

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Zorica D. Reljić

**ZNAČAJ GENETSKOG POLIMORFIZMA
GLUTATION TRANSFERAZA U
NASTANKU BALKANSKE ENDEMSKE
NEFROPATIJ**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE**

Zorica D. Reljić

**THE ROLE OF GENETIC
POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE
TRANSFERASES IN THE
DEVELOPMENT OF BALKAN ENDEMIC
NEPHROPATHY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Prof. dr Tatjana Simić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu,
Univerzitet u Beogradu

KOMENTOR:

Dr Dejan Opsenica, naučni savetnik Instituta za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Tatjana Pekmezović**, profesor Medicinskog fakulteta u
Beogradu, Univerzitet u Beogradu
2. **Prof. dr Ana Savić-Radojević**, profesor Medicinskog fakulteta u
Beogradu, Univerzitet u Beogradu
3. **Doc. dr Mario Zlatović**, docent Hemijskog fakulteta u Beogradu,
Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: 10. jul 2015. god.

„U svakodnevnom životu teško prepoznamo da primamo puno više nego što dajemo i da samo uz zahvalnost život postaje bogat.“

Dietrich Bonhoeffer

Izražavam svoju neizmernu zahvalnost:

- svom mentoru, *Prof. dr Tatjani Simić*, na ukazanom poverenju da učestvujem u realizaciji njene ideje o ulozi glutathion transferaza u etiopatogenezi Balkanske endemske nefropatije, nastaloj u Beču pre desetak godina,
- svom komentoru, *Naučnom savetniku dr Dejanu Opsenici*, čije reakcije o bioaktivaciji ohratoksina A su dale multidisciplinarnu širinu ovom delu,
- na uloženom trudu i vremenu, pažljivom isčitavanju disertacije i korisnim sugestijama: *Prof. dr Tatjani Pekmezović, Prof. dr Ani Savić-Radojević, Doc. dr Mariu Zlatoviću, Prof. dr Ljubici Đukanović* i našem učitelju, osnivaču istraživačkog tima o glutathion transferazama, *Prof. dr Jasmini Mimić-Oka*,
- na nesebičnoj pomoći, svim naučnim istraživačima Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu,
- *dr Slobodanu Mariću* i *dr Vesni Pejović*, na dragocenoj pomoći u prikupljanju biološkog materijala,
- dragim kolegicama *dr Jasmini Kragović* i *dr Svetlani Obradović*, na rečima podrške,
- svim učesnicima istraživanja, jer bez njihovog učešća ovaj rad bi bio neizvodljiv,
- svim dragim ljudima, koji su bili uz mene u proteklom vremenu,
- svojoj voljenoj deci, *Ani* i *Pavlu*, na ogromnom razumevanju i bezgraničnoj ljubavi.

„Osvaneš i pogledaš: sve je već tu, i drvo i zmija i kamen i sunce. Ništa na tebe nije čekalo. Ništa se na tebe ne osvrće, ništa tebe ne pita, sve to stoji i ide po svome.

I onda, iz nekog dubljeg inata, iz čega li, kreneš i ti da od blata, od sna, od golog daha, od čega god stigneš nešto, nešto svoje, onako po svome stvoriš. Pustiš to u svet i strepiš: ne znaš hoće li prohodati, progovoriti, hoće li opstati.“

Vasko Popa

Posvećeno mojim roditeljima, Mariji i Dušanu

SAŽETAK

ZNAČAJ GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA U NASTANKU BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE

Zorica Reljić

Cilj: Balkanska endemska nefropatija (BEN) je hronična tubulointersticijska bolest, endemski prisutna u određenim seoskim sredinama Srbije, Bosne, Hrvatske, Bugarske i Rumunije. Kao mogući faktori rizika za nastanak BEN, smatraju se izloženost aristolohičnoj kiselini i ohratoksinu A (OTA). Potencijalna uloga enzima koji metabolišu ksenobitike, kao što su glutation transferaze (GST), u metabolizmu OTA zasniva se na prisustvu konjugata OTA sa glutationom u krvi i urinu bolesnika sa BEN. Kako, glutation transferaze imaju potencijal da konjuguju OTA i njegove metabolite, s jedne strane, i smanje količinu slobodnih radikala nastalih u metabolizmu OTA, s druge strane, postoji mogućnost da GST genotipske varijante, udružene sa odsustvom ili nižom enzimskom aktivnošću, mogu da modifikuju individualnu osetljivost za nastanak BEN. Zbog toga, cilj našeg istraživanja je bio da ispita udruženost genetskog polimorfizma *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* i rizika za nastanak BEN.

Metodologija: Sprovedena studija slučajeva i kontrola je obuhvatala 207 bolesnika sa BEN i 138 zdravih osoba, stanovnika endemskih naselja sa negativnom sa BEN porodičnom anamnezom. Svi učesnici studije su informisani o ciljevima i očekivanim ishodima studije i od njih je dobijen pisani pristanak. Protokol studije je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta (Odluka broj 29/VI-13), i istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom (revidiranom 2000. godine).

Polimorfizmi *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* su određivani u 207 bolesnika sa BEN i 138 zdravih osoba, iz endemskih područja. Analiza *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizma je izvedena korišćenjem metode multipleks reakcije lančanog umnožavanja, dok su polimorfizmi *GSTA1* i *GSTP1* određivani metodama analize polimorfizama dužina restrikcionih fragmenata.

Rezultati: Od ispitivanih *GST* polimorfizama, jedino je polimorfizam *GSTA1* značajno udružen sa rizikom nastanka BEN. Naime, nosioci *GSTA1*B* genske varijante, koja je udružena sa nižom transkripcijom, imaju 1,6 puta veći rizik za nastanak BEN nego nosioci *GSTA1*A/A* genotipa (OR = 1,6; CI = 1,0-2,6; p = 0,037). Štaviše, kada se analizira *GSTA1* genotip u kombinaciji sa *GSTT1* genotipom, najveći rizik za pojavu BEN se dobija u nosioca bar jednog mutantnog *GSTA1*B* alela koji imaju *GSTT1 aktivni* genotip (OR = 2,3; CI = 1,0-5,3; p = 0,046). Ostali testirani *GST* polimorfizmi, *GSTM1* i *GSTP1*, nisu značajno udruženi sa rizikom za nastanka BEN.

Zaključak: Polimorfizmi gena za *GSTA1-1* i *GSTT1-1* su modulatori individualne osetljivosti za nastanak Balkanske endemske nefropatije. S obzirom na dosadašnja saznanja o mogućoj katalitičkoj ulozi *GSTA1* u metabolizmu ohratoksina A, značaj ovog mikotoksina kao etiološkog faktora rizika za nastanak Balkanske endemske nefropatije pruža mogućnost za dalja istraživanja.

Ključne reči: Balkanska endemska nefropatija, biotransformacija, glutathione transferaze, ohratoksin A, genetski polimorfizam.

SUMMARY

THE ROLE OF GENETIC POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE TRANSFERASES IN THE DEVELOPMENT OF BALKAN ENDEMIC NEPHROPATHY

Zorica Reljić

Objective: Balkan endemic nephropathy (BEN) is a chronic tubulointerstitial disease, recognized as endemic in certain rural areas of Serbia, Bosnia, Croatia, Bulgaria, and Romania. Despite extensive research, its etiology is still unknown. Although recent data suggest aristolochic acid as a putative cause of BEN, evidence also exists in favor of ochratoxin A (OTA) exposure as risk factor for the disease. The potential role of xenobiotic metabolizing enzymes, such as the glutathione transferases (GSTs), in OTA biotransformation is based on the presence of OTA glutathione adducts in blood and urine of BEN patients. Since, glutathione transferase have potential to conjugate OTA and its metabolites on one hand, and reduce free radicals that originate from OTA metabolites on the other, it is possible that the *GST* genotype variations, with a consequent absent or lower enzyme activities, may modify individual susceptibility to BEN. Therefore, the aim of our study was to investigate the association between common *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms and BEN susceptibility.

Methodology: The conducted, case-control study comprised 207 BEN patients and 138 healthy individuals, residents of endemic settlements with a negative family BEN history. All the participants provided written informed consent. This study protocol was approved by the Institutional Review Board (permission number 29/VI-13), and the research was carried out in compliance with the Helsinki Declaration (as revised in 2000). *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genotypes were determined in

207 BEN patients and 138 non-BEN healthy individuals, from endemic regions. The analysis of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms was performed using the multiplex polymerase chain reaction method, while the analyses of *GSTA1* and *GSTP1* polymorphisms were determined by the polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphisms.

Results: Among the GST polymorphisms tested, only *GSTA1* was significantly associated with a higher risk of BEN. Namely, carriers of the *GSTA1***B* gene variant, associated with lower transcriptional activation, were at a 1.6-fold higher BEN risk than those carrying the homozygous *GSTA1***A*/*A* genotype (OR = 1.6; CI = 1,0-2,6; p = 0.037). Moreover, when *GSTA1* genotypes are analyzed in combination with *GSTT1* genotype, the highest risk of BEN occurrence is obtained in carriers of at least one mutant *GSTA1***B* allele with the *GSTT1 active* genotype (OR = 2,3; CI = 1,0-5,3; p = 0,046). The other two common GST polymorphisms tested, *GSTM1* and *GSTP1*, were not significantly associated with susceptibility to BEN.

Conclusion: We found that *GSTA1* polymorphism was associated with increased risk of BEN, further suggesting potential role of *GSTA1* in OTA biotransformation.

Keywords: Balkan endemic nephropathy, biotransformation, glutathione transferase, ochratoxin A, genetic polymorphism.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 BALKANSKA ENDEMSKA NEFROPATIJA	1
1.1.1 Faktori spoljašnje sredine	2
1.1.2 Metabolizam ohratoksina A	4
1.2 GLUTATION TRANSFERAZE	7
1.2.1 Klasifikacija citosolnih glutation transferaza	8
1.3 POLIMORFIZMI SEKVENCE DNK	9
1.3.1 Polimorfizmi sekvence DNK i oboljenja čoveka	12
1.4 GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA	13
1.4.1 Genetski polimorfizam <i>GSTA1</i>	13
1.4.2 Genetski polimorfizam <i>GSTM1</i>	14
1.4.3 Genetski polimorfizam <i>GSTP1</i>	15
1.4.4 Genetski polimorfizam <i>GSTT1</i>	17
1.5 GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA U BALKANSKOJ ENDEMSKOJ NEFROPATIJU	18
2. CILJEVI	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1 SELEKCIJA ISPITANIKA	22
3.2 ODREĐIVANJE GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA	23
3.2.1 Izolacija DNK	23
3.2.2 Određivanje genetskog polimorfizma <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i>	24
3.2.3 Određivanje genetskog polimorfizma <i>GSTA1</i>	26
3.2.4 Određivanje genetskog polimorfizma <i>GSTP1</i>	28
3.3 STATISTIČKA ANALIZA	30
4. REZULTATI	32
4.1 DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	32
4.2 GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE	33
4.3 KOMBINOVANI GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE	36
4.4 UTICAJ GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA NA PROGNOZU BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE	41

4.5 UTICAJ KOMBINOVANOG GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA NA PROGNOZU BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE.....	49
4.6 UTICAJ GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA NA POJAVU TUMORA UROTELIJALNOG TRAKTA U BALKANSKOJ ENDEMSKOJ NEFROPATIJ I	59
5. DISKUSIJA.....	65
6. ZAKLJUČCI.....	77
7. LITERATURA	79

1. UVOD

1.1 BALKANSKA ENDEMSKA NEFROPATIJA

Balkanska endemska nefropatija (BEN) je hronična, tubulointersticijska bolest bubrega, nepoznate etiologije, koja se javlja kao porodična bolest sa endemskom raspodelom na ograničenom području Balkana (Slika 1.).



Slika 1. Područja Balkana sa prisutnom endemskom nefropatijom.
(Preuzeto iz: Wikipedia, the free encyclopedia)

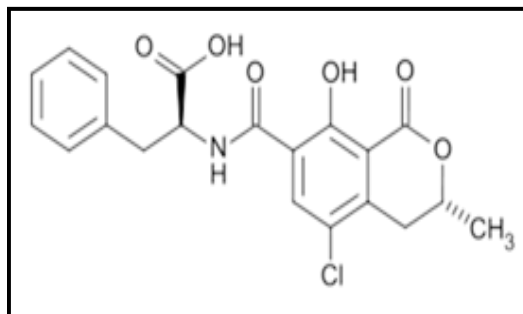
Od svih balkanskih zemalja smatra se da je Srbija najugroženija ovom bolešću: podaci s područja Kolubare ukazuju da se učestalost BEN u ovom delu Srbije ne smanjuje (1,2). Učestalost BEN, poslednjih decenija, je procenjivana na osnovu podataka o broju osoba s ovim oboljenjem koje su započele lečenje hemodijalizom (HD). Prema izveštaju registra bolesnika lečenih dijalizama i transplatacijom u Srbiji i Crnoj Gori iz 2006. godine, bolesnici sa BEN su činili 6,5% populacije koja se

leči hemodijalizama. Zastupljenost bolesnika sa endemskom nefropatijom u centrima za hemodijalizu, smeštenih u blizini područja zahvaćenih BEN, se značajno razlikuju od centra do centra (Leskovac 5%, Požarevac 22,5%, Lazarevac 46%, Bijeljina 64%), što je u skladu sa prvim istraživanjima koja su, takođe, pokazala značajne razlike u učestalosti ove bolesti u pojedinim endemski zahvaćenim područjima (1). Proteklih pedeset godina, primećeno je da se bolest javlja kod sve starijih osoba i da je njen tok sporiji. Veliki procenat bolesnika sa endemskom nefropatijom danas ne doživi terminalnu slabost bubrega već umire od kardiovaskularnih bolesti, pa je procena učestalosti BEN na osnovu incidencije i prevalencije ove bolesti među bolesnicima lečenih hemodijalizama samo grubi pokazatelj učestalosti bolesti (3).

Više naučnih studija se bavilo potencijalnim uzrocima nastanka endemske nefropatije (4-9). Sprovedena istraživanja od polovine prošlog veka do danas, međutim nisu razjasnila etiologiju ove bolesti. Poslednje decenije, intenzivno se ispituje pretpostavka da li u nastanku Balkanske endemske nefropatije značajnu ulogu imaju interakcije između gena i faktora spoljašnje sredine.

1.1.1 Faktori spoljašnje sredine

Danas su aktuelne tri hipoteze o mogućem uzroku BEN. Prva od njih, i ujedno najstarija, pretpostavlja da je ohratoksin A (OTA), rasprostranjeni mikotoksin, značajan faktor rizika za nastanak endemske nefropatije. Naime, nedavno je pokazano da je koncentracija ohratoksina A povećana u serumu bolesnika sa BEN u odnosu na njihove potomke i kontrolnu grupu (9).



Slika 2. Hemijska strukturna formula ohratoksina A.

Iako nema direktnih dokaza o uključenosti glutation transferaza (GST)

u metabolizam ohratoksina A (Slika 2.), po hemijskoj strukturi ovo jedinjenje ima sličnu strukturu supstratima glutation transferaza (10). Indirektni dokazi u prilog činjenice da se ohratoksin A ipak metaboliše GST zavisnim putem, su dobijeni u istraživanju Lebruna i saradnika (11), koji su pokazali da izlaganje primarnih kultura humanih urotelijalnih ćelija OTA uzrokuje velike interindividualne razlike u stepenu oštećenja DNK, koje su povezane sa genetskim polimorfizmima *GSTT1*, *GSTM1* i *GSTP1*.

Drugi potencijalni uzrok BEN, prepoznat poslednjih godina, je izlaganje aristolohičnoj kiselini (AA), koja je prisutna u biljci *Aristolochia clematitis* (Slika 3.). Vučja šapa (*Aristolochia clematitis*) raste u žitnim poljima u endemskim regionima, pa njen sastojak aristolohična kiselina



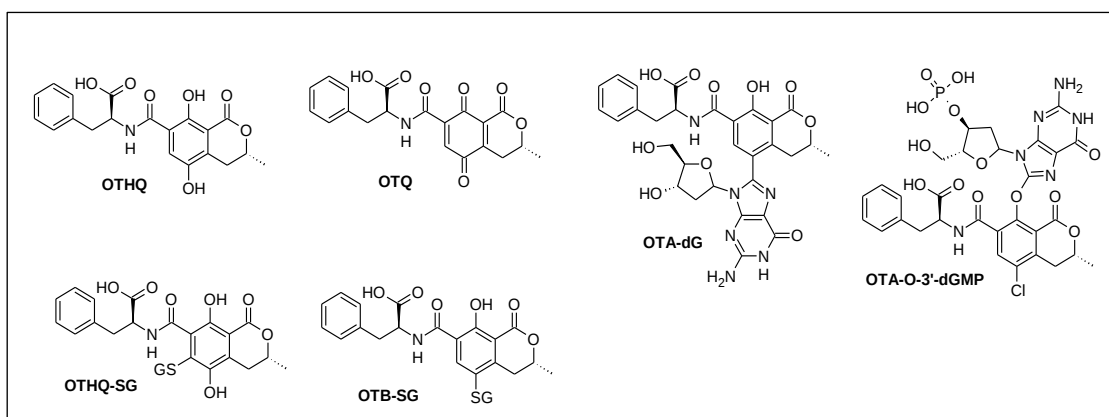
Slika 3. Vučja jabuka.
(Preuzeto iz: Wikipedia, the
free encyclopedia.)

često kontaminira pšenično brašno (6). Uočene su velike sličnosti, ali i razlike između kliničke slike i patohistološkog nalaza nefropatije uzrokovane AA (eng. *aristolochic acid nephropathy* – AAN) u populaciji Kineza i endemske nefropatije (12-14). Pretpostavke o učešću glutation transferaza u metabolizmu ovog jedinjenja su indirektne i zasnovane na činjenici da je *GSTT1* *null* genotip faktor rizika za pojavu sporo progresivnog oblika ove nefropatije kod izloženih osoba (13). Danas je veoma aktuelna hipoteza o aristolohičnoj kiselini, kao uzroku BEN (6). Međutim, kako ova biljka raste širom Evrope, na poljima kako endemskih tako i ne-endemskih sela, teško je prihvatiti da je to jedini ili najznačajniji etiološki faktor (1).

Treći pretpostavljeni uzrok BEN su policiklični aromatični ugljovodonici (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons* – PAHs) poreklom iz lignita (15), koji su dokazani supstrati za GST (16,17). Uzimajući u obzir da su u endemskim područjima Balkana prisutni rudnici lignita, poređenjem koncentracija različitih PAHs u bunarskoj vodi endemskog sela Petka u dolini reke Kolubare, sa vodom iz ne-endemskih sela, Tatu i saradnici (18) su pokazali da su koncentracije različitih policikličnih aromatičnih ugljovodonika 2 - 10 puta više u vodi poreklom iz bunara sela Petka. Međutim, uzročna veza između BEN i izloženosti lignitu nikada nije nedvomisleno potvrđena.

1.1.2 Metabolizam ohratoksina A

U prilog hipotezi da je izloženost ohratoksinu A značajan faktor rizika u nastanku BEN, govori podatak o prisustvu OTA specifičnih DNK konjugata: ohratoksin A - deoksiguanozin (OTA-dG) i ohratoksin A - O - 3'- monofosfat - deoksiguanozin (OTA-O-3'-dGMP) (Slika 4.) u bolesnika sa endemskom nefropatijom iz Srbije, Hrvatske i Bugarske, sa i bez tumora gornjeg urinarnog trakta (12,19).



Slika 4. Hemijske strukturne formule metabolita ohratoksina A i OTA-specifičnih konjugata sa DNK i glutationom.

OTHQ – ohratoksin A-hidrohinon, OTQ – ohratoksin A-hinon.

OTHQ-SG – ohratoksin A-hidrohinon konjugovan sa glutationom,

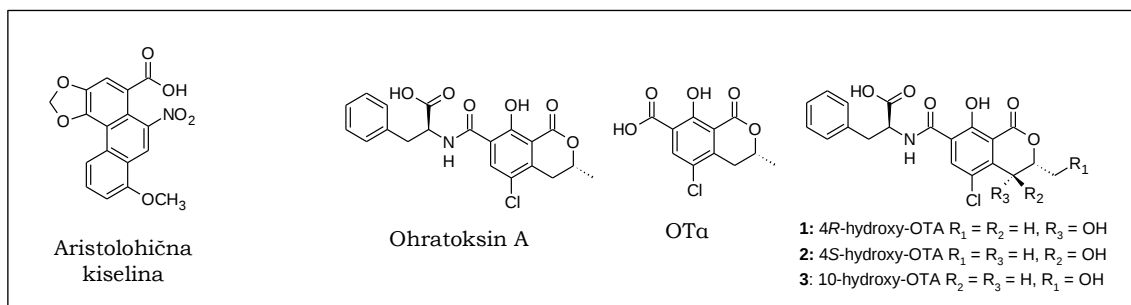
OTB-SG – ohratoksin A-hinon konjugovan sa glutationom,

OTA-dG – ohratoksin A-deoksiguanozin,

OTA-O-3'-dGMP – ohratoksin A-O-3'-monofosfat-deoksiguanozin.

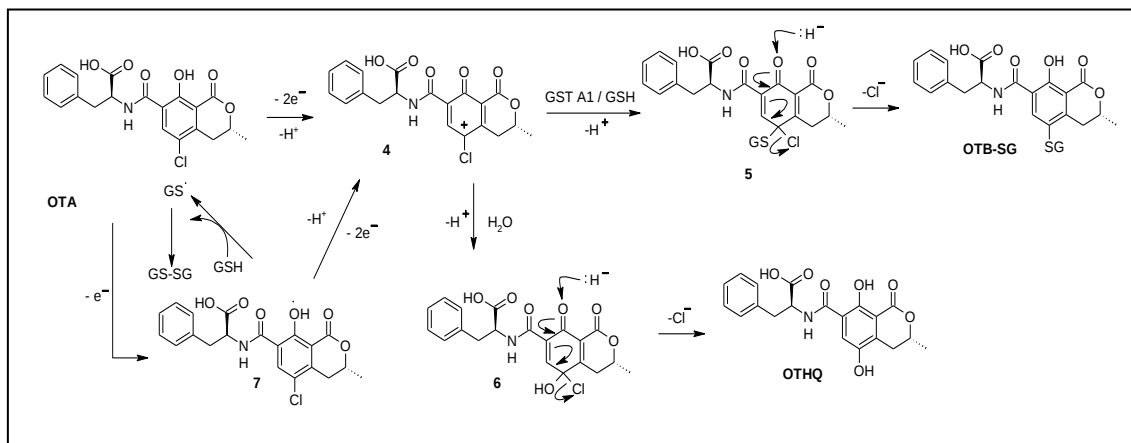
S druge strane, i pored velike rasprostranjenosti ovog mikotoksina, sve izložene osobe neće oboleti od endemske nefropatije (20). Ovi podaci ukazuju, da pored razlike u kumulativnoj dozi i trajanju izloženosti ohratoksinu A, individualna osetljivost, takođe, predstavlja važan faktor rizika za BEN.

Poznato je da se u ljudi, metabolizam OTA odvija u dva pravca. Prvi metabolički put se sastoji od procesa hidrolize (21), pri čemu nastaje ohratoksin α (OT α) i procesa oksidacija (22), čiji različiti proizvodi su prikazani na slici 5.



Slika 5. Hemijske strukturne formule aristolohične kiseline, ohratoksina A i metabolita OTA.

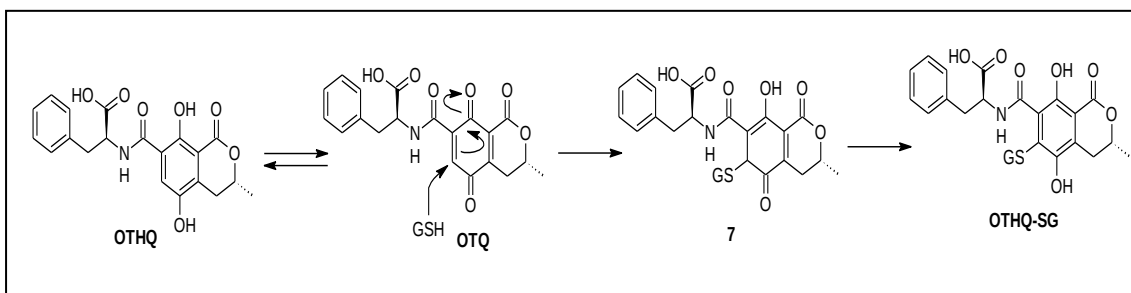
U drugom metaboličkom putu (Slika 6.), proces bioaktivacije može dovesti ne samo do detoksikacije OTA već i do genotoksičnosti ovog mikotoksina (23). Postoje dokazi o ključnoj ulozi karboksipeptidaze A u metabolizmu OTA, koja prevodi OTA u netoksični metabolit OT α i fenilalanin. Međutim, mali procenat OTA se nakon bioaktivacije prevodi u ohratoksin A-hidrohinon (OTHQ, Slika 7.) i ohratoksin A-hinon (OTQ, Slika 7.). Pretpostavlja se da je bioaktivacija OTA u OTHQ i OTQ posredovana enzimima I faze detoksikacije: citohrom P 450 oksidazom 1A1 (CYP1A1) i citohrom P 450 oksidazom 3A4 (CYP3A4) u jetri (23), i verovatno citohrom P 450 oksidazom 3A5 (CYP3A5) u bubrezima (24).



Slika 6. Bioaktivacija ohratoksina A.

Ohratoksin A nije dovoljno reaktivan da stupi u reakciju sa nukleofilima i formira kovalentnu vezu, naročito ne na poziciji ugljenika C(5). Iako je hlor vezan za ugljenik C(5) elektronegativan, prisustvo hidroksilne grupe u *para* - poziciji smanjuje reaktivnost ugljenika C(5). U procesu bioaktivacije, gubitkom dva elektrona i jona vodonika (H^+) nastaje intermedijerni proizvod 4 (katjon stabilizovan rezonacijom) koji ima veću elektrofilnost nego OTA. Nakon reakcije intermedijera 4 sa prisutnim nukleofilom glutationom (GSH) ili vodom, nastaju OTB-SG ili OTHQ, redom (Dobijeno ljubaznošću D. Opsenice, 2013).

U drugoj fazi detoksikacije dolazi do konjugacije sa glutationom (GSH), na šta ukazuje prisustvo konjugata OTHQ i OTA sa glutationom (OTHQ-SG i OTB-SG, redom) u krvi i urinu obolelih od endemske nefropatije (25).



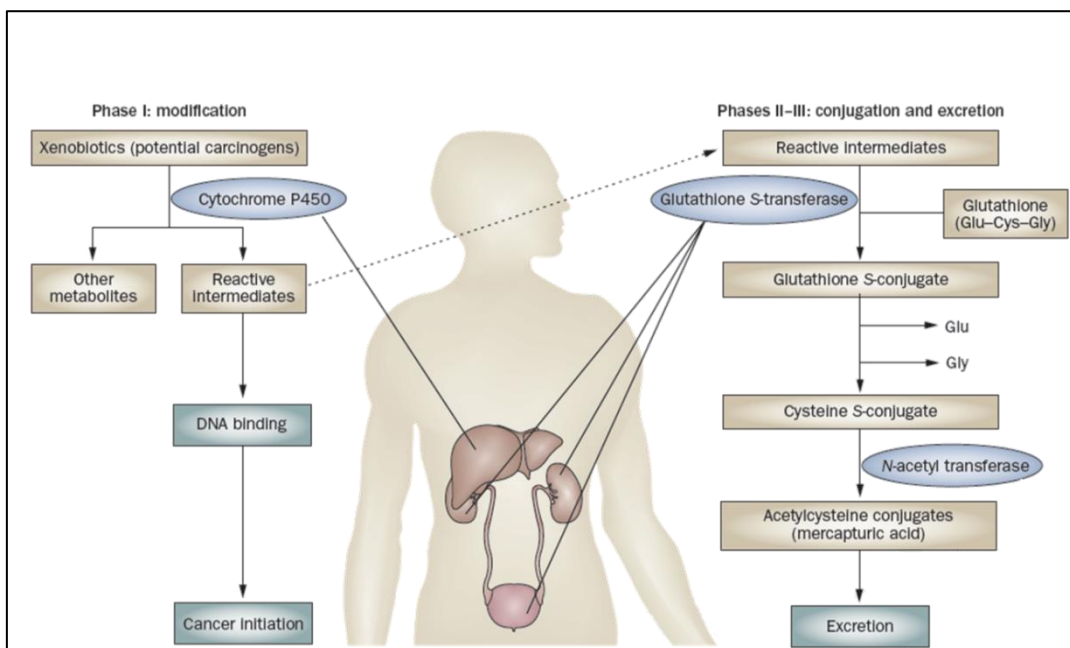
Slika 7. Nastanak konjugata ohratoksin A-hidrohinona sa GSH.

