms with the Risk of Renal Cell Carcinoma (Doctoral Dissertation). *Univ. Belgrade*, **2017**.
- [150] Atilgan, D.; Parlaktas, B.S.; Uluocak, N.; Kolukcu, E.; Erdemir, F.; Ozyurt, H.; Erkorkmaz, U. The Relationship between ALA16VAL Single Gene Polymorphism and Renal Cell Carcinoma. *Adv. Urol.*, **2014**, 2014.
- [151] Ratnasinghe, D.; Tangrea, J.A.; Andersen, M.R.; Barrett, M.J.; Virtamo, J.; Taylor, P.R.; Albanes, D. Glutathione Peroxidase Codon 198 Polymorphism Variant Increases Lung Cancer Risk. *Cancer Res.*, **2000**, 60, 6381–6383.
- [152] Shimoyama, Y.; Mitsuda, Y.; Tsuruta, Y.; Hamajima, N.; Niwa, T. Polymorphism of Nrf2, an Antioxidative Gene, Is Associated with Blood Pressure and Cardiovascular

- Mortality in Hemodialysis Patients. *Int. J. Med. Sci.*, **2014**, *11*, 726–731.
- [153] Wu, T.; Dai, Y. Tumor Microenvironment and Therapeutic Response. *Cancer Lett.*, **2017**, *387*, 61–68.
- [154] Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, **2012**, *21*, 309–322.
- [155] Singh, D. Current Updates and Future Perspectives on the Management of Renal Cell Carcinoma. *Life Sci.*, **2021**, *264*, 118632.
- [156] Akhtar, M.; Al-Bozom, I.A.; Hussain, T. Al. Molecular and Metabolic Basis of Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Adv. Anat. Pathol.*, **2018**, *25*, 189–196.
- [157] Gordan, J.D.; Lal, P.; Dondeti, V.R.; Letrero, R.; Parekh, K.N.; Oquendo, C.E.; Greenberg, R.A.; Flaherty, K.T.; Rathmell, W.K.; Keith, B.; Simon, M.C.; Nathanson, K.L. HIF- $\alpha$  Effects on c-Myc Distinguish Two Subtypes of Sporadic VHL-Deficient Clear Cell Renal Carcinoma. *Cancer Cell*, **2008**, *14*, 435–446.
- [158] Chen, F.; Zhang, Y.; Şenbabaoğlu, Y.; Ciriello, G.; Yang, L.; Reznik, E.; Shuch, B.; Micevic, G.; Velasco, G. De; Shinbrot, E.; Noble, M.S.; Lu, Y.; Covington, K.R.; Xi, L.; Drummond, J.A.; Muzny, D.; Kang, H.; Lee, J.; Tamboli, P.; Reuter, V.; Shelley, C.S.; Kaipparettu, B.A.; Bottaro, D.P.; Godwin, A.K.; Gibbs, R.A.; Getz, G.; Kucherlapati, R.; Park, P.J.; Sander, C.; Henske, E.P.; Zhou, J.H.; Kwiatkowski, D.J.; Ho, T.H.; Choueiri, T.K.; Hsieh, J.J.; Akbani, R.; Mills, G.B.; Hakimi, A.A.; Wheeler, D.A.; Creighton, C.J. Multilevel Genomics-Based Taxonomy of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep.*, **2016**, *14*, 2476–2489.
- [159] Sato, Y.; Yoshizato, T.; Shiraishi, Y.; Maekawa, S.; Okuno, Y.; Kamura, T.; Shimamura, T.; Sato-Otsubo, A.; Nagae, G.; Suzuki, H.; Nagata, Y.; Yoshida, K.; Kon, A.; Suzuki, Y.; Chiba, K.; Tanaka, H.; Niida, A.; Fujimoto, A.; Tsunoda, T.; Morikawa, T.; Maeda, D.; Kume, H.; Sugano, S.; Fukayama, M.; Aburatani, H.; Sanada, M.; Miyano, S.; Homma, Y.; Ogawa, S. Integrated Molecular Analysis of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Nat. Genet.*, **2013**, *45*, 860–867.
- [160] Petitprez, F.; Ayadi, M.; de Reyniès, A.; Fridman, W.H.; Sautès-Fridman, C.; Job, S. Review of Prognostic Expression Markers for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front. Oncol.*, **2021**, *11*.
- [161] Dizman, N.; Philip, E.J.; Pal, S.K. Genomic Profiling in Renal Cell Carcinoma. *Nat. Rev. Nephrol.*, **2020**, *16*, 435–451.
- [162] Gray, I.C.; Campbell, D.A.; Spurr, N.K. Single Nucleotide Polymorphisms as Tools in Human Genetics. *Hum. Mol. Genet.*, **2000**, *9*, 2403–2408.
- [163] Ishii, T.; Itoh, K.; Takahashi, S.; Sato, H.; Yanagawa, T.; Katoh, Y.; Bannai, S.; Yamamoto, M. Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-Inducible Genes in Macrophages. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 16023–16029.
- [164] Suzuki, T.; Shibata, T.; Takaya, K.; Shiraishi, K.; Kohno, T.; Kunitoh, H.; Tsuta, K.; Furuta, K.; Goto, K.; Hosoda, F.; Sakamoto, H.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. Regulatory Nexus of Synthesis and Degradation Deciphers Cellular Nrf2 Expression

- Levels. *Mol. Cell. Biol.*, **2013**, *33*, 2402–2412.
- [165] Shimoyama, Y.; Mitsuda, Y.; Hamajima, N.; Niwa, T. Polymorphisms of Nrf2, an Antioxidative Gene, Are Associated with Blood Pressure in Japanese. *Nagoya J. Med. Sci.*, **2014**, *76*, 113–120.
- [166] Khadir, F.; Rahimi, Z.; Ghanbarpour, A.; Vaisi-Raygani, A. Nrf2 Rs6721961 and Oxidative Stress in Preeclampsia: Association with the Risk of Preeclampsia and Early-Onset Preeclampsia. *Int. J. Mol. Cell. Med.*, **2022**, *11*, 127–136.
- [167] Hartikainen, J.M.; Tengström, M.; Kosma, V.M.; Kinnula, V.L.; Mannermaa, A.; Soini, Y. Genetic Polymorphisms and Protein Expression of NRF2 and Sulfiredoxin Predict Survival Outcomes in Breast Cancer. *Cancer Res.*, **2012**, *72*, 5537–5546.
- [168] Okano, Y.; Nezu, U.; Enokida, Y.; Lee, M.T.M.; Kinoshita, H.; Lezhava, A.; Hayashizaki, Y.; Morita, S.; Taguri, M.; Ichikawa, Y.; Kaneko, T.; Natsumeda, Y.; Yokose, T.; Nakayama, H.; Miyagi, Y.; Ishikawa, T. SNP (-617C>A) in ARE-like Loci of the NRF2 Gene: A New Biomarker for Prognosis of Lung Adenocarcinoma in Japanese Non-Smoking Women. *PLoS One*, **2013**, *8*, e73794.
- [169] Djokic, M.; Radic, T.; Santric, V.; Dragicevic, D.; Suvakov, S.; Mihailovic, S.; Stankovic, V.; Cekerevac, M.; Simic, T.; Nikitovic, M.; Coric, V. The Association of Polymorphisms in Genes Encoding Antioxidant Enzymes GPX1 (Rs1050450), SOD2 (Rs4880) and Transcriptional Factor Nrf2 (Rs6721961) with the Risk and Development of Prostate Cancer. *Med.*, **2022**, *58*, 1–11.
- [170] Yuki, H.; Kamai, T.; Murakami, S.; Higashi, S.; Narimatsu, T.; Kambara, T.; Betsunoh, H.; Abe, H.; Arai, K.; Shirataki, H.; Yoshida, K.-I. Increased Nrf2 Expression by Renal Cell Carcinoma Is Associated with Postoperative Chronic Kidney Disease and an Unfavorable Prognosis. *Oncotarget*, **2018**, *9*, 28351–28363.
- [171] Roco, A.; Lavanderos, A.; Cayún, J.P.; Acevedo, C.; Celedón, C.; Rubilar, J.C.; Sandoval, C.; Cerpa, L.; García-Martín, E.; Agúndez, J.A.; Esguevillas, G.; Amo, G.; Canepa, A.; Cerda, B.; Peña, K.; Cáceres, D.D.; Varela, N.M.; Quiñones, L.A. The Role of Phase I and II Genetic Polymorphisms, Smoking, Alcohol and Cancer Family History, in the Risk of Developing Testicular Cancer. *Pharmacogenet. Genomics*, **2019**, *29*, 159–166.
- [172] Matic, M.; Pekmezovic, T.; Djukic, T.; Mimic-Oka, J.; Dragicevic, D.; Krivic, B.; Suvakov, S.; Savic-Radojevic, A.; Pljesa-Ercegovac, M.; Tulic, C.; Coric, V.; Simic, T. GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 Polymorphisms and Susceptibility to Smoking-Related Bladder Cancer: A Case-Control Study. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, **2013**.
- [173] Song, Y.; Chen, J.; Liu, K.; Zhou, K.; Lu, Y.; Wang, X.; Yang, Y.; Liu, X. Glutathione S-Transferase Pi 1 (GSTP1) Gene 313 A/G (Rs1695) Polymorphism Is Associated with the Risk of Urinary Bladder Cancer: Evidence from a Systematic Review and Meta-Analysis Based on 34 Case-Control Studies. *Gene*, **2019**, *719*.
- [174] Kuang, M.; Xu, W.; Cao, C.X.; Shen, L.L.; Chang, J.; Zhang, X.L.; Chen, J.F.; Tang, C.J. Glutathione S-Transferase P1 Rs1695 A >G Polymorphism and Breast Cancer Risk: Evidence from a Meta-Analysis. *Genet. Mol. Res.*, **2016**, *15*.