Ohratoksin A-hinon, koji se nalazi u dinamičkom redoks ekvilibrijumu sa OTHQ, reaguje sa GSH kao Majklov akceptor pri čemu nastaje konjugat OTHQ-SG (Dobijeno ljubaznošću D. Opsenice, 2013).

Za razliku od specifičnih konjugata DNK sa ohratoksinom A, OTHQ-SG i OTB-SG su stabilna jedinjenja i mogu biti markeri izloženosti ovom mikotoksinu. Međutim, do sada nije poznato da li su ova jedinjenja više ili manje toksična u odnosu na sam ohratoksin A. Takođe, treba naglasiti da reakcije nastanka OTHQ-SG i OTB-SG mogu biti katalisane različitim glutation transferazama. Međutim, uprkos toj činjenici, uloga ovih enzima kao modulatora individualne osetljivosti za nastanak nefropatije u metabolizmu ohratoksina A nije proučavana. Zbog toga je od ogromnog značaja identifikacija enzima uključenih u metabolizam OTA u ljudi, kao i detaljno poznavanje njihove katalitičke specifičnosti.

1.2 GLUTATION TRANSFERAZE

Glutation transferaze su superfamilija enzima koji učestvuju u reakcijama detoksikacije velikog broja elektrofilnih jedinjenja. U procesima detoksikacije (Slika 8.), najčešće se glutation, najvažnije unutarćelijsko, neproteinsko jedinjenje sa slobodnom tiol-grupom, reakcijom konjugacije vezuje za elektrofilne metabolite endogenog i egzogenog porekla (26,27). Konjugacijom sa glutationom, u većini slučajeva, se smanjuje reaktivnost elektrofilnih jedinjenja prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima, kao što su nukleinske kiseline i proteini (28). U većini tkiva distribucija izoenzima glutation transferaza nije uniformna, odnosno, izvesni izoenzimi koji su veoma zastupljeni u jednom organu, u drugim tkivima mogu biti odsutni ili prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Zbog toga, procese detoksikacije i štetne efekte elektrofilnih jedinjenja, u velikoj meri, određuje odgovarajući izoenzimski profil glutation transferaza tih tkiva (29,30).



Slika 8. Procesi detoksikacije elektrofilnih jedinjenja u kojima učestvuju glutation transferaze (31).

(Preuzeto iz: Simić T, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, Matić M, Mimić-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat Rev Urol.* 2009;6(5):281-9., sa dopuštenjem T. Simić, 2014.)

1.2.1 Klasifikacija citosolnih glutation transferaza

Humane glutation transferaze su podeljene u tri familije: citosolnu, mitohondrijalnu i mikrozomalnu familiju. Citosolna familija GST je dalje podeljena na sedam klasa: Alfa, Mi, Omega, Pi, Sigma, Teta i Zeta klasu (32). Klasifikacija citosolnih glutation transferaza je izvršena na osnovu primarne strukture. Članovi iste klase mogu imati više od 90% identičnih sekvenci. Na osnovu kriterijuma Mannervika i saradnika (33) o postojanju minimuma od 50% identičnih sekvenci u okviru iste klase GST, svi poznati eksprimirajući humani geni jedne klase GST su grupisani (eng. *clustered*) na jednom hromozomu. Štaviše, ekson/intron strukture gena glutation transferaza jedne klase su međusobno slične dok se razlikuju od ekson/intron strukture gena drugih klasa (32).

Nomenklaturom, klase GST se obeležavaju slovima grčkog alfabeta (alfa, mi, pi...) ili velikim slovima latinice (A, M, P...). Pripadnici jedne klase se međusobno razlikuju na osnovu obeležavanja subjedinica arapskim brojevima (npr. enzim GSTA1-2 pripada klasi alfa i sastoji se od subjedinica 1 i 2) (32).

Proizvodi ekspresije GST gena su različiti izoenzimi GST koji se međusobno razlikuju po svojih strukturnim, fizičko-hemijskim i imunološkim osobinama. Katalitički aktivni proteini su dimeri subjedinica iste klase. Termin "izoenzimi", kada su u pitanju glutation transferaze, može se koristiti samo u slučajevima kada se govori o glutation transferazama koje su kodirane istim genom, a nastale su alternativnim isecanjem (eng. *alternative splicing*) prekursorske iRNK ili kada se radi o binarnim kombinacijama subjedinica kodiranih različitim GST genama (34,35). Razlog za ograničenu primenu termina "izoenzimi" jeste u samoj definiciji ovog termina. Naime, izoenzimi predstavljaju različite forme jednog enzima koji katališu iste reakcije, dok različite GST pokazuju različitu specifičnost prema supstratima i katališu različite tipove hemijskih transformacija (32). Na osnovu anegdote starih Grka da "lisica zna mnogo stvari, a jež jednu, ali veliku", Josephy (10) smatra glutation transferaze "lisicama" jer su sposobne da katališu biotransformaciju brojnih supstanci, koje pripadaju različitim hemijskim grupama jedinjenja.

Kod ljudi je do sada identifikovano 16 gena koji kodiraju glutation transferaze citosolne familije. U većini tih gena prisutni su funkcionalni genetski polimorfizmi (36-42).

1.3 POLIMORFIZMI SEKVENCE DNK

Dogovoreno je da je genetski polimorfizam koegzistencija najmanje dve genetičke varijante sekvenci (alela) u populaciji s učestalošću najređeg alela među njima većom od 1%, a pod uslovom da se takva učestalost nije mogla održati samo ponovljenim mutacijama.

U humanom genomu postoje različiti tipovi genetskih varijacija (Tabela 1.) (43,44,45). Brojčano najčešći polimorfizmi su tačkasti polimorfizmi odnosno polimorfizmi jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphisms* - SNPs).

Tačkasti polimorfizmi nastaju zamenom jednog nukleotida drugim i u najvećem broju slučajeva, SNPs imaju dva alela u lokusu. Učestalost ređeg alela može biti bilo koja vrednost niža od 50%. Zbog prirodne selekcije i činjenice da se većina SNPs ne nalazi u kodirajućim ili regulatornim sekvencama, ne očekuje se da će češći alel imati bilo kakav važan fenotipski efekat. Međutim, ponekad mehanizam prednosti heterozigota može stvoriti stabilan polimorfizam iako je alel štetan kada je u homozigotnoj formi. Naime, to se dešava kada asimptomatski nosioci recesivnog alela imaju pod određenim uslovima spoljašnje sredine neku prednost u odnosu na neaficirane homozigote (46).

Ponekad, SNPs mogu da se nalaze u okviru sekvenci koje prepoznaje neki restrikcioni enzim. Posledica tih SNPs, poznatih kao polimorfizmi dužina restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphisms* - RFLPs) ili polimorfizmi restrikcionog mesta (eng. *restriction site polymorphisms* - RSPs), je nastanak ili gubitak restrikcionog mesta. Naime, ako se SNP nalazi u okviru sekvence za koju se vezuje restrikcioni enzim, dejstvom enzima stvaraju se DNK fragmenti različitih dužina, koji se zahvaljujući različitoj pokretljivosti razdvajaju u toku elektroforeze.

Od SNPs, složenije genetske varijante su delecioni ili insercioni polimorfizmi, koji mogu biti posledica insercije ili delecije ne samo jednog nukleotida već i dela hromozoma. Delecije koje su veće od 1 kb nazivaju se varijante broja kopija (eng. *copy number variants* - CNVs) i nastaju najčešće usled nejednakog krosingovera ili nejednake razmene između sestrinskih hromatida (eng. *unequal sister chromatid exchange*) (44,46).

Tabela 1. Genetske varijacije u humanom genomu.

Tip genetske varijacije	Definicija	Frekvencija u humanom genomu
SNP	Varijacija u jednom baznom paru nađena u više od 1% hromozoma date populacije.	~ 10 miliona SNPs u humanojoj populaciji
Insercija ili delecija (eng. <i>insertion/deletion variant</i> InDel)	Delecija ili insercija segmenta DNK. Ne uključuje samo male polimorfne promene već i velike hromozomske aberacije. InDel veći od 1 kb se često naziva CNV (eng. <i>copy number variant</i>).	~ 1 milion insercionih/delecionih polimorfizama većih od 1bp u humanom genomu
Polimorfni mikrosateliti tj. polimorfizam kratkih tandemskih ponovaka (eng. <i>short tandem repeat polymorphisms</i> - STRPs)	Sekvence koje sadrže varijabilan broj ponovaka veličine od 1 - 6 bp čija ukupna dužina je manja od 200 bp.	> 1 milion mikrosatelita u humanom genomu ~ 150000 STRPs u humanom genomu
Minisateliti i varijabilan broj tandemskih ponovaka (eng. <i>variable numbers of tandem repeats</i> - VNTRs)	Polimorfne sekvence koje sadrže 20 - 50 kopija ponovaka veličine od 6 - 100 bp	~ 150000 minisatelita, od kojih je ~ 20% polimorfno
„Multisite“ varijanta (eng. <i>multisite variant</i> - MSV)	Kompleksne, SNP slične varijacije sekvenci u segmentalnim duplikacijama genoma	Broj MSVs je trenutno nepoznat
Strukturne varijante intermedijarne veličine (eng. <i>intermediate-sized structural variant</i> - ISV)	Inverzije, delecije ili insercije sekvence DNK veće od 8 kb	297 ISVs je identifikovano u humanom genomu referentne sekvence korišćenjem humane fosmid DNK genomske biblioteke (eng. <i>human fosmid DNA genomic library</i>)
CNV; polimorfizam broja kopija (eng. <i>copy number polymorphism</i> - CNP), veliki CNV (eng. <i>large-scale</i> - LCVs)	Promene u broju kopija veće od 1 kb. Kada je frekvencija CNV veća od 1% naziva se CNP. LCVs su CNVs čija je veličina približna ili veća od 50 kb.	~ 75000 CNVs većih od 50 kb u humanom genomu
Inverzije	Obrnut redosled segmenta DNK nastao zbog prekida na dva mesta u hromozomu	Procene za frekvencije mikroskopski detektibilnih inverzija su od 0,12-0,7% za pericentrične i od 0,1-0,5% za paracentrične
Translokacija	Razmena fragmenta DNK između dva različita hromozoma	1/500 je heterozigot za recipročnu translokaciju i 1/1000 je heterozigot za Robertsonovu translokaciju
Nebalansirane strukturne aberacije	Promenjena ukupna količina hromozomskog materijala (manjak ili višak DNK)	Nebalansirane aberacije se javljaju u približno 1/1500 živorođene dece

Razlike koje postoje u DNK sekvenci različitih ljudi, čineći ih jedinstvenima, u većini slučajeva nemaju efekat. Neke od razlika u humanom genomu utiču na fenotip, stvarajući normalan rang genetski determinisanih osobina koje svakog od nas čine jedinkom, dok su neke patogene, bilo da su same uzrok bolesti ili da čine njenog nosioca predisponiranim za određenu bolest, koja se u zavisnosti od prisustva drugih gena, životnog stila nosioca, faktora spoljašnje sredine ili jednostavno sreće može ali i ne mora ispoljiti.

1.3.1 Polimorfizmi sekvence DNK i oboljenja čoveka

Procenjuje se da su mutacije u našim genima odgovorne za oko 6000 jasno definisanih naslednih bolesti i da polimorfizmi sekvence DNK mogu uticati na predispozicije za razvoj hiljade drugih bolesti. Genetski uticaj može biti jedini dovoljan faktor za ispoljavanje bolesti, ili samo neznatna komponenta iz skupa različitih faktora udruženih sa multifaktorijalnim bolestima. Genetski faktori u multifaktorijalnim bolestima su uglavnom predstavljeni kombinacijama polimorfizama sekvence DNK koji mogu imati kumulativan efekat (47). Između genetskih faktora i faktora spoljašnje sredine moguće su različite interakcije. Zbog toga, efekti genetske predispozicije za nastanak određene bolesti u prisustvu faktora rizika, kao i efekti faktora rizika u prisustvu genetske predispozicije zavise i od međusobne interakcije (antagonizma ili sinergizma) između gena i faktora rizika (48,49). Otkrivanje različitih interakcija između gena i faktora spoljašnje sredine je veoma značajno za zaštitu javnog zdravlja (50). Naime, poslednjih decenija, mnoga istraživanja ukazuju da su određeni SNPs povezani sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (51), nefrotskog sindroma (52), različitih malignih oboljenja (53-57). Primenom saznanja dobijenih proučavanjem genetskih polimorfizama, faktora rizika i

njihovih međusobnih interakcija moguće je sprovesti skrining (eng. *screening*) osoba sa povećanim rizikom za određene bolesti (58, 59).

1.4 GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA

Već izvesno vreme se pretpostavlja da različita ekspresija određenih izoenzima glutation transferaza uzrokovanih genetskim polimorfizmima, mogu uticati na predispoziciju za nastanak različitih oboljenja koja su direktno povezana sa faktorima sredine, kao što su i duvanski dim, izduvni gasovi i drugi polutanti spoljašnje sredine (60). Kod ljudi, genetski polimorfizmi su prisutni u većini gena različitih klasa glutation transferaza, od kojih su klinički najznačajniji delecioni polimorfizmi *GSTM1* i *GSTT1* gena i funkcionalni polimorfizmi jednog nukleotida *GSTA1* i *GSTP1* gena.

1.4.1 Genetski polimorfizam *GSTA1*

Humani geni glutation transferaza alfa klase čine grupu od pet gena (*GSTA1-A5*), lokalizovanu na hromozomu 6 (42). Dve genetske varijante *GSTA1* (*GSTA1*A* i *GSTA1*B*), koje se sastoje od tri vezana SNP: G-52A, C-69T i T-567G u proksimalnom promoteru, imaju za posledicu kvantitativne razlike u ekspresiji i aktivnosti enzima (41,61). Dok zamena baze na poziciji -52 uzrokuje četiri puta nižu hepaticnu ekspresiju u promoterskoj aktivnosti *GSTA1*B* varijante, posledica SNP C-69T je nastanak *Eam 1104I* restrikcionog mesta u *GSTA1*B* alelu (41). Distribucije učestalosti alelnih varijanti *GSTA1* bazirane na analizi polimorfizama dužina restrikcionih fragmenata se razlikuju između pripadnika različitih rasa. Dok pripadnici bele i crne rase imaju sličnu učestalost homozigota *GSTA1*B* alela (*GSTA1 TT* genotip), najmanju učestalost *GSTA1 TT* genotipa imaju pripadnici žute rase (41,61,62).

Enzim *GSTA1-1* katališe detoksikaciju različitih diol-epoksida - kancerogenih metabolita policikličnih aromatičnih ugljovodonika (16).

Od N-oksidovanih heterocikličnih aromatičnih amina, GSTA1-1 inaktivira jedino N-acetoksi-PhIP (N-acetoksi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b]piridin), koji nastaje pri termičkoj obradi mesa (63). GSTA1-1 deluje kao ključni citosolni enzim jetre u sistemskim glutation zavisnim detoksikacijama ksenobiotika endogenog i egzogenog porekla i antioksidantnoj zaštiti, naročito u osoba bez konstitutivne ekspresije GSTM1-1, nastale zbog delecije *GSTM1* gena. Zbog nedovoljne sistemske detoksikacije N-acetoksi-PhIP u jetri kod osoba sa *GSTA1 TT* genotipom, Coles i saradnici (64) su pretpostavili da su osobe sa nižom ekspresijom GSTA1-1, nastalom usled genetskog polimorfizma *GSTA1*, izložene povećanom riziku nastanka kolorektalnog karcinoma. Naime, izoenzimski profil GST sa veoma niskom ekspresijom GSTA1-1 u ćelijama kolona (65), s jedne strane, i povećana izloženost kancerogenima, s druge strane, mogu dovesti do stvaranja DNK-PhIP konjugata i povećanog rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma u osoba sa *GSTA1 TT* genotipom (63,64,66).

1.4.2 Genetski polimorfizam *GSTM1*

Pet izoenzima mi klase je kodirano grupom gena (*GSTM1-5*), koja je lokalizovana na hromozomu 1 (67). Za genetske polimorfizme *GSTM1* odgovorna su četiri različita alela u *GSTM1* genskom lokusu (*GSTM1*A*, *GSTM1*B*, *GSTM1*1x2* i *GSTM1*0*). Dok aleli *GSTM1*A* i *GSTM1*B* kodiraju funkcionalno identične proteine, koji se razlikuju samo u jednoj aminokiselini p.K173N (68), McLellan i saradnici (38) su opisali veliku enzimsku aktivnost u dve osoba iz Saudijske Arabije nastale zbog prisustva dva funkcionalna *GSTM1* gena u tandemu (alel *GSTM1*1x2*) i zaključili da fenotip sa velikom enzimskom aktivnošću, zbog brže detoksikacije, potencijalno može imati veći protektivni efekat prema kancerogenima. Nasuprot velikoj enzimskoj aktivnosti, gubitak enzimске aktivnosti GSTM1-1 se pripisuje homozigotnoj deleciji gena

GSTM1 (36). Za *GSTM1*0* alel se spekulira da je rezultat homolognog nejednakog krosingovera *GSTM1* i *GSTM2* lokusa, koji se nalaze fizički jedan blizu drugoga i imaju 99% identičnu nukleotidnu sekvencu (67,69). Približno polovina pripadnika bele i žute rase je bez prisutnih aktivnih alela (*GSTM1 nulti* genotip), dok je najmanja učestalost *GSTM1 nultog* genotipa (24%) prisutna kod pripadnika crne rase (70).

U većini istraživanja, primarna hipoteza je da osobe sa *GSTM1 nultim* genotipom, zbog nedostatka konstitutivne ekspresije *GSTM1-1*, imaju veći rizik za nastanak karcinoma zbog nemogućnosti adekvatne detoksikacije kancerogenih diol-epoksida nastalih u metabolizmu policikličnih aromatičnih ugljovodonika (58). Međutim, kako su izotiocijanati, nastali razgradnjom glukozinolata prisutnih u povrću, supstrati glutation transferaza i značajni induktori GST i drugih detoksikacionih enzima, pretpostavlja se da *GSTM1 nulti* genotip udružen sa sniženom aktivnošću enzima, možda produžavanjem polu-života izotiocijanata doprinosi potencijalno većoj hemoprotektivnoj ulozi povrća (71,72). Naime, istraživanje Seowa i saradnika (73) je pokazalo da je povećan unos izotiocijanata iz povrća udružen sa nižim rizikom za nastanak kolorektalnog karcinoma u osoba sa *GSTM1 nultim* i *GSTT1 nultim* genotipom.

1.4.3 Genetski polimorfizam *GSTP1*

U genskom lokusu *GSTP1* lokalizovanom na hromozomu 11, Ali-Osman i saradnici (74) su identifikovali tri genetske varijante (*GSTP1*A*, *GSTP1*B* i *GSTP1*C*), koje se sastoje od dva SNP: *Ile105Val* i *Ala114Val*. Pored genetskih varijanti *GSTP1*A* (*105Ile/114Ala*), *GSTP1*B* (*105Val/114Ala*), *GSTP1*C* (*105Val/114Val*), kod ljudi je otkrivena i četvrta varijanta *GSTP1*D* (*105Ile/114Val*) (40). Posledica SNP *A1578G* (*Ile105Val*) je nastanak *Alw26I* restrikcionog mesta u *GSTP1*B* i *GSTP1*C* genetičkoj varijanti (*GSTP1 Val*). Učestalost *GSTP1 Ile/Ile* genotipa u populaciji bele rase je oko 51%, *GSTP1 Ile/Val*

genotipa 42% i *GSTP1 Val/Val* genotipa 7%, najveću zastupljenost *GSTP1 Val/Val* genotipa imaju pripadnici crne, a najmanju pripadnici žute rase (40).

Aktivnost *GSTP1-1* koji na poziciji 105 ima valin je viša prema diol-epoksidima policikličnih aromatičnih ugljovodonika, dok je prema 1-hlor-2,4-dinitrobenzenu (eng. *1-chloro-2,4-dinitrobenzene* - CDNB), supstratu većine citosolnih GST, niža (75). Razlike u efikasnosti prema različitim supstratima su uočene i ranije u istraživanju Zimniaka i saradnika (76), koji su pretpostavili da su razlike u aktivnosti enzima nastale usled promene hidrofobnosti mesta za vezivanje elektrofilnog supstrata. Najvažniji supstrati *GSTP1-1*, diol-epoksidi policikličnih aromatičnih ugljovodonika mogu biti neplanarni i planarni. Hu i saradnici (77), su pokazali da je *hGSTP1-1* (I104,A113) varijanta najefikasnija u detoksikaciji neplanarnih diol-epoksida policikličnih aromatičnih ugljovodonika, koji su mutageniji i kancerogeniji u odnosu na odgovarajuće planarne diol-epoksidi (78). Zbog toga su zaključili da je za aktivnost različitih varijanti *hGSTP1-1* važan oblik molekula diol-epoksida policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Kako se hemijski sastavi policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz različitih izvora (duvanski dim, nepotpuno sagorevanje organskih goriva) međusobno razlikuju, rezultati iz nekoliko studija su ukazali da rizik nastanka karcinoma kod osoba sa određenim *GSTP1* genotipom zavisi od hemijskog sastava policikličnih aromatičnih ugljovodonika kojim je osoba izložena (77,79,80).

Rezultati istraživanja *in vivo*, Hu i saradnika (81) su pokazali da je *hGSTP1-1*(V104,V113) efikasniji u konjugaciji glutationa i (+)-anti-benzo[a]piren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksida [(+)-anti-BPDE] u Hep G2 ćelijama i time u prevenciji modifikacija DNK indukovanih (+)-anti-BPDE nego *hGSTP1-1* (I104,A113) ili *GSTP1-1*(V104,A113). Kako su modeli *in vivo* bliži fiziološkim uslovima nego modeli *in vitro*,

pretpostavili su da bi incidenca karcinoma trebalo da je niža u osoba sa prisutnim valinom na poziciji 105 (81).

1.4.4 Genetski polimorfizam *GSTT1*

Dva člana teta klase solubilnih glutation transferaza su kodirana genima (*GSTT1-2*), lokalizovanim na hromozomu 22 (82). U detoksikaciji pesticida (metil-bromida, etilen-dibromida, etilen oksida) učestvuju citosolne glutation transferaze teta klase (*GSTT1-1*) (37,83,84,85). Za "konjugator" i "ne-konjugator" fenotipove, rezultati istraživanja Pemble i saradnika (37) su pokazali da je odgovoran delecioni polimorfizam *GSTT1* gena. Osobe sa homozigotnom delecijom *GSTT1* gena su bez *GSTT1-1* zavisne enzimske konjugacije ksenobiotika sa glutationom, zbog čega je u tih osoba smanjena mogućnost detoksikacije brojnih kancerogena: 1,2-epoksi-3-buten (metabolit 1,3-butadiena, koji je kancerogen prisutan u divanskom dimu), etilen oksida, metil-bromida. Takođe je pokazano da je gubitak aktivnosti *GST1-1*, usled homozigotne delecije *GSTT1* gena, udružen sa hromozomskim promenama u limfocitima (84,85,86). Homozigotna delecija *GSTT1* gena je prisutna u oko 20% pripadnika bele i crne rase, dok je *GSTT1 nulli* genotip najviše zastupljen u pripadnika žute rase (87,88). Osim delecionog polimorfizma *GSTT1* gena (*GSTT1*0* alel), opisan je i funkcionalni genetski polimorfizam nastao supstitucijom jednog nukleotida (*GSTT1*A* i *GSTT1*B* aleli) (89). Za osobe sa *GSTT1*A/*A* genotipom je pokazano da imaju dva puta višu katalitičku aktivnost prema metil-hloridu nego osobe sa *GSTT1*A/*B* genotipom, dok su eritrociti osoba sa *GSTT1*0/*B* genotipom bez enzimske aktivnosti *GSTT1-1* prema metil-hloridu. Gubitak enzimske aktivnost se pripisuje promeni konformacije enzima, koja je nastala usled supstitucije treonina prolinom (89).

Za razliku od detoksikacije mono-halogenih derivata alifatičnih ugljovodonika, *GSTT1-1* učestvuju u bioaktivaciji halogenih derivata

alifatičnih ugljovodonika sa dva ili više atoma halogena. Bioaktivacijom nastaju nestabilna, reaktivna jedinjenja sa sulfonijum jonom, koja reaguju sa nukleofilnim grupama makromolekulima, DNK i proteina (90-93). Zbog toga, u zavisnosti kojim jedinjenjima su osobe sa *GSTT1 nultim* genotipom izložene, rizik za razvoj karcinoma mokraćne bešike može biti snižen ili povišen (94,95).

1.5 GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA U BALKANSKOJ ENDEMSKOJ NEFROPATIJU

Značaj genetskih polimorfizama *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* u proceni rizika za nastanak Balkanske endemske nefropatije, je ispitivan u svega nekoliko studija (96, 97), dok o ispitivanju distribucije *GSTA1* genotipa u literaturi ne postoje podaci. Međutim, s obzirom na značajnu ekspresiju *GSTA1-1* u proksimalnim tubulima (98), koji su primarno oštećeni u endemskoj nefropatiji, kao i ulozi *GSTA1-1* u sistemskoj detoksikaciji ksenobiotika, od velikog je značaja ustanoviti da li genetski polimorfizam *GSTA1* utiče na rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije.

Dve grupe bugarskih istraživača ispitivale su genetske polimorfizme glutation transferaza u Balkanskoj endemskoj nefropatiji (96,97). Andonova i saradnici (96) su sproveli istraživanje u studiji slučajeva i kontrola (eng. *case-control study*) koja je imala kontrolnu grupu sa endemskog područja (54 pacijenata sa BEN i 104 kontrola), dok je u studiji istraživačke grupe Toncheve (97) kontrolna grupa bila sa ne-endemskog područja (95 pacijenata sa BEN i 112 kontrola). Rezultati njihovih studija su pokazali da je zastupljenost bolesnika sa prisutnim aktivnim alelom *GSTM1* veća u odnosu na kontrolnu grupu, s tim što su rezultati istraživanja Andonove i saradnika (96) pokazali da je veća učestalost *GSTM1 aktivnog* genotipa u bolesnika i statistički značajna. Zbog značajno manje zastupljenosti *GSTM1 nultog* genotipa u bolesnika sa BEN,

zaključak Andonove i saradnika (96) je da su osobe bez prisutnih aktivnih alela *GSTM1* zaštićenije od nastanka endemske nefropatije.

Povezanost *GSTM1* nultog genotipa sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma mokraćne bešike je potvrđena u nekoliko genetsko-epidemioloških studija (94,99,100). Međutim, iako je pokazana povezanost između BEN i tumora urotelijuma (TU) (101), u literaturi ne postoje podaci o povezanosti genetskih polimorfizama glutation transferaza i rizika za nastanak tumora kod bolesnika sa endemskom nefropatijom. Kako je pušenje jedan od najznačajnijih i najviše ispitivanih faktora rizika za nastanak karcinoma urotelijuma, s jedne strane, i kako su kancerogeni duvanskog dima supstrati za gotovo sve ispitivane izoenzime glutation transferaza (102), s druge strane, istraživanje uticaja genetskih polimorfizama *GST* bi neosporno doprinelo rasvetljavanju ne samo etiologije tumora urotelijuma nego i endemske nefropatije. Interesantno je takođe, da uprkos činjenici da se *GSTM1-1* i *GSTA1-1* preklapaju u pogledu specifičnosti prema diol-epoksidima policikličnih aromatičnih ugljovodonika lignita, koji su pretpostavljeni uzrok endemske nefropatije (101), nema podataka da li genetski polimorfizmi ovih enzima imaju kumulativni efekat na rizik za nastanak BEN i udruženih tumora urotelijuma.

Balkanska endemska nefropatija je bolest zemljoradnika (103). Za zemljoradnike je pokazano da više umiru od hronične slabosti bubrega i malignih tumora urotelijuma, najverovatnije zbog izloženosti pesticidima (104). Jedina izvedena epidemiološka studija o genetskom polimorfizmu *GSTT1* u endemskoj nefropatiji, nije pokazala značajne razlike u distribuciji učestalosti *GSTT1* genotipa između bolesnika sa BEN i kontrolne grupe sa endemskog područja (96). Međutim, kako je u bugarskoj studiji bilo uključeno samo 54 bolesnika sa BEN i zbog udruženosti malignih tumora urotelijuma sa BEN, s jedne strane, i prisustva karcinoma mokraćne bešike u osoba izloženih pesticidima

(94), s druge strane, potrebno je sprovesti studiju sa većim brojem ispitanika.