- [175] Farmohammadi, A.; Arab-Yarmohammadi, V.; Ramzanpour, R. Association Analysis of Rs1695 and Rs1138272 Variations in GSTP1 Gene and Breast Cancer Susceptibility. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **2020**, *21*, 1167–1172.
- [176] Baghaei, A.; Behjati, M.; Karimian, A. Association Analysis of GSTP1-Rs1695 Polymorphism with the Risk of Oral Cancer: A Literature Review, an Updated Meta-Analysis, and a Structural Assessment. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **2022**, *23*, 3859–3868.
- [177] Santric, V.; Djokic, M.; Suvakov, S.; Pljesa-ercegovac, M.; Nikitovic, M.; Radic, T.; Acimovic, M.; Stankovic, V.; Bumbasirevic, U.; Milojevic, B.; Babic, U.; Dzamic, Z.; Simic, T.; Dragicevic, D.; Savic-Radojevic, A. GSTP1 Rs1138272 Polymorphism Affects Prostate Cancer. *Medicina (B. Aires)*, **2020**, *56*, 1–10.
- [178] Stoehlmacher, J.; Park, D.J.; Zhang, W.; Groshen, S.; Tsao-Wei, D.D.; Yu, M.C.; Lenz, H.J. Association between Glutathione S-Transferase P1, T1, and M1 Genetic Polymorphism and Survival of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2002**, *94*, 936–942.
- [179] Coric, V.M.; Simic, T.P.; Pekmezovic, T.D.; Basta-Jovanovic, G.M.; Savic-Radojevic, A.R.; Radojevic-Skodric, S.M.; Matic, M.G.; Suvakov, S.R.; Dragicevic, D.P.; Radic, T.M.; Dzamic, Z.M.; Pljesa-Ercegovac, M.S. GSTM1 Genotype Is an Independent Prognostic Factor in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, **2017**, *35*, 409–417.
- [180] Jia, C.Y.; Liu, Y.J.; Cong, X.L.; Ma, Y.S.; Sun, R.; Fu, D.; Lv, Z.W. Association of Glutathione S-Transferase M1, T1, and P1 Polymorphisms with Renal Cell Carcinoma: Evidence from 11 Studies. *Tumor Biol.*, **2014**, *35*, 3867–3873.
- [181] Pavlovic, D.; Ristic, S.; Djukanovic, L.; Matic, M.; Kovacevic, M.; Pljesa-Ercegovac, M.; Hadzi-Djokic, J.; Savic-Radojevic, A.; Djukic, T. The GSTO2 (Rs156697) Polymorphism Modifies Diabetic Nephropathy Risk. *Medicina (B. Aires)*, **2023**, *59*, 1–13.
- [182] Maniglia, M.P.; Russo, A.; Biselli-Chicote, P.M.; de Oliveira-Cucolo, J.G.; Rodrigues-Fleming, G.H.; Maniglia, J.V.; Pavarino, érika C.; Goloni-Bertollo, E.M. Glutathione S-Transferase Polymorphisms in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Treated with Chemotherapy and/or Radiotherapy. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **2020**, *21*, 1637–1644.
- [183] Tew, K.D.; Townsend, D.M. Glutathione-S-Transferases as Determinants of Cell Survival and Death. *Antioxidants Redox Signal.*, **2012**, *17*, 1728–1737.
- [184] 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. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, **2011**, *29*, 70–77.
- [185] Ichijo, H.; Nishida, E.; Irie, K.; Ten Dijke, P.; Saitoh, M.; Moriguchi, T.; Takagi, M.; Matsumoto, K.; Miyazono, K.; Gotoh, Y. Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and P38 Signaling Pathways. *Science (80-. )*, **1997**, *275*, 90–94.



- [186] Jones, D.A.; Prior, S.L.; Tang, T.S.; Bain, S.C.; Hurel, S.J.; Humphries, S.E.; Stephens, J.W. Association between the Rs4880 Superoxide Dismutase 2 (C>T) Gene Variant and Coronary Heart Disease in Diabetes Mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **2010**, *90*, 196–201.
- [187] Yari, A.; Saleh-Gohari, N.; Mirzaee, M.; Hashemi, F.; Saeidi, K. A Study of Associations Between Rs9349379 (PHACTR1), Rs2891168 (CDKN2B-AS), Rs11838776 (COL4A2) and Rs4880 (SOD2) Polymorphic Variants and Coronary Artery Disease in Iranian Population. *Biochem. Genet.*, **2022**, *60*, 106–126.
- [188] Wiener, H.W.; Perry, R.T.; Chen, Z.; Harrell, L.E.; Go, R.C.P. A Polymorphism in SOD2 Is Associated with Development of Alzheimer’s Disease. *Genes, Brain Behav.*, **2007**, *6*, 770–776.
- [189] Jerotic, D.; Matic, M.; Suvakov, S.; Vucicevic, K.; Damjanovic, T.; Savic-Radojevic, A.; Pljesa-Ercegovac, M.; Coric, V.; Stefanovic, A.; Ivanisevic, J.; Jelic-Ivanovic, Z.; McClements, L.; Dimkovic, N.; Simic, T. Association of Nrf2, SOD2 and GPX1 Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients. *Toxins (Basel)*, **2019**, *11*, 1–15.
- [190] Dragicevic, B.; Suvakov, S.; Jerotic, D.; Reljic, Z.; Djukanovic, L.; Zelen, I.; Pljesa-Ercegovac, M.; Savic-Radojevic, A.; Simic, T.; Dragicevic, D.; Matic, M. Association of SOD2 (Rs4880) and GPX1 (Rs1050450) Gene Polymorphisms with Risk of Balkan Endemic Nephropathy and Its Related Tumors. *Med.*, **2019**, *55*, 1–10.
- [191] Miar, A.; Hevia, D.; Muñoz-Cimadevilla, H.; Astudillo, A.; Velasco, J.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C. Manganese Superoxide Dismutase (SOD2/MnSOD)/Catalase and SOD2/GPx1 Ratios as Biomarkers for Tumor Progression and Metastasis in Prostate, Colon, and Lung Cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, **2015**, *85*, 45–55.
- [192] Ma, X.; Chen, C.; Xiong, H.; Fan, J.; Li, Y.; Lin, H.; Xu, R.; Huang, G.; Xu, B. No Association between SOD2 Val16Ala Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis Based on 9,710 Cases and 11,041 Controls. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2010**, *122*, 509–514.
- [193] Méplan, C.; Hughes, D.J.; Pardini, B.; Naccarati, A.; Soucek, P.; Vodickova, L.; Hlavatá, I.; Vrána, D.; Vodicka, P.; Hesketh, J.E. Genetic Variants in Selenoprotein Genes Increase Risk of Colorectal Cancer. *Carcinogenesis*, **2010**, *31*, 1074–1079.
- [194] Chen, C.; Wang, L.; Liao, Q.; Xu, L.; Huang, Y.; Zhang, C.; Ye, H.; Xu, X.; Ye, M.; Duan, S. Association between Six Genetic Polymorphisms and Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, **2014**, *18*, 187–195.
- [195] Marginean, C.; Streata, I.; Ioana, M.; Marginean, O.M.; Padureanu, V.; Saftoiu, A.; Petrescu, I.; Tudorache, S.; Tica, O.S.; Petrescu, F. Assessment of Oxidative Stress Genes SOD2 and SOD3 Polymorphisms Role in Human Colorectal Cancer. *Curr. Heal. Sci. J.*, **2016**, *42*, 356–358.
- [196] Lin, C.-H.; Yang, P.-J.; Lin, S.-H.; Yeh, K.-T.; Tsao, T.C.-Y.; Chen, Y.-E.; Lin, S.-H.; Yang, S.-F. Association between EGFR Gene Mutation and Antioxidant Gene Polymorphism of Non-Small-Cell Lung Cancer. *diagnostics*, **2020**, *10*, 1–11.