U literaturi, osim istraživanja Andonove i saradnika (96), ne postoje drugi podaci o ispitivanju polimorfizma *GSTP1* u endemskoj nefropatiji. Epidemiološka studija sprovedena u Bugarskoj nije pokazala razlike u distribuciji učestalosti *GSTP1* genotipa između bolesnika sa endemskom nefropatijom i kontrolne grupe (96). O genetskom polimorfizmu *GSTP1* u nastanku karcinoma mokraćnih puteva, u istraživanjima su dobijeni kontradiktorni rezultati (105-108). Moguće objašnjenje nekonzistentnih rezultata je da se hemijski sastavi policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz različitih izvora (duvanski dim, nepotpuno sagorevanje organskih goriva) međusobno razlikuju i da rizik nastanka karcinoma kod osoba sa određenim *GSTP1* genotipom zavisi od hemijskog sastava policikličnih aromatičnih ugljovodonika kojim je osoba izložena (77,79,80). Zbog značajne ekspresije *GSTP1-1* u epitelu mokraćnih puteva i distalnim tubulima bubrega (98,109) i detoksikacije dokazanih uroepitelnih kancerogena: akroleina, diol-epoksida policikličnih aromatičnih ugljovodonika i pojedinih organofosfatnih pesticida (110-113), ispitivanje genetskog polimorfizma *GSTP1 Ile105Val* bi doprinelo rasvetljavanju etiologije endemske nefropatije.

Istraživanje povezanosti između polimorfizma *GST* i nastanka BEN bi pomoglo ne samo određivanju značaja ovih enzima kao modulatora individualne osetljivosti za nastanak nefropatije već bi i indirektno ukazalo na potencijalni uzrok endemske nefropatije na našem području.

Da bismo rasvetlili ulogu polimorfizma različitih klasa *GST* u endemskoj nefropatiji, u našem istraživanju smo se bavili proučavanjem izolovanih i kumulativnih uticaja polimorfizma *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* i *GSTT1* u nastanku i prognozi Balkanske endemske nefropatije.

2. CILJEVI

Ciljevi ove genetsko-epidemiološke studije su:

1. Da se ustanovi distribucija genetskih polimorfizama *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* kod bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom i pripadnika odgovarajuće kontrolne grupe;
2. Da se ispita da li je prisustvo određenog genotipa glutation transferaza, nezavisno ili u kombinaciji sa genotipovima drugih glutation transferaza, udruženo sa povećanim rizikom za nastanak i prognozu Balkanske endemske nefropatije;
3. Da se ispita da li je prisustvo određenog genotipa glutation transferaza, nezavisno ili u kombinaciji sa genotipovima drugih glutation transferaza, udruženo sa povećanim rizikom za nastanak tumora urotelijuma u bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 SELEKCIJA ISPITANIKA

Sprovedena je studija slučajeva i kontrola, u koju je bilo uključeno 207 bolesnika sa dijagnozom Balkanske endemske nefropatije sa područja Bijeljine, Šamca i Lazarevca. Kriterijumi za uključivanje ispitanika u studiju su bili epidemiološki, klinički i ehosonografski verifikovano prisustvo endemske nefropatije (114). Bolesnici sa BEN su lečeni u dva centra za hemodijalizu Republike Srpske (Bijeljina i Šamac) i u jednom centru Republike Srbije (Lazarevac). Kontrolnu grupu je činilo 138 ispitanika, stanovnika endemskih područja sa negativnom porodičnom anamnezom za BEN. Mečovani po uzrastu i polu (+/-2 godine), ispitanici kontrolne grupe su uključeni u studiju u toku sistematskih pregleda odraslih stanovnika endemskih sela istih endemskih regiona, koji su sprovedeni od januara do decembra 2012. godine, u cilju ranog otkrivanja BEN i drugih hroničnih bolesti bubrega. Kriterijumi za uključivanje osoba koje su sačinjavale kontrolnu grupu su bili klinički, laboratorijski i ehosonografski verifikovano odsustvo endemske nefropatije, kao i drugih bubrežnih bolesti, hipertenzije, dijabetesa i malignih tumora.

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u revidiranoj verziji Helsinške deklaracije iz 2000. godine i sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu (Odluka broj 29/VI-13). Biološki materijal, koji je korišćen u studiji, kao i lični podaci su dobijeni od osoba koje su obaveštene o ciljevima i očekivanim ishodima studije i od njih je dobijen pisani pristanak.

Za prikupljanje podataka o izloženosti pretpostavljenim faktorima rizika sredine za nastanak Balkanske endemske nefropatije, korišćen je strukturisani epidemiološki upitnik, napravljen u Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Upitnik je sadržao

pitanja o starosti, polu, mestu rođenja i stanovanja, antropometrijskim parametrima, zanimanju, pušenju, dužini pušačkog staža, dužini i načinu lečenja bolesti, prisustvu BEN u užoj i široj porodici i prisustvu malignih tumora mokraćnih puteva. Pre upotrebe, upitnik je validiran korišćenjem odgovarajućih procedura.

3.2 ODREĐIVANJE GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA

Delecioni polimorfizmi *GSTM1* i *GSTT1* gena su određivani multipleks reakcijom lančanog umnožavanja, multiplex PCR (eng. *multiplex polimerase chain reaction*), a polimorfizmi jednog nukleotida *GSTA1* i *GSTP1* gena analizom polimorfizama dužina restrikcionih fragmenata, PCR-RFLPs (eng. *polimerase chain reaction - restriction fragment length polymorphisms*).

Krv, korišćena za izolaciju DNK, je uzimana u vakutejnere sa EDTA, alikvotirana i čuvana na -20°C do izolacije DNK.

3.2.1 Izolacija DNK

Korišćenjem QIAamp® DNA mini kita (*QIAGEN Group*) izolovana je genomska DNK iz leukocita periferne krvi.

Delovanjem deterdženta, lizirane su ćelijske membrane leukocita krvi, dok su enzimskom digestijom proteinaze K uklonjeni histoni i ostali proteini vezani za DNK. Dobijeni lizat je prenet u QIAamp® mini spin kolonu sa silika-membranom, koja selektivno vezuje DNK. Sadržaj soli i pH lizata, omogućava pored optimalnog vezivanja DNK za silika-membranu da se proteini i ostali kontaminanti, koji mogu da inhibiraju PCR reakciju, ne zadržavaju na QIAamp® membrani. Zaostali kontaminanti su uklonjeni postupkom ispiranja vezane DNK sa dva različita pufera za ispiranje iz QIAamp® DNA mini kita. Na kraju je DNK eluirana sa kolone puferom 10 mM Tris HCl,

0.5 mM EDTA pH 9.0, alikvotirana i čuvana na -20°C do izvođenja PCR reakcija.

3.2.2 Određivanje genetskog polimorfizma *GSTM1* i *GSTT1*

Delecioni genetski polimorfizmi *GSTM1* i *GSTT1* su određivani po modifikovanoj, multipleks PCR metodi Abdel-Rahmana i saradnika (115).

Fragmenti izolovane genomske DNK su umnoženi u PCR reakcionoj smeši ukupne zapremine od 25 µL, koja je sadržala po 7,5 pmol sledećih prajmera:

GSTM1: *Forward*, 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'

Reverse, 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'

GSTT1: *Forward*, 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'

Reverse, 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'

Umesto *CYP1A1* gena kao interna pozitivna kontrola je umnožen *β-globin* gen korišćenjem sledećih prajmera (116):

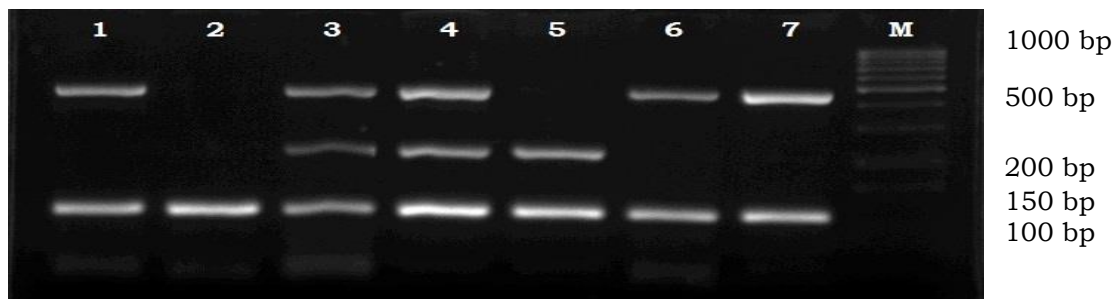
β-globin: *Forward*, 5'-ACACAACTGTGTTCCTACTAGC-3'

Reverse, 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

Genomska DNK uzorka (~50 ng) je dodavana u PCR reakcionu smešu, koja je sadržala po 7,5 pmol svih prajmera i 12,5 µL PCR Master Mix (2X) (*Fermentas*, USA) u ukupnoj zapremini od 25 µL reakcione smeše. (PCR Master Mix (2X) sadrži: 0,05U/µL *Taq* DNK polimeraze, 4 mmol MgCl₂ i 0,4 mmol dNTP u reakcionom puferu.)

Inicijalna denaturacija genomske DNK uzorka, na temperaturi od 94°C, je trajala 4 minuta. Zatim je usledilo 30 ciklusa u kojima su se smenjivala tri koraka: denaturacija na 94°C (30 sec), pripajanje prajmera (eng. *annealing*) na 59°C (30 sec) i ekstenzija prajmera na 72°C (45 sec). Nakon poslednjeg ciklusa, finalna ekstenzija je trajala 5 minuta na 72°C pre hlađenja.

Posle reakcije lančanog umnožavanja, prisustvo i veličine dobijenih PCR proizvoda su provereni elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Elektroforeza je trajala 21 minut pri naponu od 125V (0.27A i 50W). Za vizuelizaciju izdvojenih DNK traka korišćena je fluorescencija etidijum-bromida pri ekspoziciji gela UV zracima na 302 nm, korišćenjem gama kamere (GL200 Camera) Gel Logic Imaging System (Kodak). Svaka serija uzoraka uključivala je pozitivnu i negativnu kontrolu. Prisutna traka veličine 110 bp (bazni par) je ukazivala na prisustvo β -globin gena i predstavljala je internu pozitivnu kontrolu. DNK uzorci sa *aktivnim* genotipom *GSTM1* (homozigotnim ili heterozigotnim genotipom) su imali prisutnu traku veličine 215 bp, dok na *aktivni* genotip *GSTT1* (homozigotni ili heterozigotni genotip) je ukazivala traka veličine 480 bp; odsustvo traka veličine 215 bp i 480 bp ukazivalo je na homozigotnu deleciju gena za *GSTM1* (*GSTM1 nulti* genotip) i gena za *GSTT1* (*GSTT1 nulti* genotip) (Slika 9.).



Slika 9. Analiza genetskih varijanti *GSTM1* i *GSTT1* multipleks PCR metodom.

U svim trakama prisutna je traka veličine 110 bp, odnosno β -globin gen i predstavlja internu pozitivnu kontrolu. M-marker molekulske veličine (broj baznih parova).

Trake 1, 6 i 7 pokazuju traku veličine 480 bp, odnosno prisustvo *GSTT1* *aktivnog* genotipa (homozigoti +/+ ili heterozigoti +/-) i odsustvo trake veličine 215 bp, odnosno prisustvo *GSTM1* *nultog* genotipa (homozigoti -/-).

Traka 2 pokazuje odsustvo traka veličine 480 bp i 215 bp, odnosno prisustvo *GSTT1* *nultog* i *GSTM1* *nultog* genotipa (homozigot -/-).

Trake 3 i 4 pokazuju trake veličine 480 bp i 215 bp, odnosno prisustvo *GSTT1* *aktivnog* i *GSTM1* *aktivnog* genotipa (homozigoti +/+ ili heterozigoti +/-).

Traka 5 pokazuje traku veličine 215 bp, odnosno prisustvo *GSTM1* *aktivnog* genotipa (homozigot +/+ ili heterozigot +/-) i odsustvo trake veličine 480 bp, odnosno prisustvo *GSTT1* *nultog* genotipa (homozigoti -/-).

3.2.3 Određivanje genetskog polimorfizma GSTA1

Tačkasti polimorfizam GSTA1 C-69T je određivan analizom polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata po modifikovanoj PCR-RFLP metodi Pinga i saradnika (61).

PCR reakciona smeša u kojoj je umnožen fragment veličine 400 bp izolovane genomske DNK, sadržala je sledeće prajmere:

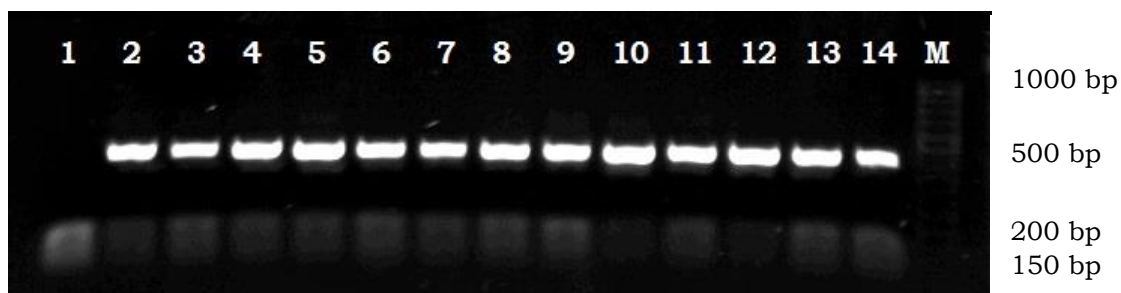
GSTA1: *Forward*, 5'-GCATCAGCTTGCCCTTCA-3'

Reverse, 5'-AAACGCTGTCACCGTCCTG-3'

U PCR reakcionu smešu, koja je sadržala po 12,5 pmol oba prajmera i 12,5 µL PCR Master Mix (2X) (*Fermentas*, USA) u ukupnoj zapremini od 25 µL smeše, dodavano je približno 50 ng genomske DNK uzorka. Svaka serija uzoraka uključivala je negativnu kontrolu.

Početna denaturacija uzorka genomske DNK u PCR reakcionoj smeši, na temperaturi od 94°C, je trajala 4 minuta. Potom su usledila 33 ciklusa u kojima su se ponavljala tri koraka: denaturacija (94°C, 20 sec), pripajanje prajmera (58°C, 20 sec) i ekstenzija prajmera (72°C, 40 sec). Nakon poslednjeg ciklusa, finalna ekstenzija je trajala 5 minuta na 72°C pre hlađenja.

Posle reakcije lančanog umnožavanja a pre digestije restrikcionim enzimom *Eam 1104I* (*Fermentas*, USA), elektroforezom na 1% agaroznom gelu je provereno prisustvo traka veličine 400 bp dobijenih PCR proizvoda, koji odgovaraju GSTA1 genu. Elektroforeza je trajala 15 minuta pri naponu od 125V (0.27A i 50W). Za vizuelizaciju prisutnih DNK traka korišćena je fluorescencija etidijum-bromida pri ekspoziciji gela UV zracima na 302 nm, korišćenjem gama kamere (GL200 Camera) Gel Logic Imaging System (*Kodak*) (Slika 10.).



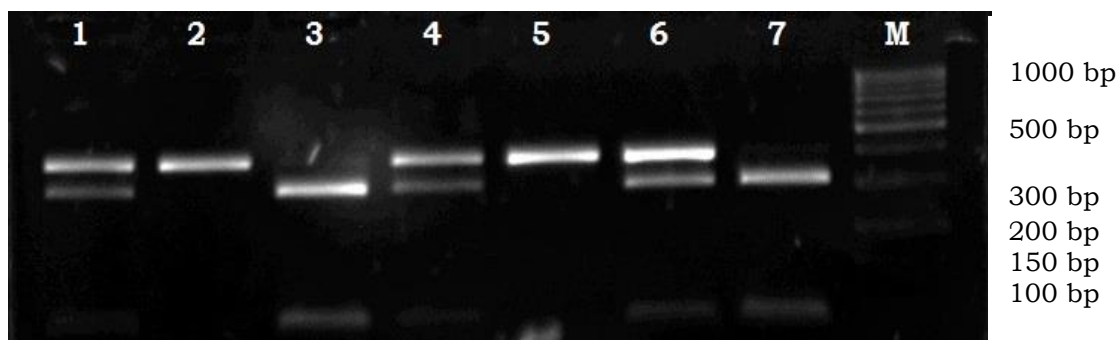
Slika 10. Identifikacija *GSTA1* genotipa.

Sve trake pokazuju traku veličine 400 bp, odnosno prisustvo *GSTA1* gena, osim trake 1 koja predstavlja negativnu kontrolu.

M-marker molekulske veličine (broj baznih parova).

Za analizu polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata *GSTA1* gena je izvedena restrikciona digestija dobijenih PCR proizvoda, korišćenjem 2 U restrikcionog enzima *Eam 1104I* i 5 μ L PCR proizvoda u 1 X Tango™ puferu (*Fermentas, USA*) u ukupnoj zapreminu od 20 μ L reakcione smeše. Svaka serija uzoraka je uključivala negativnu kontrolu. Digestija je trajala 12 sati na 37°C u vodenom kupatilu.

Nakon digestije, nastali fragmenti različitih veličina su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Elektroforeza je trajala 16 minuta pri naponu od 125V (0.27A i 50W). Za vizuelizaciju izdvojenih DNK traka korišćena je fluorescencija etidijum-bromida nastala izlaganjem gela UV zracima na 302 nm, korišćenjem gama kamere (GL200 Camera) Gel Logic Imaging System (*Kodak*). Na prisutno restrikciono mesto u *GSTA1* genu ukazuje prisustvo dva fragmenta veličine 308 bp i 92 bp. DNK uzorci sa *GSTA1 CC* genotipom su imali prisutnu traku veličine 400 bp, dok uzorci DNK sa *GSTA1 TT* genotipom su imali dve prisutne trake veličine 308 bp i 92 bp. Na prisustvo heterozigotnog *GSTA1 CT* genotipa ukazivale su tri trake veličine 400 bp, 308 bp i 92 bp (Slika 11.).



Slika 11. Analiza genetskih varijanti *GSTA1* C-69T, PCR-RFLP metodom. Trake 2 i 5 pokazuju traku veličine 400 bp, odnosno prisutan *GSTA1* CC genotip. Trake 1, 4 i 6 pokazuju trake veličine 400 bp, 308 bp i 92 bp, odnosno prisutan *GSTA1* CT genotip. Trake 3 i 7 pokazuju trake veličine 308 bp i 92 bp, odnosno prisutan *GSTA1* TT genotip. M-marker molekulske veličine (broj baznih parova).

3.2.4 Određivanje genetskog polimorfizma *GSTP1*

Polimorfizam jednog nukleotida *GSTP1* A1578G (*Ile105Val*) je određivan analizom polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata po modifikovanoj PCR-RFLP metodi Harriesa i saradnika (39).

Fragment genomske DNK veličine 176 bp je umnožen u PCR reakcionoj smeši, korišćenjem sledećih prajmera:

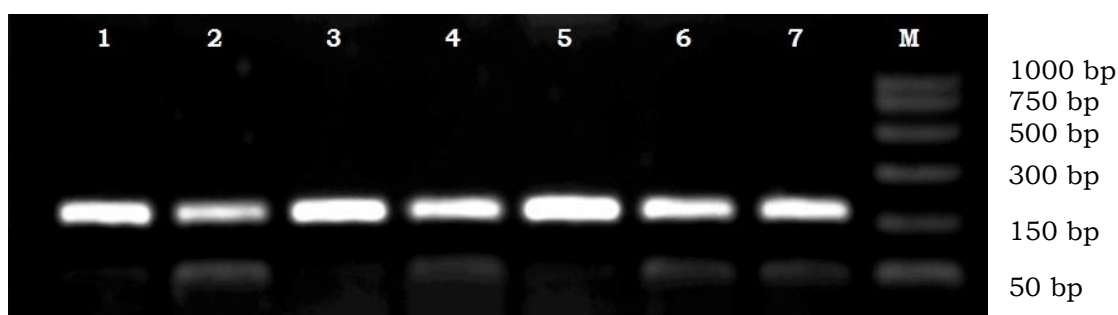
GSTP1: *Forward*, 5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'

Reverse, 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'

Približno 50 ng genomske DNK uzorka je dodavano u PCR reakcionu smešu, koja se sastojala od 12,5 pmol oba prajmera i 12,5 μ L PCR Master Mix (2X) (*Fermentas*, USA) u ukupnoj zapremini od 25 μ L reakcione smeše. Svaka serija uzoraka je uključivala negativnu kontrolu.

Uzorci genomske DNK su inicijalno denaturisani na temperaturi od 94°C u trajanju od 4 minuta. Zatim su usledila 33 ciklusa u kojima su se ponavljala tri koraka: denaturacija (94°C, 20 sec), pripajanje prajmera (60°C, 20 sec) i ekstenzija prajmera (72°C, 30 sec). Nakon poslednjeg ciklusa a pre hlađenja, finalna ekstenzija na 72°C je trajala 5 minuta.

Pre digestije restrikcijom enzimom *Alw 261* (*Fermentas, USA*), a nakon završene reakcije lančanog umnožavanja, elektroforezom na 2% agaroznom gelu je provereno prisustvo traka veličine 176 bp dobijenih PCR proizvoda, koji odgovaraju *GSTP1* genu. Elektroforeza je trajala 15 minuta pri naponu od 125V (0.27A i 50W). Fluorescencija etidijum-bromida pri ekspoziciji gela UV zracima na 302 nm je korišćena za vizuelizaciju prisutnih DNK traka gama kamerom (GL200 Camera) Gel Logic Imaging System (*Kodak*) (Slika 12).



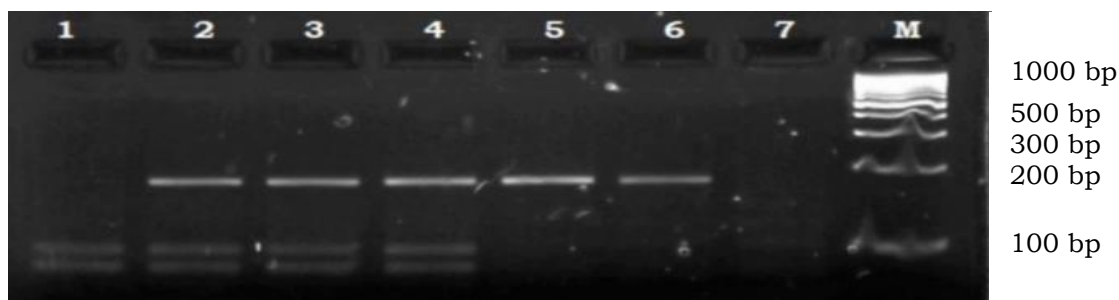
Slika 12. Identifikacija *GSTP1* genotipa.

Sve trake pokazuju traku veličine 176 bp, odnosno prisustvo *GSTP1* gena.
M-marker molekulske veličine (broj baznih parova).

Za analizu polimorfizma dužina restrikcijonih fragmenata *GSTP1* gena je izvedena restrikcijona digestija dobijenih umnoženih proizvoda, veličine 176bp, korišćenjem 2 U restrikcijonog enzima *Alw 261* i 5 μ L PCR proizvoda u 1 X Tango™ puferu (*Fermentas, USA*) u ukupnoj zapremini od 20 μ L reakcione smeše. Svaka serija uzoraka je uključivala negativnu kontrolu. Digestija je trajala 12 sati na 37°C u vodenom kupatilu.

Nakon digestije, elektroforezom na 3,5% agaroznom gelu su razdvojeni nastali fragmenti različitih veličina. Elektroforeza je trajala 19 minuta pri naponu od 150V (0.27A i 50W). Za vizuelizaciju izdvojenih DNK traka korišćena je fluorescencija etidijum-bromida pri ekspoziciji gela UV zracima na 302 nm, korišćenjem gama kamere (GL200 Camera) Gel Logic Imaging System (*Kodak*). Dva fragmenta, veličine 91 bp i 85 bp, ukazuju na prisustvo restrikcijonog mesta u

GSTP1 genu. DNK uzorci sa *GSTP1* AA genotipom (*GSTP1* Ile/Ile) su imali prisutnu traku veličine 176 bp, dok uzorci DNK sa *GSTP1* GG genotipom (*GSTP1* Val/Val) su imali prisutne dve trake veličine 91 bp i 85 bp. Na prisustvo heterozigotnog *GSTP1* AG genotipa (*GSTP1* Ile/Val) ukazivale su tri trake veličine 176 bp, 91 bp i 85 bp. Svaka serija uzoraka je uključivala negativnu kontrolu (Slika 13.).



Slika 13. Analiza genetskih varijanti *GSTP1* A1578G, PCR-RFLP metodom. Traka 1 pokazuje trake veličine 91 bp i 85 bp, odnosno prisutan *GSTP1* GG genotip. Trake 2, 3 i 4 pokazuju trake veličine 176 bp, 91 bp i 85 bp, odnosno prisutan *GSTP1* AG genotip. Trake 5 i 6 pokazuju traku veličine 176 bp, odnosno prisutan *GSTP1* AA genotip. Traka 7 predstavlja negativnu kontrolu. M-marker molekulske veličine (broj baznih parova).

3.3 STATISTIČKA ANALIZA

U našoj studiji, statistička analiza uključivala je: deskriptivnu statistiku i X^2 test za proveru da li se genotipovi *GSTA1* i *GSTP1* studijske i kontrolne grupe nalaze u Hardy-Weinbergovom ekvilibrijumu kao i za određivanje značajnosti razlike u distribuciji frekvencija dobijenih genotipova između studijske i kontrolne grupe. Efekti genetskih polimorfizama glutation transferaza i rizika za nastanak Balkanske endemske nefropatije su procenjivani binominalnom logističkom regresijom, na osnovu OR (eng. *odds ratio*) sa intervalom poverenja od 95% (CI 95%).

Genotipovi *GSTM1* i *GSTT1* bili su dihotomizovani kao *aktivni* (prisutan bar jedan aktivni alel) i *nulti* (bez prisustva aktivnih alela). Efekti polimorfizma *GSTA1* i *GSTP1* su prvo bili određivani posebno za

svaki genotip, a zatim u daljoj analizi su bili grupisani na osnovu našeg prethodnog znanja o funkciji alela. Na osnovu distribucije naših podataka i prethodnog znanja o endemskoj nefropatiji, rezultate binominalne logističke regresije smo korigovali u odnosu na pol i starost.

Prognoza bolesti je procenjivana na osnovu vremenskog perioda od postavljenja dijagnoze BEN do početka lečenja hemodijalizama. Dok je Kaplan-Meierova metoda korišćena za određivanje kumulativnih verovatnoća preživljavanja, log rank testom je procenjivana značajnost razlike između dužina vremenskih perioda od dijagnostikovanja bolesti do početka lečenja HD kod bolesnika sa različitim GST genotipovima. Uticaji genetskih polimorfizama GST su procenjivani Coxovom proporcionalnom hazardnom regresijom, na osnovu HR (eng. *hazard ratio*), koji su korigovani u odnosu na pol i starost ispitanika, sa intervalom poverenja od 95% (CI 95%).

Statistička analiza dobijenih rezultata je izvedena korišćenjem kompjuterskog programa SPSS 17.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*).

4. REZULTATI

4.1 DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

Genetski polimorfizmi glutation transferaza klasa GSTA (*GSTA1*), GSTM (*GSTM1*), GSTT (*GSTT1*), GSTP (*GSTP1*) su određivani u 207 bolesnika sa endemskom nefropatijom i 138 ispitanika kontrolne grupe.

Demografske karakteristike učesnika studije su prikazane u tabeli 2. U pogledu pola, u kontrolnoj grupu je bilo manje muškaraca (48% *vs.* 56%) nego u grupi bolesnika. Prosečna starost u kontrolnoj grupi je iznosila $69,33 \pm 9,98$ godina, dok je u bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom bila $70,60 \pm 6,54$ godina.

Tabela 2. Demografske karakteristike bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom i kontrolne grupe.