- [197] Nikic, P.; Dragicevic, D.; Savic-Radojevic, A.; Pljesa-Ercegovac, M.; Coric, V.; Jovanovic, D.; Bumbasirevic, U.; Pekmezovic, T.; Simic, T.; Dzamic, Z.; Matic, M. Association between GPX1 and SOD2 Genetic Polymorphisms and Overall Survival in Patients with Metastatic Urothelial Bladder Cancer: A Single-Center Study in Serbia. *J. B.U.ON.*, **2018**, *23*, 1130–1135.
- [198] Isono, T.; Chano, T.; Yonese, J.; Yuasa, T. Therapeutic Inhibition of Mitochondrial Function Induces Cell Death in Starvation-Resistant Renal Cell Carcinomas. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 1–12.
- [199] Soerensen, M.; Christensen, K.; Stevnsner, T.; Christiansen, L. The Mn-Superoxide Dismutase Single Nucleotide Polymorphism Rs4880 and the Glutathione Peroxidase 1 Single Nucleotide Polymorphism Rs1050450 Are Associated with Aging and Longevity in the Oldest Old. *Mech. Ageing Dev.*, **2009**, *130*, 308–314.
- [200] Tang, N.P.; Wang, L.S.; Yang, L.; Gu, H.J.; Sun, Q.M.; Cong, R.H.; Zhou, B.; Zhu, H.J.; Wang, B. Genetic Variant in Glutathione Peroxidase 1 Gene Is Associated with an Increased Risk of Coronary Artery Disease in a Chinese Population. *Clin. Chim. Acta*, **2008**, *395*, 89–93.
- [201] Yeh, H.L.; Kuo, L.T.; Sung, F.C.; Yeh, C.C. Association between Polymorphisms of Antioxidant Gene (MnSOD, CAT, and GPx1) and Risk of Coronary Artery Disease. *Biomed Res. Int.*, **2018**, *2018*.
- [202] Teimoori, B.; Moradi-shahrehabak, M.; Razavi, M.; Rezaei, M.; Harati-Sadegh, M.; Salimi, S. The Effect of GPx-1 Rs1050450 and MnSOD Rs4880 Polymorphisms on PE Susceptibility: A Case- Control Study. *Mol. Biol. Rep.*, **2019**, *46*, 6099–6104.
- [203] Chen, J.; Cao, Q.; Qin, C.; Shao, P.; Wu, Y.; Wang, M.; Zhang, Z.; Yin, C. GPx-1 Polymorphism (Rs1050450) Contributes to Tumor Susceptibility: Evidence from Meta-Analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2011**, *137*, 1553–1561.
- [204] Wang, C.; Zhang, R.; Chen, N.; Yang, L.; Wang, Y.; Sun, Y.; Huang, L.; Zhu, M.; Ji, Y.; Li, W. Association between Glutathione Peroxidase-1 (GPX1) Rs1050450 Polymorphisms and Cancer Risk. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2017**, *10*, 9527–9540.
- [205] Cao, M.; Mu, X.; Jiang, C.; Yang, G.; Chen, H.; Xue, W. Single-Nucleotide Polymorphisms of GPX1 and MnSOD and Susceptibility to Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Tumor Biol.*, **2014**, *35*, 759–764.

Spisak skraćenica:

KSR: kiseonični slobodni radikali

ROS: engl. *reactive oxygen species*

NADPH: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

DNK: dezoksiribonukleinska kiselina

8-OhdG: 8-hidroksideoksiguanozin

Nrf2, NFE2L2: engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

Keap1: engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*

HIF: engl. *hypoxia-inducible factor*

pVHL: engl. *von Hippel Lindau proteine*

HRE: engl. *hypoxia responsive elements*

VEGF: engl. *vascular endothelial growth factor*

GSH: glutation

WTX: engl. *Wilms tumor gene on the X chromosome*

ARE: engl. *antioxidant response element*

GST: glutation S-transferaza

JNK1: engl. *c-Jun N-terminal kinase 1*

SOD: superoksid dizmutaze

GPX: glutation peroksidaza

sKBP: svetloćelijski karcinom bubrežnog parenhima

TNM: engl. *tumour-node-metastasis stage classification*

SNP: engl. *single nucleotide polymorphisms*

Ile: izoleucin

Ala: alanin

Val: valin

Pro: prolin

SZO: Svetska zdravstvena organizacija

ITT: indeks telesne težine

EDTA: etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina

PCR: engl. *polymerase chain reaction*

PCR-CTTP: engl. *polymerase chain reaction with confronting two-pair primers*

C/C: citozin/citozin

C/A: citozin/adenin

A/A: adenin/adenin

OR: engl. *odds ratio*

IP: interval poverenja

HR: engl. *hazard ratio*

## Biografija

Smiljana Mihailović rođena je u Šapcu 1992. godine gde je završila osnovnu i srednju školu sa odličnim uspehom. Upisala je osnovne akademske studije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2011. godine. Tokom prvih godina studija pokazala je interesovanje za bavljenjem naučno-istraživačkim radom, te se od 2013. godine priključila radu na eksperimentima u Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju i do završetka studija je iz oblasti oksidativnog stresa napisala četiri studentska rada kao prvi autor. Tokom 2014. godine postala je član uredništva Medicinskog podmlatka, a zatim je 2016. i 2017. godine obavljala ulogu glavnog urednika. Učestvovala je na brojnim studenstkim inostranim konferencijama i izlagala rezultate svojih radova. Nosilac je opštinskih i republičkih stipendija, među kojima je i „Dositejeva“ stipendija Republike Srbije. Imala je priliku da kao student učestvuje na studentskoj razmeni u Univerzitetnoj bolnici *Parc Tauli* u Španiji. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2017. godine sa prosekom 9,76/10,00.

Po završenim osnovnim akademskim studijama 2017. godine upisala je doktorske akademske studije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na modulu Biologija tumora i oksidativna oboljenja, čime je nastavila svoj višegodišnji naučno-istraživački rad započet još tokom osnovnih studija. Tokom 2018. godine, paralelno sa doktorskim studijama upisala je specijalizaciju iz oblasti Pedijatrije i zaposlila se kao doktor medicine na Odeljenju neonatologije u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni front“ u Beogradu. Time je započela svoju stručnu edukaciju kao pedijatar, da bi 2022. godine položila specijalistički ispit i postala specijalista pedijatrije. Sve vreme tokom svog daljeg usavršavanja nastavila je da se bavi istraživačkim radom, pohađala je i izlagala rezultate istraživanja na inostranim stručnim sastancima, i originalna istraživanja je objavljivala u istaknutim časopisima.