Demografske karakteristike	Bolesnici <i>n</i> = 207	Kontrola <i>n</i> = 138	p
Pol			
muški <i>n</i> (%)	116 (56)	66 (48)	p = 0,134
ženski <i>n</i> (%)	91 (44)	72 (52)	
Starost (Srednja vrednost $\pm$ SD)	70,60 $\pm$ 6,54	69,33 $\pm$ 9,98	p = 0,153
BMI (Srednja vrednost $\pm$ SD)	26,3 $\pm$ 3,9	24,6 $\pm$ 4,4	p < 0,001*
Pušenje			
ne <i>n</i> (%)	138 (67)	89 (64)	p = 0,729
da <i>n</i> (%)	69 (33)	49 (36)	
Tumori mokraćnih puteva			
ne <i>n</i> (%)	176 (85)	/	
da <i>n</i> (%)	31 (15)	/	

n - broj učesnika;

BMI - indeks telesne težine;

SD - standardna devijacija;

* - statistički značajna razlika.

Zastupljenost ispitanika koji puše u grupi bolesnika (33%) je bila približna zastupljenosti pušača (36%) u kontrolnoj grupi. Od malignih tumora mokraćnih puteva u studijskoj grupi je oboleo 31 bolesnik.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 2., može se uočiti da nije bilo statistički značajne razlike između kontrolne grupe i bolesnika sa BEN u pogledu polne distribucije, starosti i pušenja, osim u indeksu telesne težine (eng. *body mass index* - BMI). Naime, pripadnici kontrolne grupe imali su veći indeks telesne težine nego bolesnici sa endemskom nefropatijom ($p < 0,001$).

4.2 GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE

U ovom istraživanju su određivani genetski polimorfizmi glutation transferaza klasa GSTA (*GSTA1*), GSTM (*GSTM1*), GSTT (*GSTT1*) i GSTP (*GSTP1*). Rezultati distribucije frekvencije *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* genotipa kod bolesnika sa BEN i kontrolne grupe i rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije su prikazani u tabeli 3.

Iz prikazanih rezultata distribucije frekvencije *GSTA1* genotipa može se uočiti da je u kontrolnoj grupi 39% ispitanika sa CC genotipom, 41% sa CT i 20% sa TT *GSTA1* genotipom. Dobijena distribucija odgovara očekivanoj distribuciji učestalosti varijantnih *GSTA1* genotipova u populaciji bele rase. Između kontrolne grupe i bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom postoji razlika u distribuciji *GSTA1* genotipa. Naime, u studijskoj grupi 28% bolesnika ima CC genotip, 53% CT i 19% TT *GSTA1* genotip. Međutim, razlika u distribuciji *GSTA1* genotipa između grupe bolesnika i kontrolne grupe nije dostigla statističku značajnost ($p = 0,072$).

U distribuciji *GSTM1* *aktivnog* i *nultog* genotipa između bolesnika sa BEN i kontrolne grupe nema statistički značajne razlike ($p = 0,825$). Naime, u obe ispitivane grupe više od polovine ispitanika ima bar jedan aktivni alel (*GSTM1* *aktivni* genotip), dok su preostali bez prisutnih

aktivnih alela (*GSTM1 nulti* genotip), što odgovara distribuciji učestalosti *GSTM1* genotipa u populaciji bele rase. U grupi bolesnika sa BEN, učestalost *GSTM1 aktivnog* genotipa je nešto veća nego u kontrolnoj grupi (56% *vs.* 54%).

Posmatrajući distribuciju *GSTT1* genotipa, može se primetiti da 72% pripadnika kontrolne grupe ima bar jedan aktivni alel (*GSTT1 aktivni* genotip), što odgovara očekivanoj distribuciji učestalosti *GSTT1* genotipa u populaciji bele rase. Zastupljenost *GSTT1 aktivnog* genotipa u grupi bolesnika sa BEN je veća u odnosu na kontrolnu grupu (81% *vs.* 72%). Iako je učestalost *GSTT1 aktivnog* genotipa u grupi obolelih veća, ona nije dostigla statističku značajnosti ($p = 0,057$).

Iz distribucije učestalosti *GSTP1* genotipa, uočava se da 45% ispitanika iz kontrolne grupe ima AA genotip, 42% AG i 13% GG *GSTP1* genotip, što odgovara očekivanoj distribuciji učestalosti varijantnih *GSTP1* genotipova u populaciji bele rase. Učestalost AA genotipa u grupi bolesnika sa BEN je 47%, AG genotipa 45%, dok je učestalost GG *GSTP1* genotipa u studijskoj grupi manja u odnosu na kontrolnu grupu (8% *vs.* 13%), ali bez statističke značajnosti ($p = 0,269$).

Dobijene distribucije *GSTA1* i *GSTP1* genotipa u obe grupe su bile u skladu sa Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom (*GSTA1*: $p = 0,429$ u grupi bolesnika; $p = 0,135$ u kontrolnoj grupi; *GSTP1*: $p = 0,539$ u grupi bolesnika, $p = 0,521$ u kontrolnoj grupi). U slučaju *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizma, Hardy-Weinbergov ekvilibrijum nije proveravan. Naime, korišćene metode za određivanje delecionijskih polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* gena ne mogu da naprave razliku između heterozigota (*nulti* i *aktivan* alel) i homozigota (oba aktivna alela) *GSTM1* i *GSTT1 aktivnog* genotipa.

Iz prikazanih rezultata distribucije *GST* genotipa, može se uočiti da je statistički značajan rizik za nastanak endemske nefropatije u osoba nosioca bar jednog varijantnog *T* alela *GSTA1* gena 1,6 puta veći

u odnosu na osobe sa *GSTA1* CC genotipom (OR = 1,6; CI = 1,0–2,6; p = 0,037).

Tabela 3. Distribucija *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* genotipa i rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije.

GST genotip	Pacijenti n (%)	Kontrole n (%)	OR^a (CI 95%)	p
<i>GSTA1</i> C-69T				
CC	58 (28)	53 (39)	1,0 ^d	
CT	110 (53)	57 (41)	1,8 (1,1–2,9)	0,021*
TT	39 (19)	28 (20)	1,3 (0,7–2,4)	0,377
CT+TT	149 (72)	85 (61)	1,6 (1,0–2,6)	0,037*
<i>GSTM1</i>				
aktivni ^b	115 (56)	75 (54)	1,0 ^d	
nulti ^c	92 (44)	63 (46)	0,9 (0,6–1,5)	0,790
<i>GSTT1</i>				
nulti ^c	39 (19)	38 (28)	1,0 ^d	
aktivni ^b	168 (81)	100 (72)	1,5 (0,9–2,5)	0,126
<i>GSTP1</i> A1578G				
AA	97 (47)	62 (45)	1,0 ^d	
AG	92 (45)	57 (42)	1,0 (0,6–1,6)	0,953
GG	16 (8)	18 (13)	0,6 (0,3–1,2)	0,142
AG+GG	108 (53)	75 (55)	0,9 (0,6–1,4)	0,666

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^baktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^cnulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan;

^dreferentna grupa;

n - broj učesnika;

OR - odds ratio;

CI - interval poverenja;

* - statistički značajna razlika.

Ispitanici naše studije sa *GSTM1* aktivnim genotipom imaju sličan rizik za nastanak BEN kao i osobe sa *nulti* *GSTM1* genotipom (OR = 0,9; CI = 0,6–1,5; p = 0,790), za razliku od osoba sa aktivnim *GSTT1* genotipom koje u poređenju sa osobama nosiocima *GSTT1* nultog

genotipa imaju 1,5 puta veći rizik obolevanja od endemske nefropatije. Rizik za nastanak BEN u grupi ispitanika sa *aktivnim GSTT1* genotipom, međutim, nije dostigao statističku značajnost (OR = 1,5; CI = 0,9–2,5; p = 0,126).

U našem istraživanju, iako je učestalost *GSTP1 GG* genotipa u bolesnika sa BEN manja nego u ispitanika kontrolne grupe (8% *vs.* 13%), efekat prisustva *GSTP1 GG* genotipa u odnosu na *GSTP1 AA* genotip nema statistički značajan uticaj na smanjenje rizika za nastanak endemske nefropatije (OR = 0,6; CI = 0,3–1,2; p = 0,142).

4.3 KOMBINOVANI GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION TRANSFERAZA I RIZIK ZA NASTANAK BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE

Osim izolovanog uticaja *GST*, u našem istraživanju su ispitivani i efekti genetskog polimorfizma *GSTA1* u kombinaciji sa polimorfizmima *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* na rizik za nastanak BEN. Na osnovu dobijenih rezultata uticaja izolovanih genetskih polimorfizma *GST* i prethodnog znanja o funkciji alela, ispitivani su uticaji kombinovanih genetskih polimorfizama *GST* u odnosu na ispitanike koji su pored *GSTA1 CC* genotipa bili nosioci jednog od sledećih genotipova: *GSTM1 aktivnog*, *GSTT1 nultog* ili *GSTP1 AA* genotipa. Dobijeni rezultati naše studije su prikazani u tabeli 4.

Uticaj kombinacije genetskih polimorfizama *GSTA1* i *GSTM1*, doprineo je da veći rizik za nastanak BEN imaju ispitanici nosioci *GSTM1 aktivnog* genotipa koji umesto *GSTA1 CC* genotipa su nosioci *GSTA1 CT* ili *TT* genotipa. Međutim, u ovom slučaju, rizik za nastanak endemske nefropatije nije dostigao i statističku značajnosti (OR = 1,8; CI = 1,0–3,3; p = 0,068).

Iz prikazanih rezultata u tabeli 4., može se uočiti da najveći rizik za nastanak endemske nefropatije koji je i statistički značajan, imaju osobe sa bar jednim prisutnim *T* varijantnim alelom *GSTA1* koji su

nosioci *GSTT1* aktivnog genotipa. U ovih ispitanika, rizik za nastanak BEN je 2,3 puta veći u odnosu na osobe sa *GSTA1* CC genotipom i delecijom oba *GSTT1* gena (OR = 2,3; CI = 1,0–5,3; p = 0,046).

Tabela 4. Distribucija *GSTA1* genotipa u kombinaciji sa *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* genotipovima i rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije.

GST genotipovi	Pacijenti n (%)	Kontrole n (%)	OR^a (CI 95%)	p
<i>GSTA1</i> + <i>GSTM1</i>				
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTM1</i> aktivni ^b	34 (16)	31 (22)	1,0 ^d	
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTM1</i> nulti ^c	24 (12)	22 (16)	1,0 (0,5–2,2)	0,926
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTM1</i> aktivni ^b	81 (39)	44 (32)	1,8 (1,0–3,3)	0,068
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTM1</i> nulti ^c	68 (33)	41 (30)	1,5 (0,8–2,9)	0,177
<i>GSTA1</i> + <i>GSTT1</i>				
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTT1</i> nulti ^c	12 (6)	15 (11)	1,0 ^d	
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTT1</i> aktivni ^b	46 (22)	38 (27)	1,4 (0,6–3,4)	0,449
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTT1</i> nulti ^c	27 (13)	23 (17)	1,5 (0,6–3,9)	0,382
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTT1</i> aktivni ^b	122 (59)	62 (45)	2,3 (1,0–5,3)	0,046*
<i>GSTA1</i> + <i>GSTP1</i>				
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTP1</i> AA	24 (12)	25 (18)	1,0 ^d	
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTP1</i> AG+GG	34 (16)	28 (21)	1,2 (0,6–2,7)	0,573
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTP1</i> AA	73 (36)	37 (27)	2,1 (1,0–4,2)	0,036*
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTP1</i> AG+GG	74 (36)	47 (34)	1,7 (0,8–3,3)	0,145

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^baktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^cnulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan;

^dreferentna grupa;

n - broj učesnika;

OR - odds ratio;

CI - interval poverenja;

* - statistički značajna razlika.

Posmatrajući efekat kombinacije genetskih polimorfizama *GSTA1* i *GSTP1*, može se uočiti da u prisustvu *GSTP1* AA genotipa kod ispitanika sa *GSTA1* CT ili TT genotipom, rizik je statistički značajno veći za nastanak BEN u odnosu na rizik kod ispitanika

koji osim *GSTP1* AA genotipa su nosioci *GSTA1* CC genotipa (OR = 2,1; CI = 1,0–4,2; p = 0,036).

U našem istraživanju, osim uticaja genetskog polimorfizma *GSTA1* u kombinaciji sa polimorfizmima *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* gena, ispitivani su i efekti genetskog polimorfizma *GSTP1* kombinovanog sa polimorfizmima *GSTT1* i *GSTM1* gena, kao i efekat kombinovanih delecionih polimorfizama *GSTT1* i *GSTM1* na rizik za nastanak endemske nefropatije (Tabela 5.).

Tabela 5. Distribucija kombinovanih GST genotipova i rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije.

GST genotipovi	Pacijenti n (%)	Kontrole n (%)	OR^a (CI 95%)	p
<i>GSTT1</i> + <i>GSTM1</i>				
<i>GSTT1</i> nulti ^c / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	22 (11)	21 (15)	1,0 ^d	
<i>GSTT1</i> nulti ^c / <i>GSTM1</i> nulti ^c	17 (8)	17 (13)	0,9 (0,4–2,3)	0,836
<i>GSTT1</i> aktivni ^b / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	93 (45)	54 (39)	1,5 (0,7–3,0)	0,277
<i>GSTT1</i> aktivni ^b / <i>GSTM1</i> nulti ^c	75 (36)	46 (33)	1,4 (0,7–2,9)	0,357
<i>GSTP1</i> + <i>GSTM1</i>				
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	53 (26)	34 (25)	1,0 ^d	
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTM1</i> nulti ^c	44 (21)	28 (20)	0,9 (0,5–1,8)	0,860
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	61 (30)	40 (29)	0,9 (0,5–1,7)	0,785
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTM1</i> nulti ^c	47 (23)	35 (26)	0,8 (0,5–1,6)	0,586
<i>GSTP1</i> + <i>GSTT1</i>				
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTT1</i> nulti ^c	20 (10)	15 (11)	1,0 ^d	
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTT1</i> aktivni ^b	77 (38)	47 (34)	1,1 (0,5–2,4)	0,847
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTT1</i> nulti ^c	19 (9)	23 (17)	0,6 (0,2–1,4)	0,241
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTT1</i> aktivni ^b	89 (43)	52 (38)	1,1 (0,5–2,4)	0,756

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^baktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^cnulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan;

^dreferentna grupa;

n - broj učesnika;

OR - odds ratio;

CI - interval poverenja.

Iz prikazanih rezultata distribucija kombinovanih *GST* genotipova, može se uočiti da najveći rizik za nastanak endemske nefropatije imaju osobe koje pored *GSTM1* *aktivnog* genotipa imaju umesto *GSTT1* *nultog* genotipa prisutan *GSTT1* *aktivni* genotip. Međutim, rizik za nastanak BEN u ovih ispitanika nije i statistički značajno veći (OR = 1,5; CI = 0,7–3,0; p = 0,277).

Efekat kombinovanih genetskih polimorfizama *GSTP1* i *GSTM1* nije uticao na rizik za nastanak BEN među ispitanicima naše studije. Neznatno niži rizik za nastanak endemske nefropatije imaju bolesnici nosioci *GSTM1* *nultog* genotipa i bar jednog varijantnog *G* alela *GSTP1* gena u odnosu na ispitanike sa *GSTM1* *aktivnim* genotipom nosiocima *GSTP1* AA genotipa (OR = 0,8; CI = 0,5–1,6; p = 0,586).

Uticaj kombinacije genetskih polimorfizama *GSTP1* i *GSTT1* u nastanku endemske nefropatije, je doveo do smanjenja rizika u ispitanika koji osim *GSTT1* *nultog* genotipa imaju prisutan ili *GSTP1* AG ili *GSTP1* GG genotip umesto *GSTP1* AA genotipa. Međutim, taj rizik nije dostigao i statističku značajnosti (OR = 0,6; CI = 0,2–1,4; p = 0,241).

U našem istraživanju, na osnovu dobijenih rezultata uticaja izolovanih genetskih polimorfizma *GST* i prethodnog znanja o funkciji alela, ispitivani su uticaji kombinovanih genetskih polimorfizama glutation transferaza tako što je napravljen kumulativni *GST* indeks od 0-4 (Tabela 6.).

Tabela 6. Kumulativni GST indeks.

Indeks	GST genotip			
	GSTA1	GSTM1	GSTT1	GSTP1
0	CC	nosioci sledećih genotipova: <i>aktivni</i> ^a <i>nulti</i> ^b AA		
1	CT/TT	<i>nulti</i> ^b	<i>aktivni</i> ^a	AG/GG
2	CT/TT	<i>nulti</i> ^b	<i>aktivni</i> ^a	AG/GG
3	CT/TT	<i>nulti</i> ^b	<i>aktivni</i> ^a	AG/GG
4	CT/TT	<i>nulti</i> ^b	<i>aktivni</i> ^a	AG/GG

^a*aktivni* genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^b*nulti* genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

Dobijeni rezultati o uticaju kombinovanih genetski polimorfizama glutation transferaza su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Distribucija kumulativnih GST indeksa i rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije.

Kumulativni GST indeks	Pacijenti <i>n</i> (%)	Kontrole <i>n</i> (%)	OR ^a (CI 95%)	p
GST indeks 0	4 (2)	6 (5)	1,0 ^b	
GST indeks 1	22 (11)	18 (13)	1,7 (0,4–7,3)	0,452
GST indeks 2	75 (36)	51 (37)	2,0 (0,5–7,5)	0,319
GST indeks 3	76 (37)	47 (34)	2,2 (0,6–8,4)	0,251
GST indeks 4	28 (14)	15 (11)	2,5 (0,6–10,5)	0,214

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^breferentna grupa;

n - broj učesnika;

OR - *odds ratio*;

CI - interval poverenja.

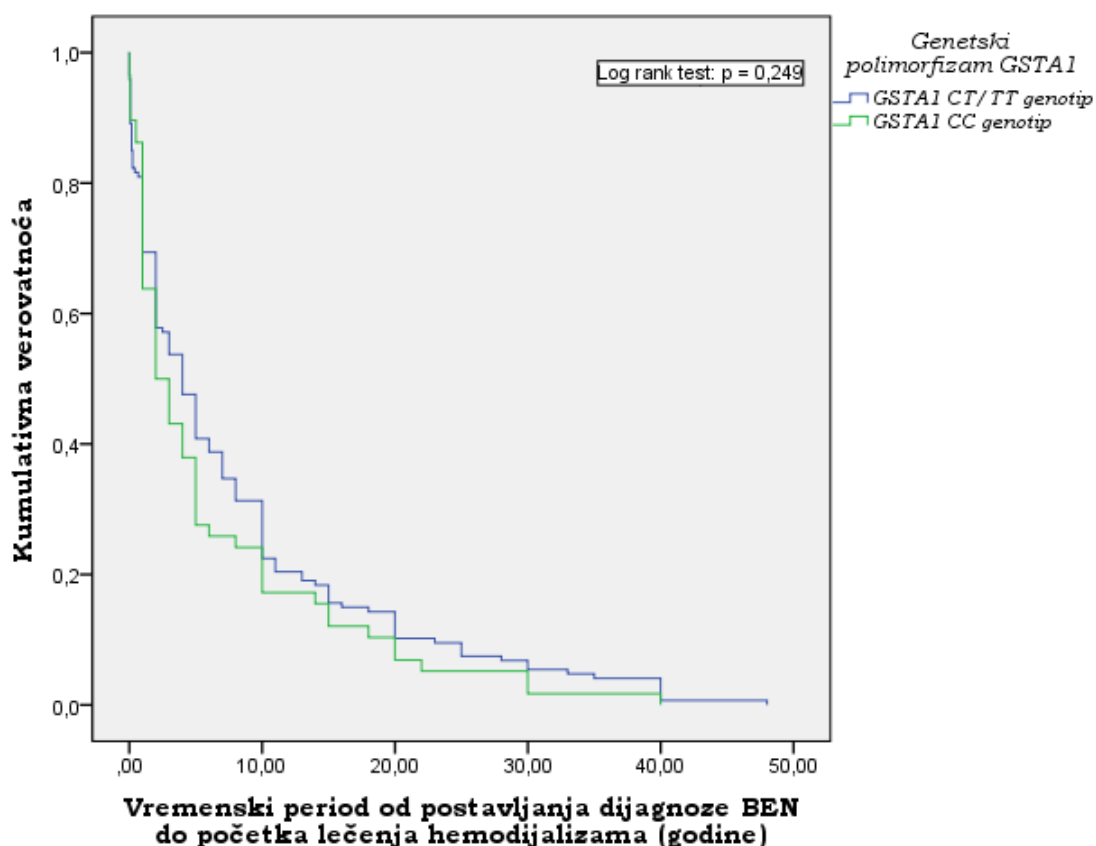
Iz prikazanih rezultata distribucije kumulativnih GST indeksa, može se uočiti da efekat kombinacije GST genotipova je doprineo sukcesivnom povećanju rizika nastanka endemske nefropatije porastom broja kumulativnog GST indeksa. Naime, najveći rizik za nastanak endemske nefropatije imaju nosioci *GSTA1 CT* ili *GSTA1 TT*, *GSTM1 nultog*, *GSTT1 aktivnog* i *GSTP1 AG* ili *GSTP1 GG* genotipa u odnosu na ispitanike nosioce *GSTA1 CC*, *GSTM1 aktivnog*, *GSTT1 nultog* i *GSTP1 AA* genotipa. Međutim, rizik za nastanak BEN u ovih ispitanika nije dostigao statističku značajnost (OR = 2,5; CI = 0,6–10,5; p = 0,214).

4.4 UTICAJ GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA NA PROGNOZU BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE

Za procenu uticaja genetskih polimorfizama GST na progresiju Balkanske endemske nefropatije sprovedena je „case-only“ studija. Prognoza bolesti je procenjivana na osnovu vremenskog perioda od postavljanja dijagnoze BEN do početka lečenja hemodijalizama.

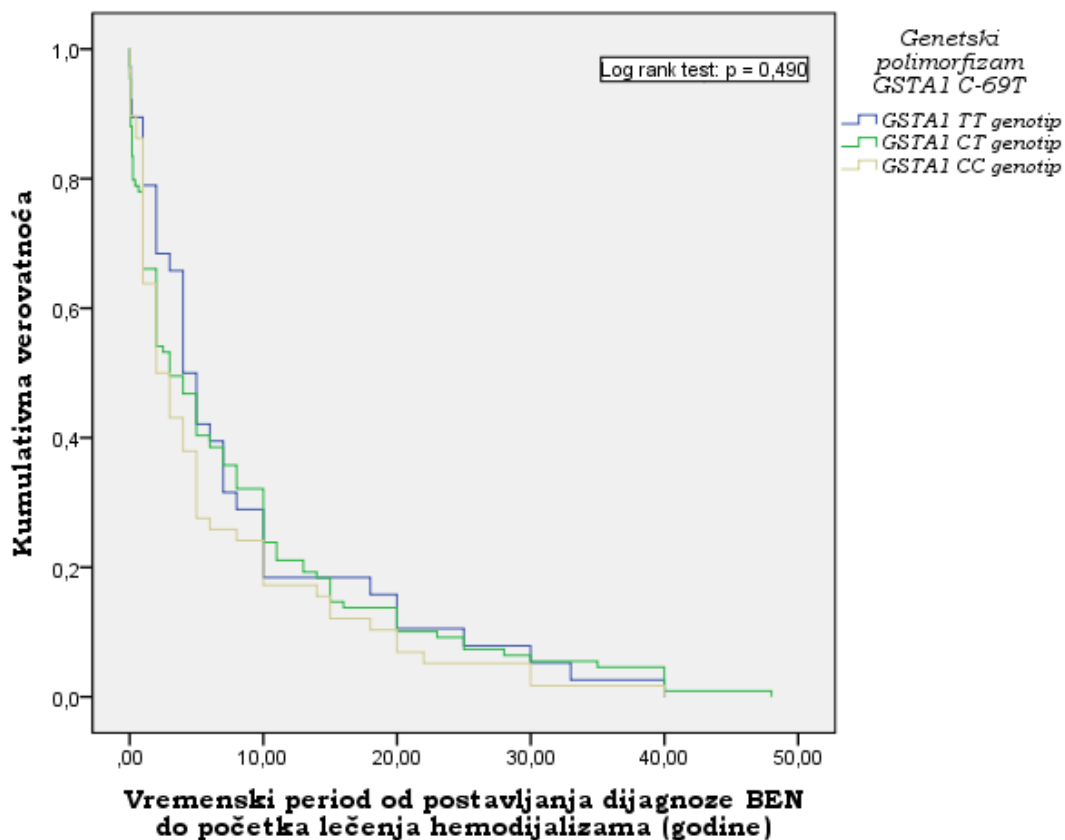
U momentu uključivanja u studiju, svi bolesnici su lečeni hemodijalizama. Anketom od bolesnika su dobijeni podaci o trajanju njihove bolesti pre nego što je započeto lečenje u regionalnim centrima hemodijalize. O trajanju bolesti pre lečenja hemodijalizama za dva bolesnika nisu dobijeni podaci, dok je osam bolesnika započelo lečenje svoje bolesti HD neposredno nakon postavljanja dijagnoze. Najduži vremenski period bolesti pre lečenja HD je trajao 48,0 godina, a medijana vremenskog perioda trajanja bolesti do lečenja hemodijalizama je iznosila $4,0 \pm 0,5$ godine.

U našem istraživanju, medijana vremenskog perioda od dijagnostikovanja BEN do početka lečenja HD u bolesnika sa *GSTA1* CC genotipom je kraća u odnosu na ispitanike sa prisutnim bar jednim *T* varijantnim alelom *GSTA1*, ali bez statističke značajnosti razlike između medijana vremenskih perioda (Log rank test: $p = 0,249$, Grafikon 1.; Log rank test: $p = 0,490$, Grafikon 2.).



Grafikon 1. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

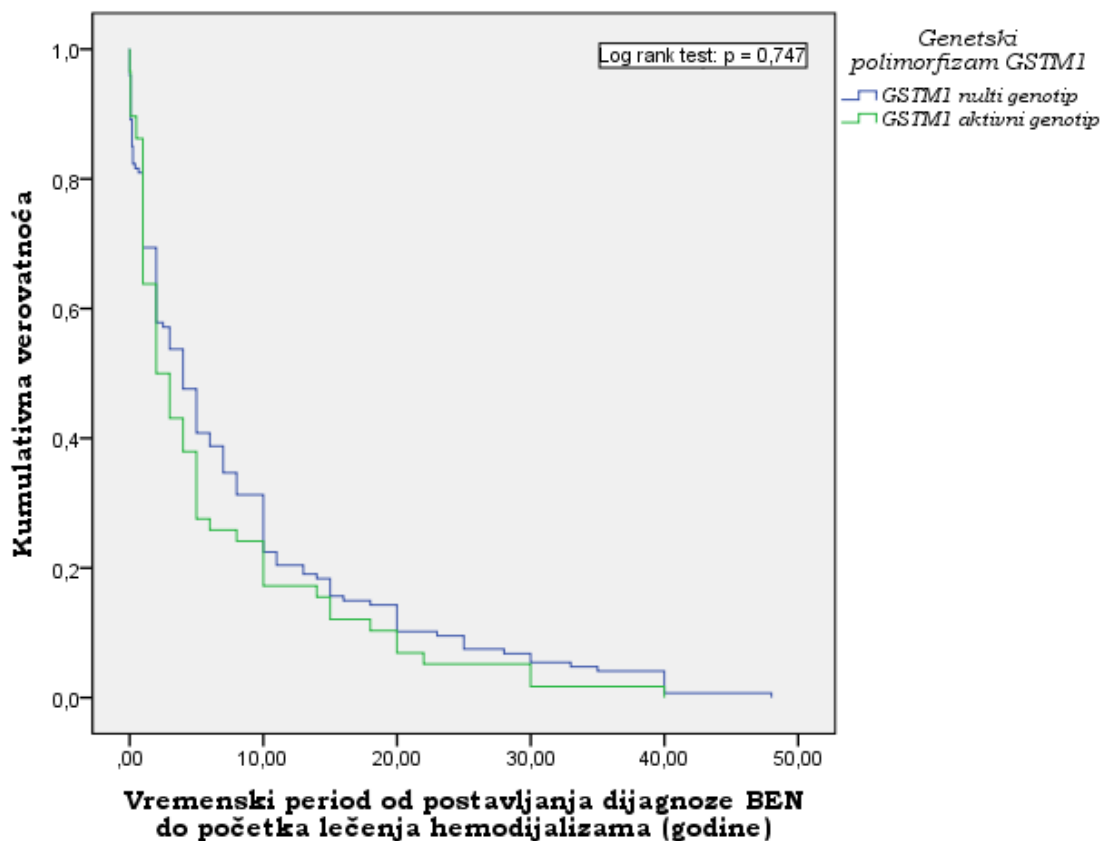
Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva *GSTA1* CC genotipa i *GSTA1* CT/TT genotipa.