Autor je i koautor pet *in extenso* članaka objavljenim u međunarodnim časopisima, a autor i koautor više od 12 publikacija prikazanim na nacionalnim i inostranim stručnim sastancima.

**Publikovani radovi proizašli kao rezultat istraživanja u okviru doktorata:**

**Mihailovic S**, Coric V, Radic T, Radojevic A.S, Matic M, Dragicevic D, Djokic M, Vasic V, Dzamic Z, Simic T, Hadzi-Djokic J, Pljesa Ercegovac M. *The Association of Polymorphisms in Nrf2 and Genes Involved in Redox Homeostasis in the Development and Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma*; Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2021, DOI:10.1155/2021/6617969.

**Mihailović S**, Džamić Z, Plješa Ercegovac M. *The Role of Redox Homeostasis Biomarkers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Development and Progression*; Med. Podml. 2022, 73(4):34-39, DOI:10.5937/mp73-35557.

**Mihailović S**, Coric V, Radojevic A.S, Matic M, Dragicevic D, Djokic M, Dzamic Z, Simic T, Hadzi-Djokic J, Pljesa Ercegovac M. *Polimorfizmi gena koji kodiraju biomarkere redoks homeostaze utiču na nastanak i progresiju svetloćelijskog karcinom bubrežnog parenhima*. XXV Kongres Urologa Srbije, 2021.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisana Smiljana Mihailović

Broj upisa 5089/2017

### Izjavljujem

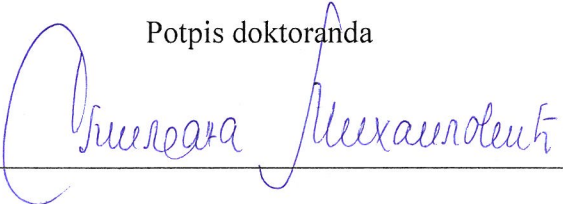
da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Analiza genetskih biomarkera redoks homeostaze kao faktora rizika za nastanak i progresiju svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima“**

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

U Beogradu, 16. 4. 2024.

Potpis doktoranda

  
\_\_\_\_\_

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora: Smiljana Mihailović

Broj upisa: 5089/2017

Studijski program: Biologija tumora i oksidativna oboljenja

Naslov rada: „Analiza genetskih biomarkera redoks homeostaze kao faktora rizika za nastanak i progresiju svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima“

Mentori: Prof. dr Marija Plješa Ercegovac

Prof. dr Zoran Džamić

Potpisani: Smiljana Mihailović

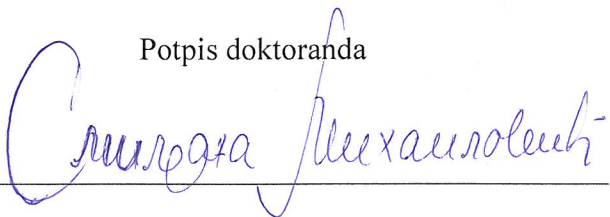
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

U Beogradu, 16.4.2024.

Potpis doktoranda





### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

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

**„Analiza genetskih biomarkera redoks homeostaze kao faktora rizika za nastanak i progresiju svetloćelijskog karcinoma bubrežnog parenhima“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

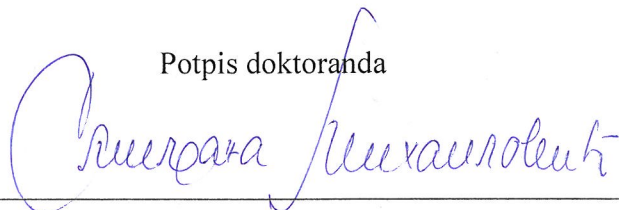
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila:

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

U Beogradu, \_\_\_\_\_

16.4.2024.

Potpis doktoranda



1. Autorstvo –Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade,ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i ukommercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javnosaopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ilidavaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju ijavno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako senavede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca nedozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom seograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje,distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određenod strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnomlicencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanjedela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autorana način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnuupotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javnosaopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ilidavaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licencadozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosnolicencama otvorenog koda.