Grafikon 2. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva *GSTA1* genotipa.

Kaplan-Meierova procena funkcije preživljavanja je pokazala da je dužina vremenskog perioda od postavljanja dijagnoze nefropatije do početka lečenja HD kod ispitanika sa *GSTM1* aktivnim genotipom kraća od dužine istog vremenskog perioda kod ispitanika nosioca *GSTM1* nultog genotipa. Međutim, log rank testom nije dobijena statistička značajnost ($p = 0,747$, Grafikon 3.).



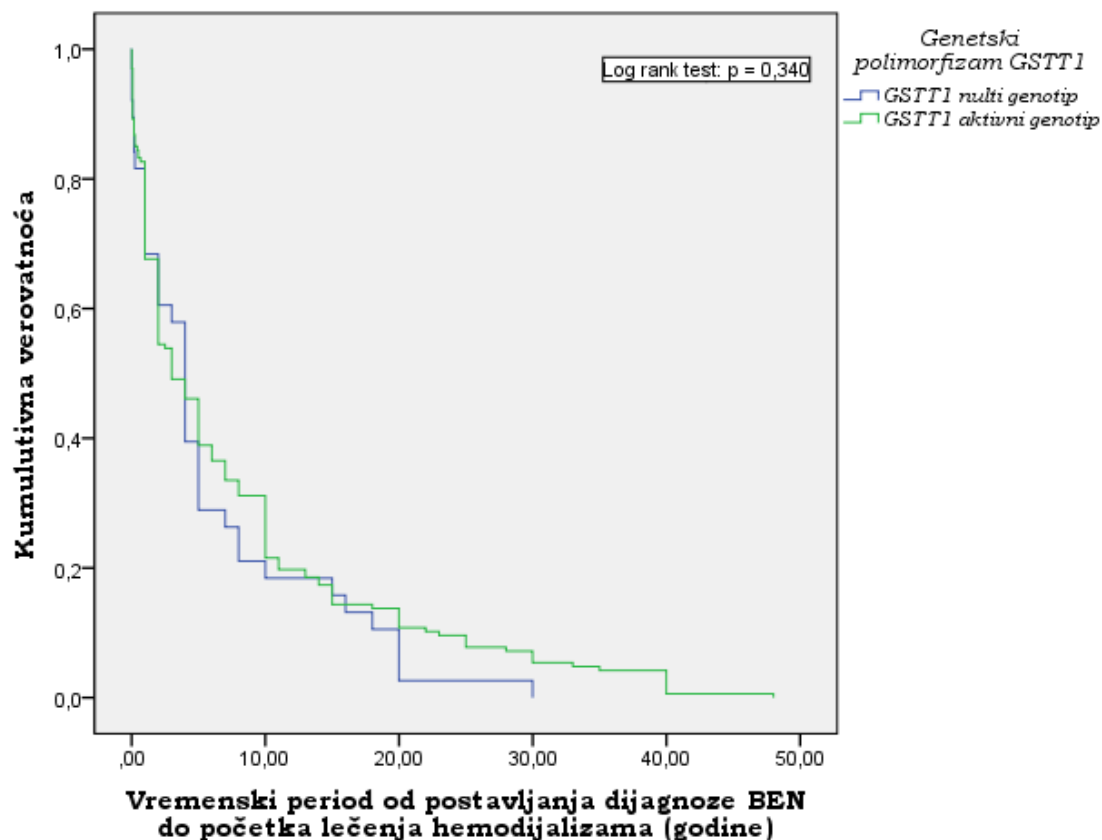
Grafikon 3. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva *GSTM1* genotipa.

aktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan,

nulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

Vremenski period od postavljenja dijagnoze BEN do početka lečenja hemodijalizama kod bolesnika nosioca *GSTM1* aktivnog genotipa je kraći nego kod ispitanika sa *GSTM1* nultim genotipom, ali bez statističke značajnosti (Log rank test: $p = 0,340$, Grafikon 4.).



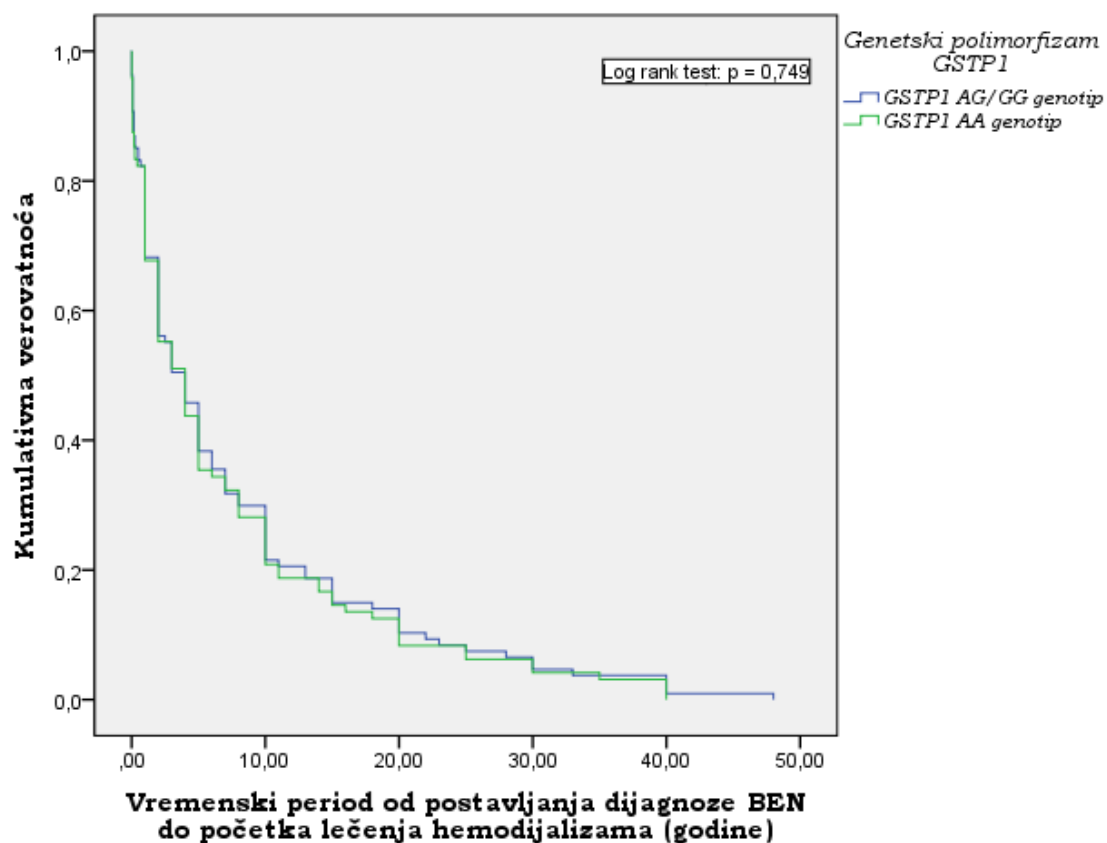
Grafikon 4. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva GSTT1 genotipa.

aktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan,

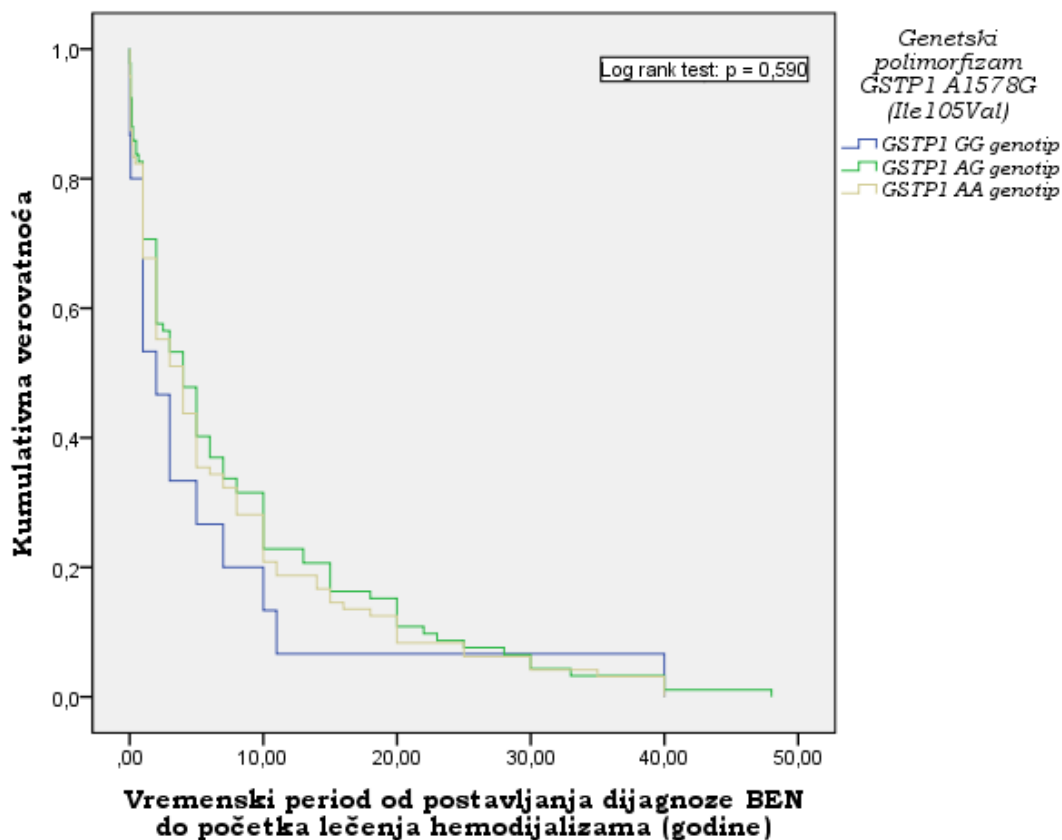
nulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

U bolesnika sa GSTP1 GG genotipom, medijana vremenskog perioda od dijagnostikovanja endemske nefropatije do početka lečenja HD je kraća u odnosu na ispitanike nosioce GSTP1 AA genotipa. Međutim, log rank testom nije dobijena statistička značajna razlika između medijana vremenskih perioda u zavisnosti od prisustva GSTP1 genotipa ($p = 0,749$, Grafikon 5.; $p = 0,590$, Grafikon 6.).



Grafikon 5. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva *GSTP1* AA genotipa i *GSTP1* AG/GG genotipa.



Grafikon 6. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva *GSTP1* genotipa.

U našem istraživanju, ispitivani su nezavisni uticaji genetskog polimorfizma glutation transferaza na početak lečenja endemske nefropatije hemodijalizama. Dobijeni rezultati naše studije su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Genetski polimorfizam *GST* kao prediktor terminalne insuficijencije bubrega kod bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom.

GST genotip	HR^a (CI 95%)	p
GSTA1 C-69T		
CC	1 ^d	
CT	0,9 (0,6-1,2)	0,366
TT	0,8 (0,5-1,2)	0,299
CT+TT	0,8 (0,6-1,1)	0,285
GSTM1		
aktivni ^b	1 ^d	
nulti ^c	1,0 (0,7-1,3)	0,802
GSTT1		
nulti ^c	1 ^d	
aktivni ^b	0,9 (0,6-1,2)	0,396
GSTP1 A1578G		
AA	1 ^d	
AG	0,9 (0,7-1,2)	0,626
GG	1,2 (0,7-2,1)	0,546
AG+GG	1,0 (0,7-1,3)	0,780

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^baktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^cnulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan;

^dreferentna grupa;

HR - *hazard ratio*;

CI - interval poverenja.

Iz prikazanih rezultata o uticaju genetskog polimorfizma *GSTA1*, može se uočiti da ispitanici naše studije sa prisutnim bar jednim *T* varijantnim alelom *GSTA1* imaju niži rizik da budu lečeni hemodijalizama u odnosu na bolesnike nosioce *GSTA1* CC genotipa. Međutim, rizik nije dostigao i statističku značajnosti (HR = 0,8; CI = 0,6–1,1; p = 0,285).

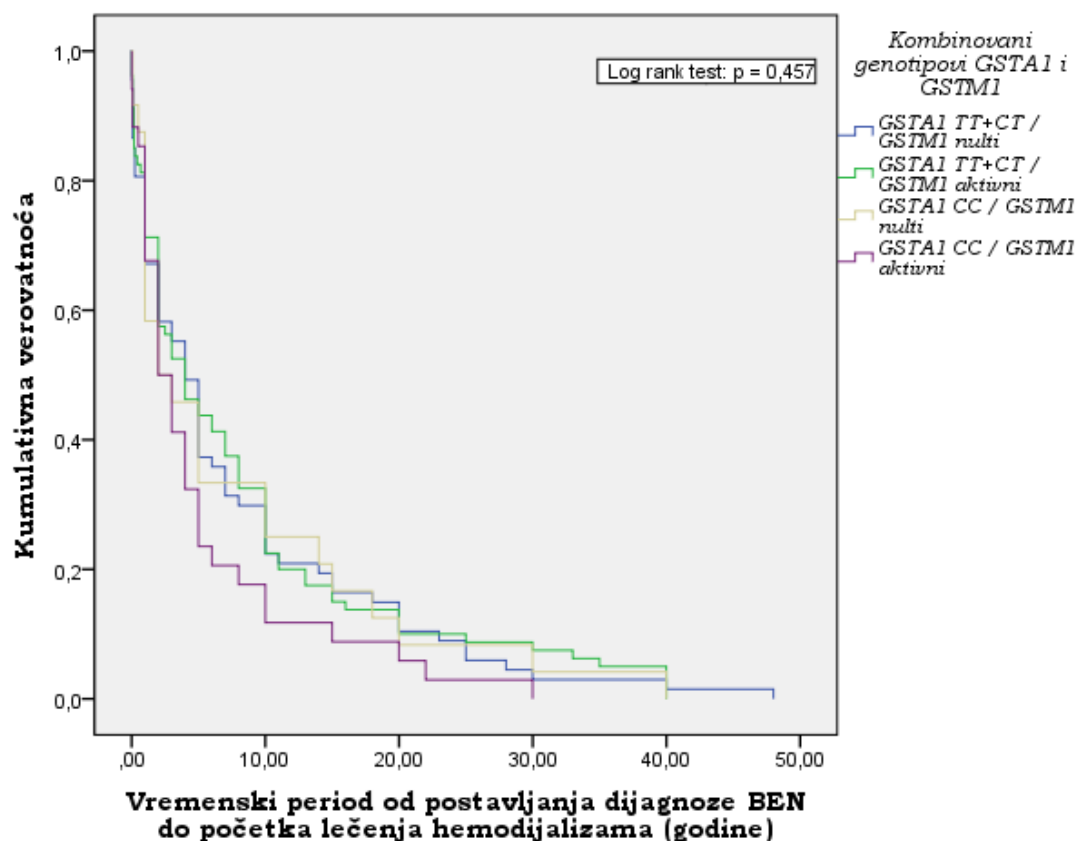
Rezultati naše studije su pokazali da bolesnici sa *GSTM1 nultim* genotipom imaju isti rizik da budu lečeni hemodijalizama kao i ispitanici sa *GSTM1 aktivnim* genotipom (HR = 1,0; CI = 0,7–1,3; p = 0,802), dok sličan rizik za lečenje nefropatije HD imaju bolesnici nosioci bar jednog aktivnog alela *GSTT1* u odnosu na bolesnike nosioce *GSTT1 nultog* genotipa (HR = 0,9; CI = 0,6–1,2; p = 0,396).

U našem istraživanju, ispitanici nosioci *GSTP1 GG* genotipa imaju veći rizik da njihova bolest bude lečena HD u odnosu na bolesnike sa *GSTP1 AA* genotipom. Međutim, taj rizik nije dostigao statističku značajnost (OR = 1,2; CI = 0,7–2,1; p = 0,546).

4.5 UTICAJ KOMBINOVANOG GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA NA PROGNOZU BALKANSKE ENDEMSKE NEFROPATIJE

Na početak lečenja hemodijalizama endemske nefropatije osim izolovanog uticaja *GST*, u našoj studiji su ispitivani i efekti genetskog polimorfizma *GSTA1* u kombinaciji sa polimorfizmima *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* gena.

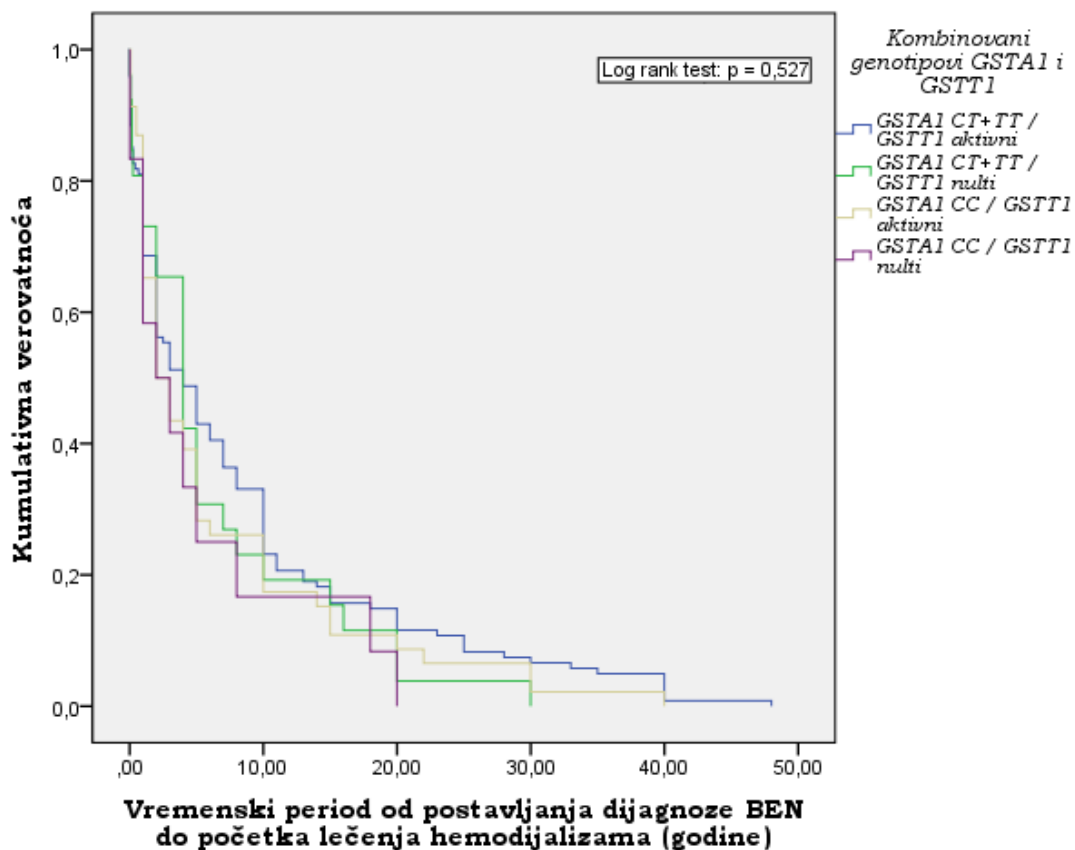
U našem istraživanju o uticaju kombinovanih genetskih polimorfizama *GSTA1* i *GSTM1* na početak lečenja nefropatije hemodijalizama, Kaplan-Meierova procena funkcije preživljavanja je pokazala da najkraću medijanu vremenskog perioda od dijagnostikovanja BEN do početka lečenja hemodijalizama imaju ispitanici sa *GSTA1 CC* genotipom bez obzira da li su nosioci *GSTM1 aktivnog* ili *nultog* genotipa (Log rank test: p = 0,457, Grafikon 7.).



Grafikon 7. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva kombinovanih *GSTA1/GSTM1* genotipova. *aktivni* genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan, *nulti* genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

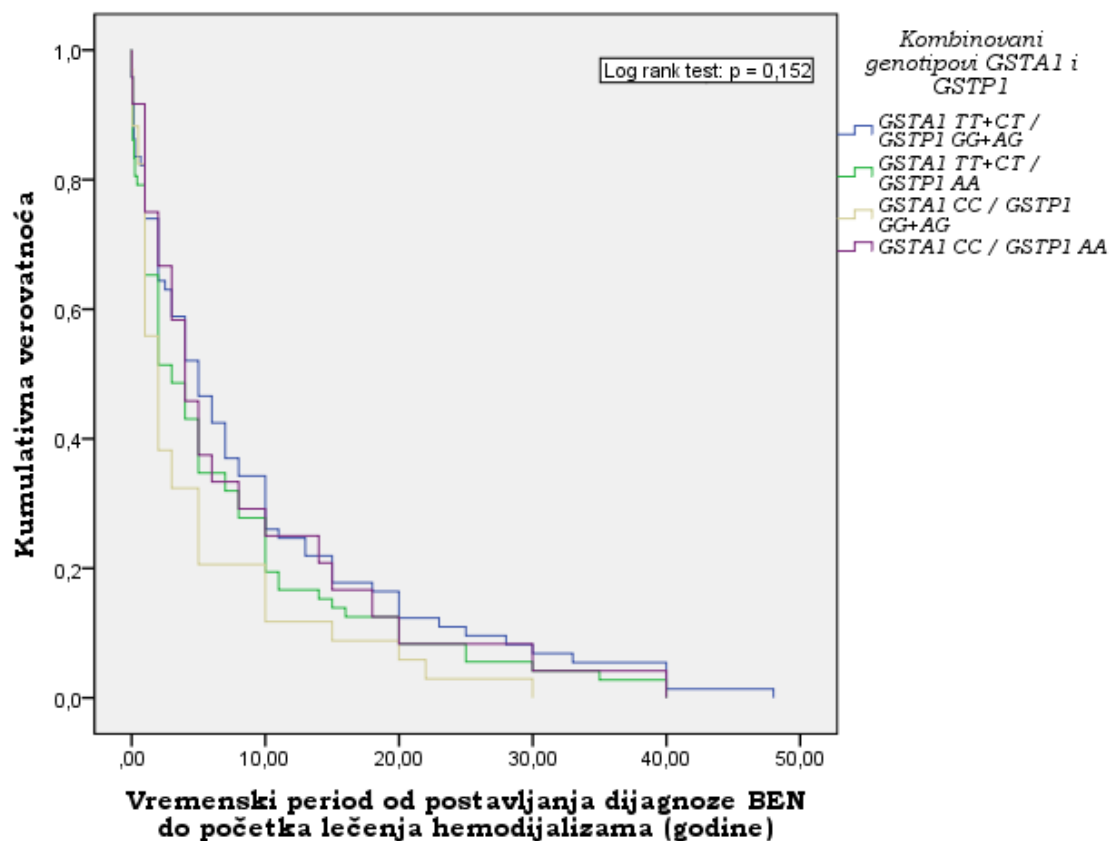
Rezultati naše studije o uticaju kombinacije genetskih polimorfizama *GSTA1* i *GSTM1* na trajanje endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama su prikazani na grafikonu 8. Medijana vremenskog perioda od dijagnostikovanja endemske nefropatije do početka lečenja HD je najkraća u bolesnika sa *GSTA1* CC genotipom bez obzira da li su nosioci *GSTM1* *aktivnog* ili *nultog* genotipa. Međutim, log rank testom nije dobijena statistička značajnost ($p = 0,527$).



Grafikon 8. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva kombinovanih *GSTA1/GSTT1* genotipova.
aktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan,
multi genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

Uticaj kombinacije polimorfizama *GSTA1* i *GSTP1* gena na trajanje BEN od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama je prikazan na grafikonu 9. Kaplan-Meierova procena funkcije preživljavanja je pokazala da je dužina vremenskog perioda od postavljanja dijagnoze nefropatije do početka lečenja HD, najkraća kod ispitanika sa *GSTA1* CC genotipom nosioca bar jednog varijantnog G alela *GSTP1* gena. Međutim, log rank testom nije dobijena statistička značajnost ($p = 0,152$).



Grafikon 9. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva kombinovanih *GSTA1*/*GSTP1* genotipova.

Rezultati našeg istraživanja o uticajima genetskog polimorfizma *GSTA1* u kombinaciji sa polimorfizmima *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* gena na početak lečenja hemodijalizama endemske nefropatije su prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. Kombinovani genetski polimorfizam *GSTA1* sa *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* kao prediktor terminalne insuficijencije bubrega kod bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom.

GST genotipovi	HR^a (CI 95%)	p
<i>GSTA1</i> + <i>GSTM1</i>		
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTM1</i> aktivni ^b	1 ^d	
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTM1</i> nulti ^c	0,8 (0,4-1,3)	0,303
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTM1</i> aktivni ^b	0,7 (0,5-1,1)	0,128
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTM1</i> nulti ^c	0,8 (0,5-1,2)	0,219
<i>GSTA1</i> + <i>GSTT1</i>		
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTT1</i> nulti ^c	1 ^d	
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTT1</i> aktivni ^b	0,8 (0,4-1,6)	0,548
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTT1</i> nulti ^c	0,8 (0,4-1,6)	0,539
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTT1</i> aktivni ^b	0,7 (0,4-1,3)	0,253
<i>GSTA1</i> + <i>GSTP1</i>		
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTP1</i> AA	1 ^d	
<i>GSTA1</i> CC/ <i>GSTP1</i> AG+GG	1,4 (0,9-2,4)	0,169
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTP1</i> AA	1,1 (0,7-1,8)	0,585
<i>GSTA1</i> CT+TT/ <i>GSTP1</i> AG+GG	0,9 (0,6-1,5)	0,784

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^baktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^cnulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan;

^dreferentna grupa;

HR - hazard ratio;

CI - interval poverenja.

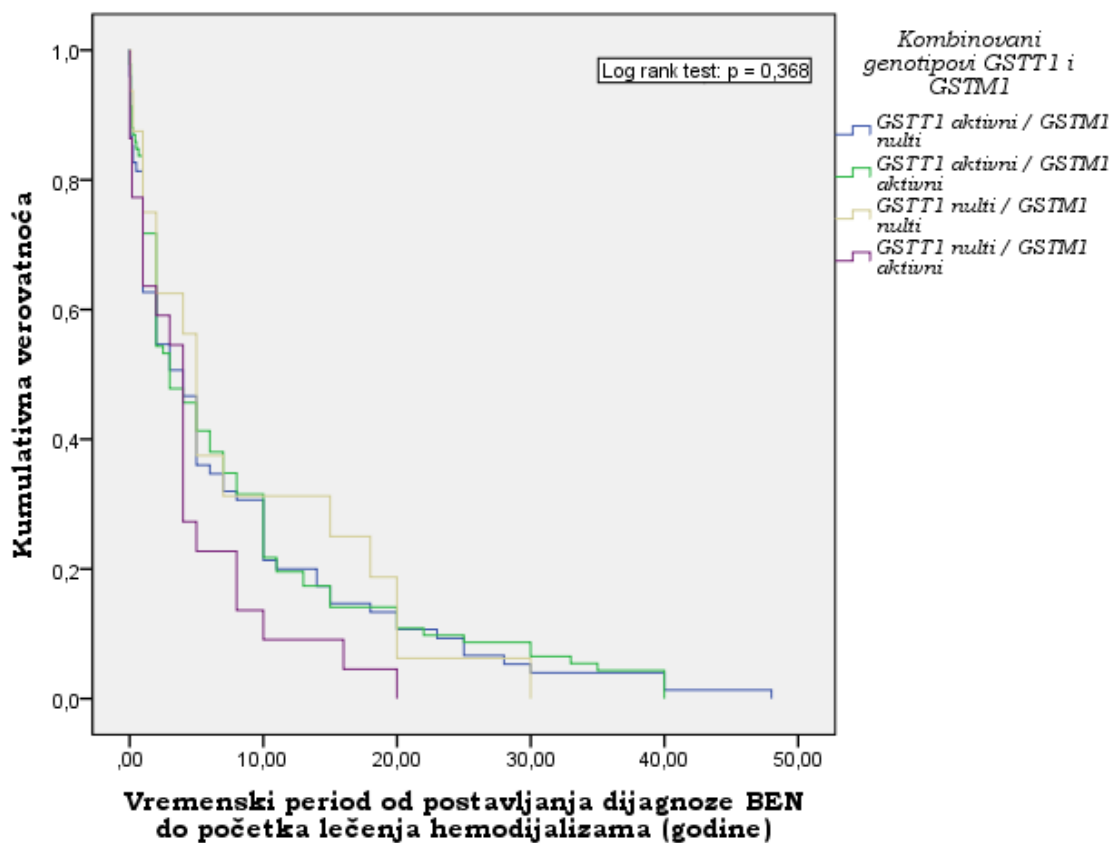
Posmatrajući efekat kombinacije genetskih polimorfizama *GSTA1* i *GSTM1*, može se uočiti da najniži rizik za početak lečenja HD imaju ispitanici nosioci *GSTM1* aktivnog genotipa koji umesto *GSTA1* CC genotipa su nosioci bar jednog varijantnog T alela *GSTA1* gena. Međutim, taj rizik nije dostigao i statističku značajnost (HR = 0,7; CI = 0,5–1,1; p = 0,128).

Iz prikazanih rezultata o uticaju kombinovanih genetskih polimorfizama *GSTA1* i *GSTT1*, može se primetiti da najniži rizik za lečenje endemske nefropatije HD imaju bolesnici nosioci *GSTT1* *aktivnog* genotipa i bar jednog varijantnog *T* alela *GSTA1* u odnosu na ispitanike bez aktivnih alela *GSTT1* gena i sa *GSTA1* *CC* genotipom (HR = 0,7; CI = 0,4–1,3; p = 0,253).

Rezultati našeg istraživanja o uticaju kombinovanih genetskih polimorfizama *GSTA1* i *GSTP1*, pokazali su da ispitanici sa *GSTA1* *CC* genotipom nosioci bar jednog varijantnog *G* alela *GSTP1* imaju 1,4 puta veći rizik da njihova bolest bude lečena HD u odnosu na bolesnike nosioce *GSTA1* *CC* i *GSTP1* *AA* genotipa. Međutim, ovaj rizik nije dostigao statističku značajnost (HR = 1,4; CI = 0,9–2,4; p = 0,169).

U našoj studiji endemske nefropatije, takođe, je ispitivan i uticaj kombinacije delecionih genetskih polimorfizama *GSTT1* i *GSTM1* na trajanje BEN od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama.

Rezultati naše studije o kombinovanim genetskim polimorfizmima *GSTT1* i *GSTM1* su pokazali da je medijana vremenskog perioda od dijagnostikovanja endemske nefropatije do početka lečenja HD najkraća u bolesnika nosioca *GSTT1* *aktivnog* i *GSTM1* *aktivnog* genotipa u odnosu na ostale ispitanike, ali log rank testom nije dobijena statistička značajnost (p = 0,368, Grafikon 10.).

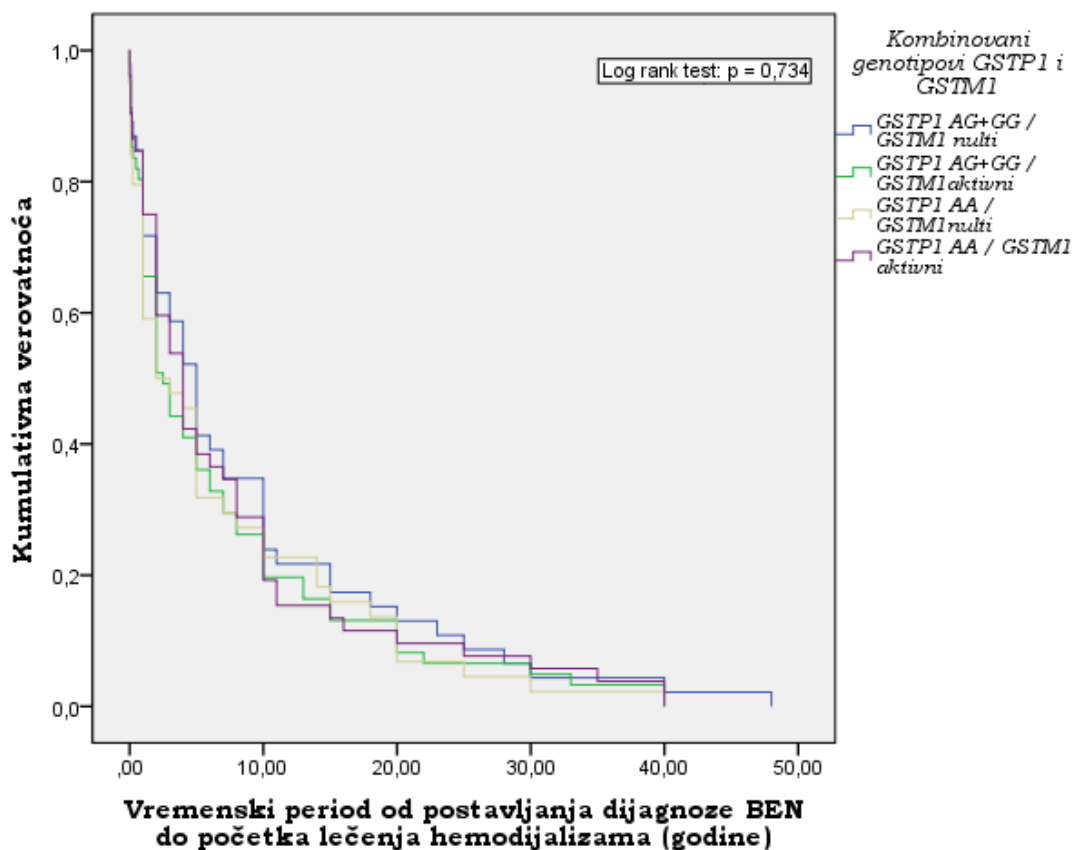


Grafikon 10. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva kombinovanih *GSTT1/GSTM1* genotipova.
aktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan,
multi genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

Takođe, u našoj studiji su ispitivani i uticaji genetskog polimorfizma *GSTP1* kombinovanog sa polimorfizmima *GSTT1* i *GSTM1* na trajanje endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama.

Kaplan-Meierove krive preživljavanja o trajanju endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva kombinacije genetskih polimorfizama *GSTP1* i *GSTM1* su prikazane na grafikonu 11. Medijana vremenskog perioda od dijagnostikovanja nefropatije do početka lečenja HD je najkraća u bolesnika sa *GSTP1* AA genotipom nosioca *GSTM1* *nultog* genotipa. Međutim, log rank testom nije dobijena statistička značajnost ($p = 0,734$).



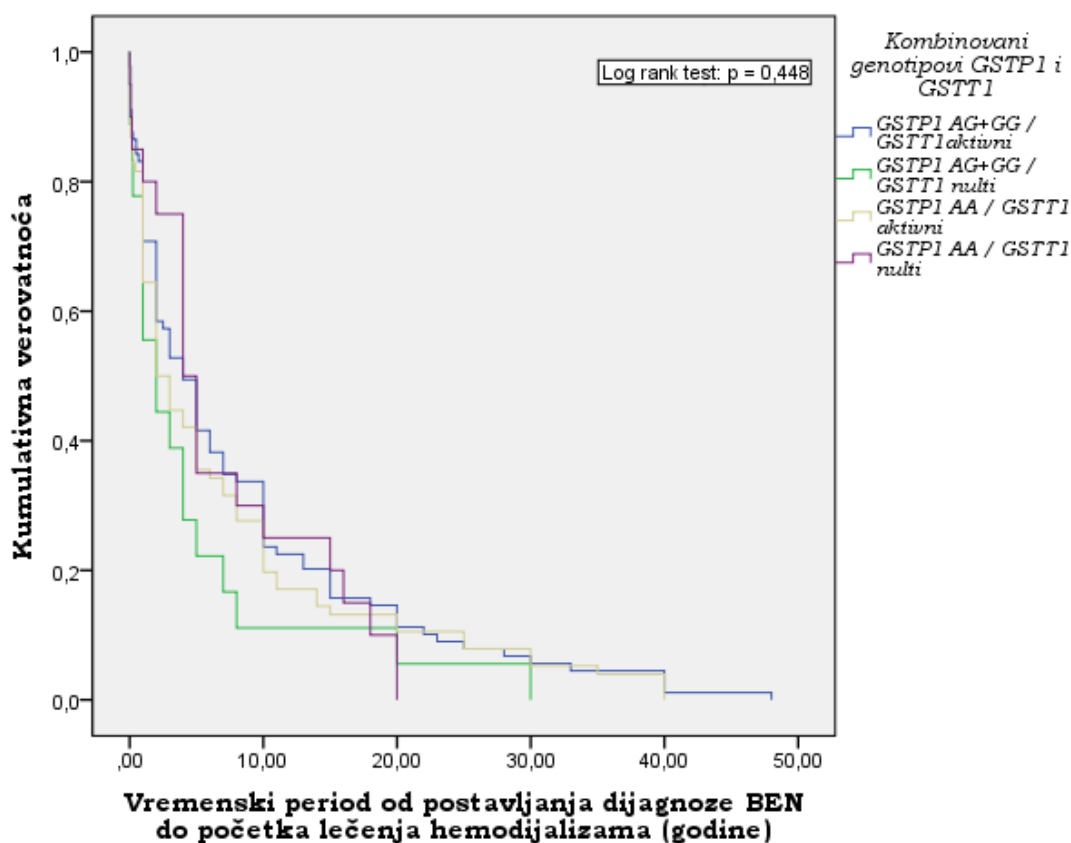
Grafikon 11. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva kombinovanih *GSTP1*/*GSTM1* genotipova.

aktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan,

nulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

Medijane vremenskih perioda od dijagnostikovanja endemske nefropatije do početka lečenja hemodijalizama su jednake kod bolesnika sa *GSTT1 nultim* genotipom nosioca bar jednog varijantnog *G* alela *GSTP1* i bolesnika sa *GSTT1 aktivnim* genotipom nosioca *GSTP1 AA* genotipa, međutim, one su kraće od medijana istih vremenskih perioda u bolesnika nosioca preostalih kombinacija *GSTT1* i *GSTP1* genotipova (Log rank test: $p = 0,448$, Grafikon 12.).



Grafikon 12. Kaplan-Meierove krive preživljavanja:

Trajanje Balkanske endemske nefropatije od postavljanja dijagnoze do početka lečenja hemodijalizama u zavisnosti od prisustva kombinovanih *GSTP1/GSTT1* genotipova.
aktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan,
nulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan.

U našoj studiji su ispitivani i uticaji genetskog polimorfizma *GSTP1* kombinovanog sa polimorfizmima *GSTT1* i *GSTM1*, kao i efekat kombinovanih delecioni polimorfizama *GSTT1* i *GSTM1* gena na početak lečenja hemodijalizama endemske nefropatije (Tabela 10.).

Tabela 10. Kombinovani genetski polimorfizam *GST* kao prediktor terminalne insuficijencije bubrega kod bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom.

GST genotipovi	HR^a (CI 95%)	p
<i>GSTT1</i> + <i>GSTM1</i>		
<i>GSTT1</i> nulti ^c / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	1 ^d	
<i>GSTT1</i> nulti ^c / <i>GSTM1</i> nulti ^c	0,6 (0,3-1,2)	0,189
<i>GSTT1</i> aktivni ^b / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	0,7 (0,4-1,1)	0,112
<i>GSTT1</i> aktivni ^b / <i>GSTM1</i> nulti ^c	0,7 (0,4-1,2)	0,172
<i>GSTP1</i> + <i>GSTM1</i>		
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	1 ^d	
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTM1</i> nulti ^c	1,1 (0,8-1,4)	0,578
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTM1</i> aktivni ^b	1,1 (0,8-1,3)	0,621
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTM1</i> nulti ^c	0,9 (0,7-1,2)	0,391
<i>GSTP1</i> + <i>GSTT1</i>		
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTT1</i> nulti ^c	1 ^d	
<i>GSTP1</i> AA / <i>GSTT1</i> aktivni ^b	1,0 (0,8-1,2)	0,797
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTT1</i> nulti ^c	1,3 (0,9-1,9)	0,179
<i>GSTP1</i> AG+GG / <i>GSTT1</i> aktivni ^b	0,9 (0,7-1,1)	0,238

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^baktivni genotip ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^cnulti ako nijedan aktivan alel nije prisutan;

^dreferentna grupa;

HR - hazard ratio;

CI - interval poverenja.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 10., može se uočiti da ispitanici bez aktivnih alela *GSTM1* i *GSTT1* gena imaju najniži rizik za lečenje endemske nefropatije hemodijalizama u odnosu na bolesnike nosioce *GSTM1* aktivnog i *GSTT1* nultog genotipa. Međutim, rizik u ovih

ispitanika nije dostigao statističku značajnost (HR = 0,6; CI = 0,3–1,2; p = 0,189).

Dok uticaj kombinovanih genetskih polimorfizama *GSTP1* i *GSTM1* u našoj studiji nije doprineo riziku za lečenje BEN hemodijalizama, najveći rizik da budu lečeni HD dobijen je u ispitanika koji osim *GSTT1 nultog* genotipa imaju prisutan bar jedan varijantni G alel *GSTP1* umesto *GSTP1 AA* genotipa. Međutim, uvećanje rizika za 30% nije i statistički značajno (HR = 1,3; CI = 0,9–1,9; p = 0,179).

4.6 UTICAJ GENETSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA NA POJAVU TUMORA UROTELIJALNOG TRAKTA U BALKANSKOJ ENDEMSKOJ NEFROPATIJU

Kako je pušenje jedan od najznačajnijih i najviše ispitivanih faktora rizika za nastanak karcinoma urotelijuma, koji su značajno češći u populaciji oboleloj od Balkanske endemske nefropatije, s jedne strane, i kako su kancerogeni duvanskog dima supstrati za gotovo sve ispitivane izoenzime glutation transferaza, s druge strane, ispitivan je uticaj genetskih polimorfizama *GST* za nastanak tumora urotelijuma u bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom.

Da bi procenili uticaj genetskih polimorfizama glutation transferaza na pojavu tumora urotelijuma u BEN, sprovedena je „*case-control*“ studija. Naime, ispitanici studijske grupe su razvrstani na osnovu prisustva tumora mokraćnih puteva na bolesnike sa i bez tumora urotelijuma. Takođe, izvršena je podela bolesnika sa endemskom nefropatijom na nepušače i pušače (Tabela 11.)

Tabela 11. Distribucija pušača i nepušača sa Balkanskom endemskom nefropatijom i rizik za nastanak tumora urotelijuma.

Navike pušenja	Bolesnici sa TU <i>n</i> (%)	Bolesnici bez TU <i>n</i> (%)	OR^a (CI 95%)	p
Nepušači	18 (58)	120 (68)	1,0 ^b	
Pušači	13 (42)	56 (32)	3,3 (1,1-10,0)	0,034*

^aKontrolisano u odnosu na pol i starost.

^breferentna grupa;

n - broj učesnika;

OR - *odds ratio*;

CI - interval poverenja;

TU – tumor urotelijuma;

* - statistički značajna razlika.

Iako ne postoji statistički značajno veća zastupljenost pušača u bolesnika sa tumorima urotelijuma ($p = 0,271$), dobijeni rezultati o pušenju kao faktoru rizika u populaciji bolesnika sa BEN za tumore urotelijuma pokazuju da su pušači izloženi 3,3 puta značajno većem riziku nego nepušači ($OR = 3,3$; $CI = 1,1-10,0$; $p = 0,034$).

Demografske karakteristike učesnika studije o tumorima urotelijuma u BEN su prikazane u tabeli 12. Iz prikazanih rezultata se vidi da nije bilo statistički značajne razlike između bolesnika sa i bez tumora urinarnog trakta u pogledu polne distribucije, indeksa telesne težine i dužine lečenja hemodijalizama, iako je lečenje hemodijalizama trajalo duže u bolesnika sa tumorima urotelijuma nego u grupi obolelih bez TU (7,5 godina *vs.* 5,4 godina, $p = 0,149$). Međutim, oboleli sa tumorima urotelijuma u odnosu na bolesnike bez TU su bili značajno stariji (74,13 godina *vs.* 69,98 godina; $p < 0,001$) i njihova bolest je značajno duže trajala (22,2 godine *vs.* 11,7 godina; $p < 0,001$).

Tabela 12. Demografske karakteristike bolesnika sa i bez tumora urotelijuma u Balkanskoj endemskoj nefropatiji.

Demografske karakteristike	Bolesnici sa TU <i>n</i> = 31	Bolesnici bez TU <i>n</i> = 176	p
Pol			
muški <i>n</i> (%)	16 (52)	100 (57)	p = 0,590
ženski <i>n</i> (%)	15 (48)	76 (43)	
Starost			
Srednja vrednost ± SD	74,13 ± 4,14	69,98 ± 6,70	p < 0,001*
BMI			
Srednja vrednost ± SD	24,2 ± 4,5	24,7 ± 4,4	p = 0,609
Trajanje bolesti od dijagnoze do uključivanja u studiju (godine)			
Srednja vrednost ± SD	22,2 ± 14,4	11,7 ± 9,0	p < 0,001*
Trajanje bolesti od dijagnoze do početka HD (godine)			
Srednja vrednost ± SD	14,6 ± 13,6	6,2 ± 8,5	p < 0,001*
Trajanje lečenja HD (godine)			
Srednja vrednost ± SD	7,5 ± 7,8	5,4 ± 4,0	p = 0,149

TU - tumori urotelijuma;
n - broj učesnika;
 BMI - indeks telesne težine;
 SD - standardna devijacija;
 HD - hemodijaliza;
 * - statistički značajna razlika.

Rezultati distribucije frekvencije *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* genotipa kod bolesnika sa i bez tumorima urotelijuma i uticaj genetskog polimorfizma glutation transferaza na pojavu tumora urotelijuma u Balkanskoj endemskoj nefropatiji prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Distribucija *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* genotipa i rizik za pojavu tumora urotelijuma u Balkanskoj endemskoj nefropatiji.

GST genotip	Bolesnici sa TU <i>n</i> (%)	Bolesnici bez TU <i>n</i> (%)	OR^a (CI 95%)	p
<i>GSTA1</i> C-69T				
CC	11 (36)	47 (27)	1,0 ^d	
CT	14 (45)	96 (54)	0,8 (0,2–2,5)	0,683
TT	6 (19)	33 (19)	0,4 (0,2–1,0)	0,061
CT+TT	20 (64)	129 (73)	0,5 (0,2–1,2)	0,107
<i>GSTM1</i>				
aktivni ^b	18 (58)	97 (55)	1,0 ^d	
nulti ^c	13 (42)	79 (45)	0,9 (0,4–2,0)	0,757
<i>GSTT1</i>				
nulti ^c	5 (16)	34 (19)	1,0 ^d	
aktivni ^b	26 (84)	142 (81)	1,1 (0,4–3,2)	0,875
<i>GSTP1</i> A1578G				
AA	13 (42)†	84 (48)	1,0 ^d	
AG	17 (55)†	75 (43)	1,3 (0,6–3,0)	0,503
GG	1 (3)†	15 (9)	0,6 (0,1–5,0)	0,574
AG+GG	18 (58)†	90 (52)	1,2 (0,5–2,7)	0,615

^aKontrolisano u odnosu na pol, navike pušenja i starost.

^baktivni genotip - ako je bar jedan aktivni alel prisutan;

^cnulti genotip - ako nijedan aktivan alel nije prisutan;

^dreferentna grupa;

n - broj učesnika;

OR - odds ratio;

CI - interval poverenja;

† - distribucija genotipa nije u skladu sa Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom;

* - statistički značajna razlika.

U distribuciju frekvencije *GSTA1* genotipa, može se uočiti da je u grupi bolesnika bez TU zastupljeno 27% bolesnika sa CC genotipom, 54% sa CT genotipom i 19% bolesnika sa *GSTA1* TT genotipom. U grupi bolesnika sa TU, učestalost *GSTA1* CC genotipa je veća nego u grupi bolesnika bez TU (36% *vs.* 27%), dok je zastupljenost *GSTA1* TT

genotipa ista (19%) u obe grupe bolesnika. Iako prisutna, razlika u distribuciji frekvencija *GSTA1* genotipa između ove dve grupe bolesnika nije i statistički značajna ($p = 0,558$).

Iz prikazanih rezultata distribucije frekvencije *GSTM1* genotipa, može se primetiti da u obe ispitivane grupe bolesnika više od polovine ispitanika ima bar jedan aktivni alel *GSTM1*, dok su preostali bolesnici nosioci *GSTM1 nultog* genotipa. U grupi bolesnika sa tumorima urotelijuma, učestalost *GSTM1 aktivnog* genotipa je nešto veća nego u grupi bolesnika bez TU (58% *vs.* 55%), ali bez statističke značajnosti ($p = 0,760$).

Posmatrajući distribuciju *GSTT1* genotipa, može se uočiti da 81% bolesnika bez tumora urotelijuma su nosioci *GSTT1 aktivnog* genotipa. Zastupljenost *GSTT1 aktivnog* genotipa u bolesnika sa TU (84%) je veća nego u grupi bolesnika bez tumora urotelijuma. Iako je učestalost *GSTT1 aktivnog* genotipa u grupi obolelih sa TU veća, ona nije i statistički značajna ($p = 0,675$).

Iz rezultata distribucije učestalosti *GSTP1* genotipa, može se primetiti da 48% bolesnika bez TU ima AA genotip, 43% AG i 9% GG genotip. Učestalost AA genotipa u grupi bolesnika sa TU je 42%, AG genotipa 55%, dok je učestalost *GSTP1 GG* genotipa manja (3% *vs.* 9%) u odnosu na grupu bolesnika bez tumora mokraćnih puteva. Međutim, kako samo jedan bolesnik sa tumorom urotelijuma ima *GSTP1 GG* genotip, bilo kakvu statističku značajnost razlike u učestalosti bi trebalo prihvatiti sa oprezom jer u ovom slučaju postoji ograničenje za primenu X^2 testa ($p = 0,366$).

Dobijene distribucije za *GSTA1* polimorfizam u obe grupe bolesnika, kao i distribucija *GSTP1* polimorfizma u grupi bolesnika bez tumora su bile u skladu sa Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom (*GSTA1*: $p = 0,464$ u grupi bolesnika sa TU; $p = 0,335$ u grupi bolesnika bez TU; *GSTP1*: $p = 0,887$ u grupi bolesnika bez TU). Međutim, distribucija *GSTP1* polimorfizma u grupi bolesnika sa tumorima

urotelijuma nije bila u skladu sa Hardy-Weinbergovim ekvilibrijumom ($p = 0,003$). Najverovatnije je to posledicama male zastupljenosti *GSTP1* GG genotipa u bolesnika sa BEN (8%), s jedne strane, i malog broja obolelih sa tumorima urotelijuma (31 bolesnik), s druge strane. Za *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizme, Hardy-Weinbergov ekvilibrijum nije proveravan. Naime, korišćene metode za određivanje delecionijskih polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* gena u našoj studiji, ne mogu da naprave razliku između heterozigota i homozigota *GSTM1* i *GSTT1* *aktivnog* genotipa.

Iz prikazanih rezultata distribucije *GST* genotipa se može uočiti da je rizik za pojavu tumora u endemskoj nefropatiji snižen kod bolesnika sa *GSTA1* CT ili *GSTA1* TT genotipom u poređenju sa obolelim nosiocima *GSTA1* CC genotipa. Međutim, smanjenje rizika za 50% nije i statistički značajno (OR = 0,5; CI = 0,2–1,2; $p = 0,107$).

Bolesnici u našoj studiji sa *GSTM1* *nultim* genotipom imaju manji rizik za nastanak TU u odnosu na osobe sa *aktivnim* *GSTM1* genotipom (OR = 0,9; CI = 0,4–2,0; $p = 0,757$), dok bolesnici sa *GSTT1* *aktivnim* genotipom u poređenju sa obolelima bez oba *GSTT1* gena, imaju 1,1 puta veći rizik za nastanak tumora urotelijuma. Rizik u grupi obolelih sa *aktivnim* *GSTT1* genotipom, međutim, nema statističku značajnost (OR = 1,1; CI = 0,4–3,2; $p = 0,875$).

Iz prikazanih rezultata u tabeli 13., može se uočiti da je rizik za pojavu tumora u endemskoj nefropatiji 1,2 puta veći kod bolesnika nosioca bar jednog varijantnog G alela *GSTP1* nego kod obolelih sa *GSTP1* AA genotipom, ali povećanje rizika nije i statistički značajno (OR = 1,2; CI = 0,5–2,7; $p = 0,615$).

5. DISKUSIJA

Iako je intenzivno ispitivana od polovine prošlog veka, Balkanska endemska nefropatija je i dalje enigma. Urađeno je više naučnih studija da bi se utvrdili uzroci nastanka endemske nefropatije (4-9). Sprovedena istraživanja, međutim, nisu razjasnila njenu etiologiju. Trenutno, u naučnim krugovima se vodi rasprava da li je uzročnik endemske nefropatije aristolohična kiselina ili/i ohratoksin A. Uočene su velike sličnosti, ali i razlike u kliničkoj slici i patološkom nalazu između nefropatije uzrokovane aristolohičnom kiselinom i BEN (13,14,20). Za obe nefropatije, pored sličnosti u patohistološkom nalazu, upečatljiva je pojava tumora gornjih mokraćnih puteva (6,12,19). Međutim, postoje i razlike: Balkanska endemska nefropatija ima sporiju progresiju i porodičnu zastupljenost što nije karakteristika AAN (14). Za konjugate aristolohične kiseline i DNK je pokazano da su prisutni u korteksu bubrega i tkivu tumora urinarnog trakta obolelih od endemske nefropatije (6). Nedavno su objavljeni rezultati istraživanja Stiborove i saradnika (117), o uticaju ohratoksina A na formiranje konjugata aristolohične kiseline i DNK. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na smanjenu detoksikaciju aristolohične kiseline i povećanu genotoksičnost AA u jetri i bubrezima pacova u prisustvu ohratoksina A. Iako je ohratoksin A proglašen od EFSA (*EU Committee on Food Safety*) za nebitan faktor u nastanku endemske nefropatije i udruženih malignih tumora urotelijuma (118), u prilog hipotezi da je OTA značajan faktor rizika u nastanku BEN, ukazuje prisustvo OTA specifičnih DNK konjugata: OTA-dG i OTA-O-3'-dGMP u bolesnika iz Srbije, Hrvatske i Bugarske, sa i bez tumora gornjeg urinarnog trakta (12,19). Za razliku od specifičnih konjugata OTA sa DNK, konjugati OTHQ i OTA sa glutationom (OTHQ-SG i OTB-SG), zbog svoje stabilnosti, mogu biti markeri izloženosti ovom mikotoksinu (25). Za OTHQ-SG i OTB-SG je pokazano da su prisutni u krvi i urinu obolelih od endemske nefropatije

(25). Iako je OTA rasprostranjen mikotoksin, sve izložene osobe neće oboleti od endemske nefropatije (20), što ukazuje da pored razlike u kumulativnoj dozi i trajanju izloženosti ohratoksinu A, individualna osetljivost predstavlja faktor rizika za BEN. Takođe, treba naglasiti da reakcije nastanka OTHQ-SG i OTB-SG mogu biti katalisane različitim glutation transferazama. Međutim, uprkos ovim činjenicama, uloga ovih enzima kao modulatora individualne osetljivosti za nastanak nefropatije u metabolizmu ohratoksina A nije proučavana.

Sadašnje mišljenje vodećih naučnika u ovoj oblasti je da je BEN posledica interakcije gena i faktora spoljašnje sredine (119). Zato se poslednjih decenija i dalje intenzivno ispituje značaj interakcije gena i faktora spoljašnje sredine u nastanku Balkanske endemske nefropatije.

Već izvesno vreme je poznato da različita ekspresija enzima za detoksikaciju ksenobiotika, uzrokovana genetskim polimorfizmima, može uticati na predispoziciju za nastanak različitih oboljenja (51,52,120,121,122). Kod ljudi, genetski polimorfizmi su prisutni u većini gena različitih klasa glutation transferaza, enzima II faze detoksikacije (36-42). Kako u većini tkiva, distribucija izoenzima glutation transferaza nije uniformna, procese detoksikacije i štetne efekte elektrofilnih jedinjenja u velikoj meri određuje odgovarajući izoenzimski profil glutation transferaza tih tkiva (29,30). Međutim, uprkos velikom značaju koje solubilne glutation transferaze različitih klasa imaju u metabolizmu ksenobiotika kao i značajnoj zastupljenosti ovih enzima u tkivu bubrega (1% od svih proteina) (30), uticaj genetskog polimorfizma *GST* na rizik za pojavu endemske nefropatije je ispitivan samo u dve studije (96,97).

Zbog toga je cilj ovog istraživanja bio da ispita da li genetski polimorfizam *GST* doprinosi individualnoj osetljivosti za nastanak endemske nefropatije. Naša hipoteza da polimorfizam *GST* može biti razlog različite osetljivosti za nastanak BEN je zasnovana na činjenici da

glutation transferaze mogu da katališu različite reakcije u metabolizmu ohratoksina A.

Nasuprot podacima o genetskim polimorfizmima *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* u BEN (96,97), u literaturi ne postoje podaci o ispitivanju distribucije *GSTA1* genotipa u endemskoj nefropatiji.

GSTA1-1 deluje kao ključni citosolni enzim jetre u glutation zavisnim detoksikacijama ksenobiotika endogenog i egzogenog porekla i antioksidantnoj zaštiti, naročito u osoba bez konstitutivne ekspresije *GSTM1-1*, nastale zbog delecije *GSTM1* gena. Osim u sistemskoj detoksikaciji, zbog značajne ekspresije u ćelijama proksimalnih tubula (98), *GSTA1-1* ima veoma bitnu ulogu u zaštiti bubrežnog tkiva od krajnjih produkata nastalih u metabolizmu endogenih i egzogenih jedinjenja. Najpromiskuitetniji enzim iz familije citosolnih glutation transferaza (123), *GSTA1-1* osim reakcija konjugacije elektrofilnih jedinjenja sa GSH, zahvaljujući svojoj peroksidaznoj aktivnosti učestvuje i u detoksikaciji štetnih organskih hidroksiperoksida (65).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali udruženost nezavisnog genetskog polimorfizma *GSTA1* sa rizikom nastanka endemske nefropatije. Naime, za ispitanike koji su nosioci bar jedne genetske varijante *GSTA1*B* (varijantni *T* alel *GSTA1*) je pokazano da imaju 1,6 puta veći rizik nastanka BEN od osoba sa *GSTA1*A/*A* genotipom. Za genetski polimorfizam *GSTA1*, koji se sastoji od tri vezana SNP: G-52A, C-69T i T-567G u proksimalnom promoteru, pokazano je da ima za posledicu kvantitativne razlike u ekspresiji (41) i aktivnosti enzima (61). Naime, supstitucija baze na poziciji -52 uzrokuje četiri puta nižu ekspresiju *GSTA1-1* u jetri osoba sa *GSTA1 TT* genotipom (41).

Iz dosadašnjih saznanja o katalitičkoj aktivnosti *GSTA1-1* i nefrotoksičnosti ohratoksina A, možemo pretpostaviti dva moguća mehanizma nastanka oštećenja bubrežnog tkiva u endemskoj nefropatiji kojima doprinosi genetski polimorfizam *GSTA1*: (1) smanjenu

konjugaciju sa glutationom kod osoba sa *GSTA1 TT* genotipom i (2) pro-oksidativno dejstvo slobodnih radikala, nastalih u metabolizmu OTA, zbog smanjene antioksidantne aktivnosti *GSTA1-1*.

U mehanizmu smanjene konjugacije sa GSH, pretpostavka je da su aktivirani metaboliti OTA (Slika 6.) ili njegov hinonski metabolit OTHQ (Slika 7.) supstrati enzima *GSTA1-1*. Iako nema dokaza u dosadašnjoj literaturi o direktnoj ulozi *GSTA1-1* u metabolizmu ohratoksina A, u prilog ove pretpostavke govori podatak o prisustvu konjugata OTB-SG i OTHQ-SG u krvi i urinu obolelih od endemske nefropatije (25). Štaviše, *in silico* analizom za *GSTA1-1*, najpromiskuitetniji enzim iz familije glutation transferaza (123), je pokazano da u njegovom aktivnom mestu mogu nastati konjugati OTA i OTHQ sa glutationom (124). U bubrežnom tkivu, distribucija izoenzima glutation transferaza nije uniformna: *GSTA1-1* je najzastupljenija u ćelijama proksimalnih tubula (98). Patohistološkim analizama bubrežnog tkiva obolelih od endemske nefropatije u ranim fazama bolesti, pokazano je da se patološki procesi prevashodno ispoljavaju u ćelijama proksimalnih tubula (125). Uzimajući u obzir prethodno navedene podatke sa činjenicom da se OTA akumulira u tubulima bubrega (126), logično je pretpostaviti da enzim *GSTA1-1* ima bitnu ulogu u metabolizmu ohratoksina A i da će u osoba sa prisutnim mutantnim *GSTA1*B* alelom, udruženim sa nižom aktivnošću enzima (41,61), konjugacija OTA sa GSH biti smanjena. Nije poznato da li su konjugati OTA sa glutationom toksični ili ne.

Pored toga, u pro-oksidativnom mehanizmu nefrotoksičnosti OTA, smanjena antioksidantna aktivnost *GSTA1-1* bi doprinela toksičnom dejstvu ohratoksina A. Naime, u mnogim istraživanjima je nedvosmisleno pokazano prisustvo pojačane produkcije slobodnih radikala u metabolizmu OTA (127,128,129). Za OTA u literaturi postoje podaci da osim što utiče na povećano stvaranje slobodnih radikala, s jedne strane, takođe smanjuje i ekspresiju enzima

uključenih u sintezu i potrošnju glutaciona, s druge strane (130,131). U humanim ćelijama proksimalnih tubula (HK-2) nađeno je da izlaganje ohratoksinu A dovodi do oslobađanja reaktivnih kiseoničnih radikala i nastanka 8 – hidroksideoksi-guanozina, biomarkera oksidativnog oštećenja DNK (132). Prema tome, logična je pretpostavka da će nedostatak antioksidantne aktivnosti GSTA1-1 u uslovima hroničnog izlaganja OTA doprineti većem stepenu oksidativnog stresa u tkivu bubrega. U prilog ovoj pretpostavci, pored rezultata našeg istraživanja, govori i nedavna hipoteza Cavina i saradnika (133), o prisustvu oksidativnog stresa pod dejstvom ohratoksina A zbog smanjenje antioksidativne aktivnosti glutation transferaza. Druga grupa istraživača je pokazala da OTA u koncentracijama nekoliko puta većim od onih koje su otkrivene u krvi ljudi i životinja, smanjuje ekspresiju i aktivnosti glutation transferaza inhibicijom transkripcionog faktora Nrf2 (eng. *nuclear redox sensitive erythroid 2-like transcription factor*) u ćelijskoj liniji tubula bubrega (LLC-PK1) (134). Poznato je da inhibicija Nrf2 dovodi do smanjene ekspresije ključnih enzima u sintezi i metabolizmu glutaciona, kao što su gama glutamil-cistein ligaza i GSTP1-1 (130,135). Mada, Nrf2 ne učestvuje u regulaciji ekspresije GSTA1 (65), smanjenja količina GSTA1 proteina u osoba sa GSTA1 TT genotipom možda produbljuje oksidativni stres u BEN. Takođe je poznato da GSTA1-1 učestvuje kao modulator MAP kinaznih (eng. *mitogen-activated protein kinase*) signalnih puteva, mehanizmom koji uključuje protein-protein interakcije. Naime, GSTA1-1 sa JNK (eng. *c-Jun N-terminal kinase*) formira kompleks, koji modifikuje aktivnost JNK u vreme ćelijskog stresa. Faktori koji utiču na asocijaciju i disocijaciju GSTA1-1-JNK kompleksa nisu poznati. Nedavno je sugerisano da u mehanizmu JNK aktivacije indukovane menadionom, stvaranje reaktivnih kiseoničnih radikala (najverovatnije superoksid anjona) i količina intraćelijskog glutaciona igraju važnu ulogu u sprečavanju disocijacije GSTA1-1-JNK kompleksa, koja zatim aktivacijom JNK indukuje citotoksičnost (136). Smanjena količina GSH

u ćelijama proksimalnih tubula bubrega izloženih OTA (137), prisustvo pro-oksidativnih metabolita ohratoksina A, kao i oksidativnog stresa u endemskoj nefropatiji (138), otvaraju mogućnost da i ovakav mehanizam aktivacije JNK u kojem učestvuje GSTA1-1 može imati ulogu u nastanku Balkanske endemske nefropatije.

Na značaj genetskog polimorfizma *GSTA1* u nastanku BEN ukazuju i drugi rezultati našeg istraživanja. Naime, osim izolovanog uticaja polimorfizma *GSTA1*, u našem istraživanju je pokazano da je rizik za nastanak endemske nefropatije kod nosioca bar jednog varijantnog *T* alela *GSTA1* u prisustvu *GSTP1* AA genotipa 2,1 puta veći nego u nosioca *GSTA1* CC genotipa ($p = 0,036$). Najveći rizik za nastanak BEN imali su, međutim, učesnici studije koji su osim *GSTA1* CT ili *GSTA1* TT genotipa imali i deleciju oba *GSTT1* gena ($OR = 2,3$; $CI = 1,0-5,3$; $p = 0,046$).

Balkanska endemska nefropatija je bolest zemljoradnika (103), a za njih je pokazano da umiru od hronične insuficijencije bubrega i malignih tumora urotelijuma, najverovatnije zbog izloženosti pesticidima (104). Zbog pretpostavke da je *GSTT1*-1 uključen u metabolizam pesticida, u našem istraživanju je ispitivan delecioni polimorfizam *GSTT1* gena.

Jedina izvedena epidemiološka studija o polimorfizmu *GSTT1* gena u BEN, nije pokazala značajne razlike u distribuciji učestalosti *GSTT1* genotipa između ispitanika studijske i kontrolne grupe (96). Međutim, kako je u bugarskoj studiji bilo uključeno samo 54 bolesnika sa BEN, rezultati našeg istraživanja dobijeni na znatno većem broju ispitanika, pokazali su znatno veću zastupljenost *GSTT1* aktivnog genotipa u grupi obolelih ($p = 0,057$). Više ispitanika sa *GSTT1* aktivnim genotipom bilo je i u grupi bolesnika sa tumorima mokraćnih puteva. Međutim, dobijeni rizik za nastanak endemske nefropatije kod ispitanika sa *GSTT1* aktivnim genotipom iako je 1,5 veći nego kod osoba sa *GSTT1* nultim genotipom, nije dostigao statističku značajnost

($p = 0,126$). U saglasnosti sa našim rezultatima su podaci dobijeni u studiji Lebruna i saradnika (11), koji su pokazali da izlaganje primarnih kultura humanih urotelijalnih ćelija ohratoksinu A uzrokuje velike interindividualne razlike u stepenu oštećenja DNK, koje su povezane sa polimorfizmima *GSTT1*, *GSTM1* i *GSTP1* gena. Naime, u njihovom istraživanju, oštećenje DNK u urotelijalnim ćelijama izlaganih ohratoksinu A je bilo češće u donora sa *GSTT1* *aktivnim* genotipom. Ali, uprkos činjenici da *GSTT1* *aktivni* genotip doprinosi riziku za nastanak BEN, konjugacija OTA sa GSH posredstvom enzima GSTT1-1 je teško izvodljiva zbog nemogućnosti pristupa velikog molekula ohratoksina A aktivnom mestu GSTT1-1 (139). Međutim, iako nije razjašnjena uloga GSTT1-1 u metabolizmu OTA, zbog stava srpskih istraživača da bi istraživanja pojave malignih tumora urotelijuma u endemskim područjima neosporno doprinela i rasvetljavanju etiologije BEN (1), naše rezultate smo upoređivali sa rezultatima studija o karcinomima mokraćne bešike i bubrega. Naime, rezultati nekoliko istraživanja o karcinomima mokraćne bešike i bubrega su pokazali da osobe sa *GSTT1* *aktivnim* genotipom izložene pesticidima imaju povećan rizik za razvoj ovih maligniteta (94,140), što je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja da su ispitanici nosioci *GSTT1* *aktivnog* genotipa sa našeg područja izloženi većem riziku obolevanja od endemske nefropatije.

Nasuprot našim rezultatima o genetskom polimorfizmu *GSTT1*, u istraživanju Chena i saradnika (13) sprovedenom u populaciji žute rase, pokazano je da je *GSTT1* *nulti* genotip faktor rizika za nastanak AAN, naročito za sporo progresivni oblik ove nefropatije. U istraživanju Chena i saradnika (13), međutim, nije ispitivan genetski polimorfizam *GSTA1*. Zbog preovladavajućeg mišljenja da Balkanska endemska nefropatija i AAN predstavljaju jedan entitet, u tumačenju nekonzistentnih rezultata o uticaju genetskih polimorfizama *GST* u različitim rasama treba uzeti u obzir podatak da je homozigotna delecija *GSTT1* prisutna u oko 20% pripadnika bele i crne rase, dok je *GSTT1* *nulti* genotip najviše

zastupljen u pripadnika žute rase (87,88,141). Takođe, dok pripadnici bele i crne rase imaju sličnu učestalost homozigota *T* alela *GSTA1*, najmanju učestalost *GSTA1 TT* genotipa imaju pripadnici žute rase (1-3%) (61).

Zbog značajne ekspresije *GSTP1-1* u epitelu mokraćnih puteva i distalnim tubulima bubrega (98,109) i detoksikacije uroepitelnih kancerogena: akroleina, diol-epoksida policikličnih aromatičnih ugljovodonika i pesticida iz grupe organofosfata (110-113), u našem istraživanju ispitivan je genetski polimorfizam *GSTP1 Ile105Val*.

U literaturi, osim istraživanja Andonove i saradnika (96), ne postoje drugi podaci o ispitivanju genetskog polimorfizma *GSTP1* u endemskoj nefropatiji. Epidemiološka studija sprovedena u Bugarskoj nije pokazala razlike u distribuciji učestalosti *GSTP1* genotipova između bolesnika sa endemskom nefropatijom i kontrolne grupe (96). Naime, u istraživanju sprovedenom u susednoj zemlji, još jednom endemskom području BEN, rezultati su pokazali manju učestalost *GSTP1 GG* genotipa među bolesnicima sa BEN u odnosu na kontrolnu grupu (4% *vs.* 15%; $p = 0,090$). Niža zastupljenost *GSTP1 GG* genotipa u bolesnika sa endemskom nefropatijom je dobijena i na našem području (8% *vs.* 13%; $p = 0,269$). Naši rezultati su pokazali da efekat prisustva *GSTP1 GG* genotipa u odnosu na *GSTP1 AA* genotip ne utiče na smanjenje rizika nastanka endemske nefropatije. Interesantno je, međutim, da genetski polimorfizam *GSTP1* iako nema uticaj za nastanak BEN doprinosi da bolesnici nosioci bar jednog varijantnog *G* alela *GSTP1* gena i *GSTA1 CC* genotipa imaju najveći rizik da budu lečeni hemodijalizama ($HR = 1,4$; $CI = 0,9 - 2,4$; $p = 0,169$). Takođe, rezultati našeg istraživanja su pokazali da oboleli od endemske nefropatije koji su nosioci *GSTP1 AG* genotipa imaju najveći rizik za nastanak tumora urotelijuma ($OR = 1,3$; $CI = 0,6 - 3,0$; $p = 0,503$), što je u saglasnosti sa meta-analizom Kellenove i saradnika (108), koja je pokazala da osobe nosioci *GSTP1 AG* genotipa imaju umeren rizik za

nastanak karcinoma mokraćne bešike u odnosu na osobe sa *GSTP1* AA genotipom (OR =1,27; CI = 1,00 – 1,59; p = 0,04).

Dok su genetski polimorfizmi *GSTT1*, *GSTM1* i *GSTA1* povezani sa nedostatkom ili smanjenom ekspresijom detoksikacionog enzima, posledica genetskog polimorfizma *GSTP1* je izmenjena enzimska aktivnost. Na osnovu podataka iz literature o indirektnoj ulozi *GSTP1*-1 u metabolizmu OTA, u našem istraživanju prepostavili smo da rizik za Balkansku endemsku nefropatiju nosi varijantni G alel *GSTP1* gena. Naime, Lebrun i saradnici (11) su, u svom istraživanju o genetskim polimorfizmima glutation transferaza i toksičnosti ohratoksina A u primarnim humanim urotelijalnim ćelijama, pokazali da je *GSTP1* AG ili *GSTP1* GG genotip češće prisutan kod ispitanika sa oštećenjem DNK u ćelijama izlaganim ohratoksinu A. To je u saglasnosti sa našim rezultatima koji su pokazali da prisustvo bar jednog varijantnog G alela *GSTP1* kod ispitanika naše studije povećava rizik da njihova bolest bude lečena hemodijalizama.

Kako se različite glutation transferaze preklapaju u pogledu supstratne specifičnosti, moguće je da nakon apoptoze ćelija proksimalnih tubula (142,143) i smanjene količine *GSTA1* proteina, koji je prevashodno eksprimiran u ovom delu nefrona, u metabolizmu OTA pretežno učestvuje *GSTP1*-1, poreklom iz distalnih tubula. O smanjenoj katalitičkoj aktivnosti *GSTP1*-1 kao mogućem uzroku nefrotoksičnosti OTA, u literaturi ne postoje dokazi. Štaviše, brojna naučna istraživanja ukazuju da je malo verovatno da ohratoksin A ispoljava svoja brojna toksična dejstva jednim jasno definisanim mehanizmom (144,145). Po mišljenju Marin-Kuanove i saradnika (144), mehanizme delovanja OTA treba tražiti u kompleksnoj mreži epigenetskih mehanizama, uključujući oksidativni stres i modulacije specifičnih ćelijskih signalnih puteva. U prilog pro-oksidativnom mehanizmu nefrotoksičnosti OTA, nedavno je pokazano da *GSTP1*-1 sa valinom na poziciji 105 manje efektivno stvara heterodimer sa peroksiredoksinom VI (*Prdx6*) nego

enzim sa izoleucinom na poziciji 105, što dovodi do povećane lipidne peroksidacije (146). Naime, poznato je da za aktivaciju peroksidazne aktivnosti Prdx6 je neophodna njegova heterodimerizacija sa GSTP1-1. Nakon heterodimerizacije sa Prdx6, GSTP1-1 procesom S - glutationilacije učestvuje u aktivaciji peroksidazne aktivnosti Prdx6 (147). U uslovima hroničnog izlaganja OTA, smanjena detoksikacija lipidnih peroksida nastala usled smanjenog stvaranja heterodimera GSTP1-1 sa Prdx6, zbog prisustva GSTP1-1 sa valinom na poziciji 105, verovatno će doprineti većem stepenu oksidativnog stresa u tkivu bubrega.

Treći pretpostavljeni uzrok BEN su policiklični aromatični ugljovodonici (102) poreklom iz lignita (15). Interesantno je, da uprkos činjenici da su diol-epoksidi policikličnih aromatičnih ugljovodonika lignita supstrati ne samo GSTA1-1 već i drugih glutation transferaza, prevashodno GSTM1-1, u literaturi nema podataka da li genetski polimorfizmi ovih enzima imaju kumulativni efekat na rizik za nastanak BEN. O delecionom polimorfizmu *GSTM1* u Balkanskoj endemskoj nefropatiji postoje podaci samo iz dve studije bugarskih istraživača (96,97). Naime, Andonova i saradnici (96) su sprovedi istraživanje u studiji slučajeva i kontrola, koja je imala kontrolnu grupu sa endemskog područja (54 pacijenata sa BEN i 104 kontrola), dok je kontrolna grupa u studiji istraživačke grupe Toncheve (97) bila sa ne-endemskog područja (95 pacijenata sa BEN i 112 kontrola). Rezultati ovih studija pokazali su da je zastupljenost bolesnika sa prisutnim aktivnim alelom *GSTM1* veća u odnosu na kontrolnu grupu, s tim što su rezultati istraživanja Andonove i saradnika (96) pokazali da je veća učestalost *GSTM1 aktivnog* genotipa u bolesnika i statistički značajna. I u našoj studiji, kao i u studijama bugarskih istraživača, zastupljenost bolesnika sa *GSTM1 aktivnim* genotipom je bila veća u grupi obolelih. Takođe, zastupljenost *GSTM1 aktivnog* genotipa bila je veća i u grupi bolesnika sa tumorima urotelijuma. Zbog značajno niže zastupljenosti

GSTM1 *nultog* genotipa u bolesnika sa BEN, zaključak Andonove i saradnika (96) je da su osobe bez prisutnih aktivnih alela *GSTM1* zaštićenije od nastanka endemske nefropatije. U većini istraživanja o različitim karcinomima, primarna hipoteza je da osobe sa *GSTM1* *nultim* genotipu zbog nedostatka konstitutivne ekspresije *GSTM1*-1 imaju veći rizik za nastanak karcinoma zbog nemogućnost adekvatne detoksikacije kancerogenih diol-epoksida nastalih u metabolizmu policikličnih aromatičnih ugljovodonika (58). Međutim, kako su izotiocijanati, nastali razgradnjom glukozinolata prisutnih u povrću, supstrati glutation transferaza i značajni induktori GST i drugih detoksikacionih enzima, pretpostavlja se da *GSTM1* *nulti* genotip udružen sa sniženom aktivnošću enzima, možda produžavanjem polu-života izotiocijanata doprinosi potencijalno većoj hemoprotektivnoj ulozi povrća (71,72). Rezultati naše studije, sprovedene u znatnoj većoj grupi bolesnika, nisu pokazali značajnu razliku u distribuciji varijanti *GSTM1* gena, što ukazuje da vrlo verovatno *GSTM1*-1 ne učestvuje u metabolizmu jedinjenja odgovornih za nastanak BEN. Naši rezultati su, takođe, u saglasnosti sa rezultatima Chena i saradnika (13), koji su u pokazali da genetske varijante *GSTM1* ne utiču na nastanak nefropatije uzrokovane aristolohičnom kiselinom.

Brojna naučna istraživanja su pokazala nedvosmisleni udruženost endemske nefropatije sa malignim tumorima urotelijuma (102,148-151). U našem epidemiološko-genetskom istraživanju, oboleli sa tumorima mokraćnih puteva su bili stariji i duži vremenski period su lečeni hemodijalizama nego bolesnici bez tumora urotelijuma, što potencijalno ukazuje da je izloženost faktoru spoljašnje sredine nastanka tumora u BEN ili niska ili da on nije potentan kancerogen. Prema IARC (eng. *International Agency for Research on Cancer*), ohratoksin A pripada 2B grupi kancerogena (152), dok je za aristolohičnu kiselinu dokazano da je kancerogen za humanu populaciju (153). Štaviše, u istraživanju nefropatije uzrokovane

kineskim biljnim preparatima za mršavljenje, koji su sadržali aristolohičnu kiselinu, u Belgiji je pokazano da je skoro polovina obolelih u roku od nekoliko godina dobila maligne tumore gornjih mokraćnih puteva (154,155). Rezultati našeg istraživanja o pušenju kao faktoru rizika za tumore urotelijuma u BEN su potvrdili da su pušači i u populaciji bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom izloženi 3,3 puta značajno većem riziku nego nepušači. Međutim, iako je u našem istraživanju učestalost malignih tumora mokraćnih puteva bila veća (15%) od učestalosti tumora urotelijuma u opštoj populaciji (6%) (156), mali broj bolesnika sa tumorima predstavlja značajno ograničenje naše studije. Prema tome, iako rezultati našeg istraživanja nisu pokazali udruženost genetskog polimorfizma glutation transferaza sa pojavom tumora urotelijuma u endemskoj nefropatiji, zbog prepoznatog ograničenja naše studije, potrebno je sprovesti dodatna istraživanja.

”Uzroci većine bolesti savremenog čoveka su multifaktorijalni. Uglavnom, jedan faktor predstavlja *conditio sine qua non* za nastanak patološkog procesa, dok su drugi često zanemareni, jer njihovi efekti nisu direktni ili su teško merljivi. Međutim, bez ovih faktora klinička slika i progresija bolesti bi bili drugačiji. Odgovori na pitanja, šta učestvuje a šta ne u etiologiji BEN, su podjednako teška, a jedan od razloga zašto je to tako je gore naveden” (18).

Rezultati prikazani u ovom radu nedvosmisleno ukazuju da su genetski polimorfizmi glutation transferaza modulatori individualne osetljivosti za nastanak BEN i potvrđuju pretpostavku da je endemska nefropatija odraz interakcije gena i faktora spoljašnje sredine (119).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata u ovom radu i diskusije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Polimorfizam gena za GSTA1-1 utiče na rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije. Prisustvo varijantnog *GSTA1*B* alela, koji za posledicu ima manju kvantitativnu ekspresiju GSTA1 proteina, povećava rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije 1,6 puta u odnosu na osobe nosioce *wild type GSTA1*A/*A* genotipa.
- Polimorfizam gena za GSTP1-1, GSTM1-1 i GSTT1-1 enzime ne utiče na rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije.
- Postoji udruženi efekat polimorfizama gena za GSTA1-1 i GSTT1-1 na rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije. Nosioći mutantnog *GSTA1*B* alela, sa nižom ekspresijom i aktivnošću GSTA1-1, kombinovanog sa *GSTT1 aktivnim* genotipom imaju 2,3 puta veći rizik za nastanak Balkanske endemske nefropatije u odnosu na ispitanike sa *GSTA1*A/*A* genotipom koji su bez aktivnih alela *GSTT1* gena.
- Varijantni aleli *GSTA1* i *GSTP1* gena, kao i *GSTM1 nulti* i *GSTT1 aktivni* genotip nisu nezavisni prediktori terminalne bubrežne insuficijencije kod bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom.

- Polimorfizam gena za GSTA1-1, GSTP1-1, GSTM1-1 i GSTT1-1 enzime ne utiče na rizik za pojavu tumora urotelijuma u Balkanskoj endemskoj nefropatiji.
- Polimorfizmi gena za GSTA1-1 i GSTT1-1 su modulatori individualne osetljivosti za nastanak Balkanske endemske nefropatije. S obzirom na dosadašnja saznanja o mogućoj katalitičkoj ulozi GSTA1-1 u metabolizmu ohratoksina A, značaj ovog mikotoksina kao etiološkog faktora rizika za nastanak Balkanske endemske nefropatije pruža mogućnost za dalja istraživanja.

7. LITERATURA

1. Đukanović Lj, Stefanović V, Basta-Jovanović G, Bukvić D, Glogovac S, Dimitrijević J, i dr. Istraživanja balkanske endemske nefropatije u Srbiji: kako dalje? *Srp Arh Celok Lek.* 2010;138 (3-4):256-61.
2. Janković S, Bukvić D, Marinković J, Janković J, Marić I, Djukanović Lj. Trends in incidence and prevalence of Balkan endemic nephropathy in the three most affected villages in Serbia over a 36-year period. *Ren Fail.* 2013;35(4):509-13.
3. Bukvić D, Janković S, Marić I, Stošović M, Arsenović A, Djukanović Lj. Today Balkan endemic nephropathy is a disease of elderly with a good prognosis. *Clin Nephrol.* 2009;72:105-13.
4. Radovanović Z. Epidemiologija i etiologija endemske nefropatije. U: Radovanović Z, Sindjić M, Polenaković M, Djukanović Lj, Petronić V, urednici. *Endemska nefropatija.* Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2000. p. 22-152.
5. Grollman AP, Jelaković B. Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2006;18(11): 2817-23.
6. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(29):12129-34.
7. Arlt VM, Stiborová M, vom Brocke J, Simões ML, Lord GM, Nortier JL, et al. Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. *Carcinogenesis.* 2007;28(11):2253-61.
8. Pavlović NM, Orem WH, Tatu CA, Lerch HE, Bunnell JE, Feder GL, et al. The role of lecithin cholesterol acyltransferase and organic substances from coal in the etiology of Balkan endemic nephropathy: a new hypothesis. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(3):949-54. (Abstract).
9. Yordanova P, Wilfried K, Tsoleva S, Dimitrov P. Ochratoxin A and β 2-microglobulin in BEN patients and controls. *Toxins (Basel).* 2010; 2(4):780-92.
10. Josephy PD. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics.* 2010;2010:876940.
11. Lebrun S, Golka K, Schulze H, Föllmann W. Glutathione S-transferase polymorphisms and ochratoxin A toxicity in primary human urothelial cells. *Toxicology.* 2006;224(1-2):81-90.

12. Pfohl-Leszkowicz A, Tozlovanu M, Manderville R, Peraica M, Castegnaro M, Stefanović V. New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51(9):1131-46.
13. Chen B, Bai Y, Sun M, Ni X, Yang Y, Yang Y, et al. Glutathione S-transferases T1 null genotype is associated with susceptibility to aristolochic acid nephropathy. *Int Urol Nephrol*. 2012;44(1):301-7. (Abstract).
14. De Broe ME. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int*. 2012;81(6):513-5.
15. Maharaj SV, Orem WH, Tatu CA, Lerch HE, Szilagyi DN. Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy. *Environ Geochem Health*. 2014;36(1):1-17.
16. Jernström B, Funk M, Frank H, Mannervik B, Seidel A. Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione. *Carcinogenesis*. 1996;17(7):1491-8.
17. Sundberg K, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernström B. Glutathione conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1. *Chem Res Toxicol*. 1997;10(11):1221-7.
18. Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL. The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers. *Environ Health Perspect*. 1998;106(11):689-700.
19. Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Castegnaro M, Nicolov IG, Chernozemsky IN, Bartsch H, et al. Ochratoxin A-related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. *IARC Sci Publ*. 1993;(124):141-8.
20. Pfohl-Leszkowicz A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009;60:465-83.
21. Stander MA, Steyn PS, van Der Westhuizen FH, Payne BE. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(3):302-4.
22. Dai J, Park G, Wright MW, Adams M, Akman SA, Manderville RA. Detection and characterization of a glutathione conjugate of ochratoxin A. *Chem Res Toxicol*. 2002 Dec;15(12):1581-8.
23. Wu Q, Dohnal V, Huang L, Kuča K, Wang X, Chen G, et al. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Curr Drug Metab*. 2011;12(1):1-10.

24. Atanasova SY, von Ahsen N, Toncheva DI, Dimitrov TG, Oellerich M, Armstrong VW. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 among patients with Balkan endemic nephropathy (BEN). *Clin Biochem.* 2005;38(3):223-8.
25. Tozlovanu M, Canadas D, Pfohl-Leszkowicz A, Frenette C, Paugh RJ, Manderville RA. Glutathione conjugates of ochratoxin A as biomarkers of exposure. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012; 63(4):417-27.
26. Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. The Role of Glutathione in Detoxication. *Environ Health Perspect.* 1983;49:59-69.
27. Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):335-56.
28. Hesse S, Jernström B, Martinez M, Moldéus P, Christodoulides L, Ketterer B. Inactivation of DNA-binding metabolites of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by glutathione and glutathione S-transferases. *Carcinogenesis.* 1982;3(7):757-61.
29. Commandeur JN, Stijntjes GJ, Vermeulen NP. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev.* 1995;47(2):271-330.
30. Rowe JD, Nieves E, Listowsky I. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem J.* 1997;325:481-6.
31. Simić T, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, Matić M, Mimić-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat Rev Urol.* 2009;6(5):281-9.
32. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2005;401:1-8.
33. Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J.* 1992;282:305-6.
34. Ranson H, Collins F, Hemingway J. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the Anopheles gambiae class I glutathione S-transferase family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(24):14284-9.
35. Mannervik B, Jensson H. Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J Biol Chem.* 1982;257(17):9909-12.

36. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad.* 1988;85:7293-7.
37. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 1994;300(Pt 1):271-6.
38. McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegård J, Evans DA, Rannug A, et al. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol.* 1997; 52(6):958-65.
39. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis.* 1997; 18(4):641-4.
40. Watson MA, Stewart RK, Smith GBJ, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency. *Carcinogenesis.* 1998;19(2):275-80.
41. Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH, et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):663-9.
42. Morel F, Rauch C, Coles B, Le Ferrec E, Guillouzo A. The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics.* 2002;12(4):277-86. (Abstract).
43. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, et al. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet.* 2005;37(7):727-32.
44. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No 1:R57-66.
45. Feuk L. Inversion variants in the human genome: role in disease and genome architecture. *Genome Med.* 2010;2(2):11.
46. Strachan T, Read A. Human molecular genetics. 4th ed. New York NY: Garland Science; 2010. Chapter 13, Human genetic variability and its consequences; p.405-40.

47. Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, et al. Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(3):229-36.
48. Ottman R. An epidemiologic approach to gene-environment interaction. *Genet Epidemiol.* 1990;7(3):177-85.
49. Ottman R. Gene-Environment Interaction: Definitions and Study Designs. *Prev Med.* 1996;25(6):764-70.
50. Ottman R. Gene-Environment Interaction and Public Health. *Am J Hum Genet.* 1995;56:821-3.
51. Wang J, Zou L, Huang S, Lu F, Lang X, Han L, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1, GSTT1 and risk of coronary heart disease. *Mutagenesis.* 2010;25(4):365-9.
52. Zhou TB, Ou C, Qin YH, Su LN, Lei FY, Huang WF, et al. Association of angiotensin converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism with idiopathic nephrotic syndrome susceptibility in children: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011;12(4):601-10.
53. Green J, Banks E, Berrington A, Darby S, Deo H, Newton R. N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene-environment interaction. *Br J Cancer.* 2000; 83(3):412-7.
54. García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes increase bladder cancer risk: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.* 2005; 366(9486): 649-59.
55. Raimondi S, Paracchini V, Autrup H, Barros-Dios JM, Benhamou S, Boffetta P, et al. Meta- and pooled analysis of GSTT1 and lung cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol.* 2006; 164(11):1027-42.
56. Spurdle AB, Chang JH, Byrnes GB, Chen X, Dite GS, McCredie MR, et al. A systematic approach to analysing gene-gene interactions: polymorphisms at the microsomal epoxide hydrolase EPHX and glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1, and GSTP1 loci and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(4):769-74.
57. Lee SA, Fowke JH, Lu W, Ye C, Zheng Y, Cai Q, et al. Cruciferous vegetables, the GSTP1 Ile105Val genetic polymorphism, and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(3):753-60.
58. Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C, Akpan V, Fonnesu ML, et al. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1,

- GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(8):1342-8.
59. Hope JH, Hope BE. A review of the diagnosis and treatment of Ochratoxin A inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *J Environ Public Health.* 2012;2012:835059.
 60. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445-600.
 61. Ping J, Wang H, Huang M, Liu ZS. Genetic analysis of glutathione S-transferase A1 polymorphism in the Chinese population and the influence of genotype on enzymatic properties. *Toxicol Sci.* 2006;89(2):438-43.
 62. Matsuno K, Kubota T, Matsukura Y, Ishikawa H, Iga T. Genetic analysis of glutathione S-transferase A1 and T1 polymorphisms in a Japanese population. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(5):560-2.
 63. Turesky RJ. The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *Curr Drug Metab.* 2004;5(2):169-80.
 64. Coles BF, Nowell SA, MacLeod SL, Sweeney C, Lang NP, Kadlubar FF. The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. *Mutat Res.* 2001;482(1-2):3-10. (Abstract).
 65. Coles BF, Kadlubar FF. Human alpha class glutathione S-transferases: Genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. *Methods Enzymol.* 2005;401,9-42.
 66. Lin D, Meyer DJ, Ketterer B, Lang NP, Kadlubar FF. Effects of Human and Rat Glutathione S-Transferases on the Covalent DNA Binding of the N-Acetoxy Derivatives of Heterocyclic Amine Carcinogens in Vitro: A Possible Mechanism of Organ Specificity in Their Carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994;54:4920-6.
 67. Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D, et al. Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet.* 1993; 53(1): 220-233.
 68. Widersten M, Pearson WR, Engström A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases μ and ψ . *Biochem J.* 1991;276(Pt 2): 519-24.
 69. Xu SJ, Wang YP, Roe B, and Pearson WR. Characterization of the Human Class Mu Glutathione S-Transferase Gene Cluster and the GSTM1 Deletion. *J Biol Chem.* 1998; 273: 3517-27.

70. Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, et al. Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*. 2002;23(8):1343-50.
71. Zhang Y, Kolm RH, Mannervik B, Talalay P. Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206(2):748-55. (Abstract).
72. van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, van Hooijdonk Z, te Morsche RH, Wobbes T, et al. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2407-15.
73. Seow A, Yuan J-M, Sun C-L, Van Den Berg D, Lee H-P, Yu MC. Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):2055-61.
74. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *Biol Chem*. 1997; 272(15):10004-12.
75. Hu X, Xia H, Srivastava SK, Herzog C, Awasthi YC, Ji X, et al. Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238(2):397-402. (Abstract).
76. Zimniak P, Nanduri B, Piłka S, Bandorowicz-Piłka J, Singhal SS, Srivastava SK, et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem*. 1994;224(3):893-9.
77. Hu X, Pal A, Krzeminski J, Amin S, Awasthi YC, Zimniak P, Singh SV. Specificities of human glutathione S-transferase isozymes toward anti-diol epoxides of methylchrysenes. *Carcinogenesis*. 1998; 19(9):1685-9.
78. Glatt H, Piée A, Pauly K, Steinbrecher T, Schrode R, Oesch F, et al. Fjord- and bay-region diol-epoxides investigated for stability, SOS induction in *Escherichia coli*, and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and mammalian cells. *Cancer Res*. 1991;51(6):1659-67.
79. Sundberg K, Johansson A-S, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*. 1998;19(3):433-6.

80. Hu X, Xia H, Srivastava SK, Pal A, Awasthi YC, Zimniak P, et al. Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenanthrene and benzo[g]chrysene. *Cancer Res.* 1998; 58(23):5340-3.
81. Hu X, Herzog C, Zimniak P, Singh SV. Differential Protection against Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced DNA Damage in HepG2 Cells Stably Transfected with Allelic Variants of π Class Human Glutathione S-Transferase. *Cancer Res.* 1999;59:2358-62.
82. Tan KL, Webb GC, Baker RT, Board PG. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. *Genomics.* 1995; 25(2):381-7.
83. Ploemen JH, Wormhoudt LW, van Ommen B, Commandeur JN, Vermeulen NP, van Bladeren PJ. Polymorphism in the glutathione conjugation activity of human erythrocytes towards ethylene dibromide and 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1243(3) : 469-76.
84. Wiencke JK, Pemble S, Ketterer B, Kelsey KT. Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4(3):253-9.
85. Yong LC, Schulte PA, Wiencke JK, Boeniger MF, Connally LB, Walker JT, et al. Hemoglobin adducts and sister chromatid exchanges in hospital workers exposed to ethylene oxide: effects of glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(5):539-50.
86. Bernardini S, Hirvonen A, Pelin K, Norppa H. Induction of sister chromatid exchange by 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes: influence of GSTT1 genotype. *Carcinogenesis.* 1998; 19(2):377-80.
87. Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis.* 1995; 16(5):1243-5. -85
88. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *Natl Cancer Inst.* 2002;94(4):297-306.
89. Alexandrie AK, Rannug A, Juronen E, Tasa G, Warholm M. Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the GSTT1 gene. *Pharmacogenetics.* 2002;12(8):613-9.(Abstract).

90. Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, Green T, Hayes JD. Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochem J.* 1997;326(Pt 3):837-46.
91. Guengerich FP. Activation of alkyl halides by glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2005;401:342-53.
92. Thier R, Pemble SE, Kramer H, Taylor JB, Guengerich FP, Ketterer B. Human glutathione S-transferase T1-1 enhances mutagenicity of 1,2-dibromoethane, dibromomethane and 1,2,3,4-diepoxybutane in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis.* 1996;17(1):163-6.
93. Thier R, Lewalter J, Kempkes M, Selinski S, Brüning T, Bolt HM. Haemoglobin adducts of acrylonitrile and ethylene oxide in acrylonitrile workers, dependent on polymorphisms of the glutathione transferases GSTT1 and GSTM1. *Arch Toxicol.* 1999;73(4-5):197-202.
94. Simić T, Matić M, Pekmezović T, Savić Radojević A, Plješa-Ercegovac M, Đukić T, i dr. Značaj genetičkog polimorfizma glutation transferaza u nastanku karcinoma mokraćne bešike. U: Djukanović Lj, Ristić S, urednici. *Savremena istraživanja endemske nefropatije*. Foča: Medicinski fakultet Univerziteta Istočno Sarajevo; 2009. p.103-15.
95. Cantor KP, Villanueva CM, Silverman DT, Figueroa JD, Real FX, Garcia-Closas M, et al. Polymorphisms in GSTT1, GSTZ1, and CYP2E1, disinfection by-products, and risk of bladder cancer in Spain. *Environ Health Perspect.* 2010;118(11):1545-50.
96. Andonova IE, Sarueva RB, Horvath AD, Simeonov VA, Dimitrov PS, Petropoulos EA, et al. Balkan endemic nephropathy and genetic variants of glutathione S-transferases. *J Nephrol.* 2004;17(3):390-8.
97. Toncheva DI, Von Ahsen N, Atanasova SY, Dimitrov TG, Armstrong VW, Oellerich M. Identification of NQO1 and GSTs genotype frequencies in Bulgarian patients with Balkan endemic nephropathy. *J Nephrol.* 2004;17(3):384-9.
98. Sundberg A, Appelkvist E L, Dallner G, Nilsson R. Glutathione transferases in the urine: sensitive methods for detection of kidney damage induced by nephrotoxic agents in humans. *Environ Health Perspect.* 1994;102(Suppl 3):293-6.
99. Brockmöller J, Kerb R, Drakoulis N, Staffeldt B, Roots I. Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study. *Cancer Res.* 1994;54(15):4103-11.

100. Katoh T, Inatomi H, Kim H, Yang M, Matsumoto T, Kawamoto T. Effects of glutathione S-transferase (GST)M1 and GSTT1 genotypes on urothelial cancer risk. *Cancer Lett.* 1998;132:147-52.
101. Stefanović V, Toncheva D, Atanasova S, Polenaković M. Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *Am J Nephrol.* 2006;26(1):1-11.
102. U.S. Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2010. Chapter 5, Cancer; p. 221-350.
103. Đukanović Lj, Velimirović V, Sindić M. Endemska nefropatija. U: Đukanović Lj, Oštrić V, urednici. Bolesti bubrega. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1999. p. 357-66.
104. Waggoner JK, Kullman GJ, Henneberger PK, Umbach DM, Blair A, Alavanja MC, et al. Mortality in the agricultural health study, 1993-2007. *Am J Epidemiol.* 2011;173(1):71-83.
105. Cao W, Cai L, Rao JY, Pantuck A, Lu ML, Dalbagni G, et al. Tobacco smoking, GSTP1 polymorphism, and bladder carcinoma. *Cancer.* 2005;104(11):2400-8.
106. Mittal RD, Srivastava DS, A M, B M. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes (CYP2E1, GSTP1) and susceptibility to bladder cancer in North India. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2005;6(1):6-9.
107. Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Hautefeuille A, Donato F, et al. GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer.* 2004;110(4):598-604.
108. Kellen E, Hemelt M, Broberg K, Golka K, Kristensen VN, Hung RJ, et al. Pooled analysis and meta-analysis of the glutathione S-transferase P1 Ile 105Val polymorphism and bladder cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol.* 2007;165(11):1221-30.
109. Terrier P, Townsend AJ, Coindre JM, Triche TJ, Cowan KH. An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am J Pathol.* 1990;137(4):845-53.
110. Cohen SM, Garland EM, St John M, Okamura T, Smith RA. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 1992;52(13):3577-81.

111. Di Ilio C, Sacchetta P, Iannarelli V, Aceto A. Binding of pesticides to alpha, mu and pi class glutathione transferase. *Toxicol Lett.* 1995;76(2):173-7.
112. Pal A, Hu X, Zimniak P, Singh SV. Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in the glutathione conjugation of alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Cancer Lett.* 2000;154(1):39-43.(Abstract).
113. Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(1):7-25.
114. Stefanović V, Djukanović Lj, Čukuranović R, Bukvić D, Ležaić V, Marić I, et al. Beta2-microglobulin and alpha1-microglobulin as markers of Balkan endemic nephropathy, a worldwide disease. *Ren Fail.* 2011;33(2):176-83.
115. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996;107(2):229-33.
116. Davies MH, Elias E, Acharya S, Cotton W, Faulder GC, Fryer AA, et al. GSTM1 null polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus: phenotype and genotype studies in patients with primary biliary cirrhosis. *Gut.* 1993;34:549-53.
117. Stiborová M, Bárta F, Levová K, Hodek P, Frei E, Arlt VM, et al. The influence of ochratoxin A on DNA adduct formation by the carcinogen aristolochic acid in rats. *Arch Toxicol.* 2014 Sep 11. [Epub ahead of print] (Abstract.)
118. EFSA 2006. European Food Safety Authority. Opinion of Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin in food. *EFSA J.* 2006;365:1-56.
119. Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z, Nortier J, Cosyns JP, Grollman AP, et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;0:1-9.
120. Matić M, Pekmezović T, Djukić T, Mimić-Oka J, Dragicević D, Krivić B, et al. GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 polymorphisms and susceptibility to smoking-related bladder cancer: a case-control study. *Urol Oncol.* 2013;31(7):1184-92.
121. Šuvakov S, Damjanović T, Stefanović A, Pekmezović T, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, et al. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(1):202-12.

122. Šuvakov S, Damjanović T, Pekmezović T, Jakovljević J, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, et al. Associations of GSTM1*0 and GSTA1*A genotypes with the risk of cardiovascular death among hemodialyses patients. *BMC Nephrol.* 2014;15:12.
123. Hou L, Honaker MT, Shireman LM, Balogh LM, Roberts AG, Ng KC, et al. Functional promiscuity correlates with conformational heterogeneity in A-class glutathione S-transferases. *J Biol Chem.* 2007; 282(32):23264-74.
124. Reljić Z, Zlatović M, Savić-Radojević A, Pekmezović T, Djukanović Lj, Matić M, et al. Is increased susceptibility to Balkan endemic nephropathy in carriers of common GSTA1 (*A/*B) polymorphism linked with the catalytic role of GSTA1 in ochratoxin A biotransformation? Serbian case control study and *in silico* analysis. *Toxins (Basel).* 2014;6(8):2348-62.
125. Janković Veličković Lj, Dolićanin Z, Stefanović V. Endemic nephropathy and upper urothelial carcinoma - new insights in molecular biology. *Prilozi.* 2014;35(1):57-64.
126. Anzai N, Jutabha P, Endou H. Molecular mechanism of ochratoxin A transport in the kidney. *Toxins (Basel).* 2010;2(6):1381-98.
127. Rahimtula AD, Béréziat JC, Bussacchini-Griot V, Bartsch H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem Pharmacol.* 1988;37(23):4469-77.
128. Meki AR, Hussein AA. Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2001;130(3):305-13.
129. Palabiyik SS, Erkekoglu P, Zeybek ND, Kizilgun M, Baydar DE, Sahin G, et al. Protective effect of lycopene against ochratoxin A induced renal oxidative stress and apoptosis in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2013;65(6):853-61.
130. Marin-Kuan M, Ehrlich V, Delatour T, Cavin C, Schilter B. Evidence for a role of oxidative stress in the carcinogenicity of ochratoxin A. *J Toxicol.* 2011;2011:645361.
131. Guilford FT, Hope J. Deficient glutathione in the pathophysiology of mycotoxin-related illness. *Toxins (Basel).* 2014;6(2):608-23.
132. Arbillaga L, Azqueta A, Ezpeleta O, López de Cerain A. Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. *Mutagenesis.* 2007;22(1):35-42.
133. Cavin C, Delatour T, Marin-Kuan M, Holzhäuser D, Higgins L, Bezençon C, et al. Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity. *Toxicol Sci.* 2007;96(1):30-9.

134. Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Jozkowicz A, Huebbe P, Blank R, Wolfram S, et al. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(8):2665-71.
135. Limonciel A, Jennings P. A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity. *Toxins (Basel).* 2014;6(1):371-9.
136. Adnan H, Antenos M, Kirby GM. The effect of menadione on glutathione S-transferase A1 (GSTA1): c-Jun N-terminal kinase (JNK) complex dissociation in human colonic adenocarcinoma Caco-2 cells. *Toxicol Lett.* 2012; 214:53–62.
137. Schaaf GJ, Nijmeijer SM, Maas RF, Roestenberg P, de Groene EM, Fink-Gremmels J. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1588(2):149-58.
138. Cvetković T, Pavlović D, Vlahović P, Kocić G, Djordjević BV. Antioxidant status in Balkan endemic nephropathy. *Nephron.* 1998;78(3):358-9.
139. Shokeer A, Mannervik B. Residue 234 is a master switch of the alternative-substrate activity profile of human and rodent theta class glutathione transferase T1-1. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1800(4): 466–73.
140. Buzio L, De Palma G, Mozzoni P, Tondel M, Buzio C, Franchini I, et al. Glutathione S-transferases M1-1 and T1-1 as risk modifiers for renal cell cancer associated with occupational exposure to chemicals. *Occup Environ Med.* 2003; 60(10):789-93.
141. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(12):1239-48.
142. Savin M, Bumbaširević V, Djukanović Lj, Petronić V. The significance of apoptosis for early diagnosis of Balkan nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(6):30-2.
143. Belicza M, Dzombeta T, Stanić G, Tomić K, Lenicek T, Perić-Balja M, et al. Higher apoptotic cell rate in Balkan endemic nephropathy-stereologic analysis. *Acta Clin Croat.* 2011;50(1):45-50.
144. Marin-Kuan M, Cavin C, Delatour T, Schilter B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. *Toxicon.* 2008;52(2):195-202.
145. Mally A, Hard GC, Dekant W. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(11):2254-60.

146. Manevich Y, Hutchens S, Tew KD, Townsend DM. Allelic variants of glutathione S-transferase P1-1 differentially mediate the peroxidase function of peroxiredoxin VI and alter membrane lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 2013;54:62-70.
147. Zhou S, Lien YC, Shuvaeva T, De Bolt K, Feinstein SI, Fisher AB. Functional interaction of glutathione S-transferase pi and peroxiredoxin 6 in intact cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(2): 401-7.
148. Čukuranović R, Ignjatović M, Stefanović V. Urinary tract tumors and Balkan nephropathy in the South Morava River basin. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:S80-4.
149. Stefanović V, Radovanović Z. Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2008;5(2):105-12.
150. Janković Veličković Lj, Hattori T, Stefanović V. Molecular markers in upper urothelial carcinoma associated to Balkan endemic nephropathy. Aristolochic acid as the major risk factor of the worldwide disease. *Scientific World Journal* 2009;9:1360-73.
151. Stefanović V, Polenaković M, Toncheva D. Urothelial carcinoma associated with Balkan endemic nephropathy. A worldwide disease. *Pathol Biol (Paris).* 2011;59(5):286-91.
152. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 1993;56:1-599.
153. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2002;82:1-590.
154. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med.* 2000;342(23): 1686-92.
155. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, Wese FX, van Ypersele de Strihou C. Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1999;33(6):1011-7.
156. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin.* 2000;50(1):7-33.

SPISAK SKRAĆENICA

BEN	- Balkanska endemska nefropatija
HD	- hemodijaliza
OTA	- ohratoksin A
GST	- glutathion transferaze
DNK	- deoksiribonukleinska kiselina
<i>GSTT1</i>	- gen za glutathion transferazu GSTT1-1
<i>GSTM1</i>	- gen za glutathion transferazu GSTM1-1
<i>GSTP1</i>	- gen za glutathion transferazu GSTP1-1
AA	- aristolohična kiselina
AAN	- nefropatija uzrokovana aristolohičnom kiselinom (eng. <i>aristolochic acid nephropathy</i>)
PAHs	- policiklični aromatični ugljovodonici (eng. <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
OTA - dG	- ohratoksin A-deoksiguanozin
OTA-O-3' - dGMP	- ohratoksin A-O-3'-monofosfat-deoksiguanozin
OTHQ	- ohratoksin A-hidrohinon
OTQ	- ohratoksin A-hinon
H ⁺	- jon vodonika
GSH	- glutathion
OTHQ-SG	- ohratoksin A-hidrohinon konjugovan sa glutathionom
OTB-SG	- ohratoksin A-hinon konjugovan sa glutathionom

OTa	- ohratoksin α (ohratoksin alfa)
CYP1A1	- citohrom P 450 oksidaza 1A1
CYP3A4	- citohrom P 450 oksidaza 3A4
CYP3A5	- citohrom P 450 oksidaza 3A5
GSTA1-2	- glutation transferaza klase alfa sa subjedinicama 1 i 2
GST	- geni za glutation transferaze
iRNK	- informaciona ribonukleinska kiselina
SNPs	- polimorfizmi jednog nukleotida (eng. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
RFLPs	- polimorfizmi dužina restrikcionih fragmenata (eng. <i>restriction fragment length polymorphisms</i>)
RSPs	- polimorfizmi restrikcionog mesta (eng. <i>restriction site polymorphisms</i>)
kb	- kilo-baza
CNVs	- varijante broja kopija (eng. <i>copy number variants</i>)
InDel	- insercija/delecija (eng. <i>insertion/deletion variant</i>)
STRPs	- polimorfni mikrosateliti tj. polimorfizam kratkih tandemskih ponovaka (eng. <i>short tandem repeat polymorphisms</i>)
VNTRs	- minisateliti i varijabilan broj tandemskih ponovaka (eng. <i>variable numbers of tandem repeats</i>)
MSV	- „multisite“ varijanta (eng. <i>multisite variant</i>)
ISV	- strukturne varijante intermedijarne veličine (eng. <i>intermediate-sized structural variant</i>)
DNA	- deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>)

CNP	- polimorfizam broja kopija (eng. <i>copy number polymorphism</i>)
LCVs	- veliki CNV (eng. <i>large-scale CNV</i>)
<i>GSTA1</i>	- gen za glutathion transferazu <i>GSTA1</i> -1
<i>GSTA1-A5</i>	- grupa od pet gena glutathion transferaza klase alfa
<i>GSTA1*A</i>	- <i>A</i> genetska varijanta <i>GSTA1</i> (eng. <i>wild type GSTA1</i> alel)
<i>GSTA1*B</i>	- <i>B</i> genetska varijanta <i>GSTA1</i> (varijantni, mutantni <i>GSTA1</i> alel)
SNP G-52A	- polimorfizam jednog nukleotida u kojem je guanin na poziciji -52 zamenjen adeninom
SNP C-69T	- polimorfizam jednog nukleotida u kojem je citozin na poziciji -69 zamenjen timinom
SNP T-567G	- polimorfizam jednog nukleotida u kojem je timin na poziciji -567 zamenjen guaninom
<i>GSTA1 TT</i>	- homozigot <i>GSTA1 T</i> (timin) alela (homozigot varijantnog, mutantnog <i>GSTA1</i> alela)
<i>GSTA1</i> -1	- glutathion transferaza klase alfa sa dve subjedinice 1
N-acetoksi-PhIP	- N-acetoksi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b]piridin
<i>GSTM1</i> -1	glutathion transferaza klase mi sa dve subjedinice 1
DNK-PhIP	- konjugati DNK nastali u reakciji sa N-acetoksi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b]piridinom
<i>GSTM1</i> -5	- grupa od pet gena glutathion transferaza klase mi
<i>GSTM1*A</i> ,	- <i>A</i> genetska varijanta <i>GSTM1</i>
<i>GSTM1*B</i> ,	- <i>B</i> genetska varijanta <i>GSTM1</i>
<i>GSTM1*1x2</i>	- dva funkcionalna <i>GSTM1</i> gena u tandemu
<i>GSTM1*0</i>	- delecija <i>GSTM1</i> gena

p.K173N	- u 173 kodonu proteina asparaginskog kiselinom je zamenjen lizin
<i>GSTM2</i>	- gen za glutathion transferazu <i>GSTM2-2</i>
<i>GSTP1*A</i>	- <i>A</i> genetska varijanta <i>GSTP1</i>
<i>GSTP1*B</i>	- <i>B</i> genetska varijanta <i>GSTP1</i>
<i>GSTP1*C</i>	- <i>C</i> genetska varijanta <i>GSTP1</i>
SNP <i>Ile105Val</i>	- polimorfizam jednog nukleotida čija posledica je zamena aminokiseline izoleucina u 105 kodonu valinom
SNP <i>Ala114Val</i>	- polimorfizam jednog nukleotida čija posledica je zamena aminokiseline alanina u 114 kodonu valinom
<i>GSTP1*A</i> (105Ile/114Ala)	- <i>A</i> genetska varijanta <i>GSTP1</i> (105 Isoleucin/114 Alanin)
<i>GSTP1*B</i> (105Val/114Ala)	- <i>B</i> genetska varijanta <i>GSTP1</i> (105 Valin/114 Alanin)
<i>GSTP1*C</i> (105Val/114Val)	- <i>C</i> genetska varijanta <i>GSTP1</i> (105 Valin/114 Valin)
<i>GSTP1*D</i> (105Ile/114Val)	- <i>D</i> genetska varijanta <i>GSTP1</i> (105 Isoleucin/114 Valin)
SNP <i>A1578G</i>	- polimorfizam jednog nukleotida u kojem je adenin na poziciji -1578 zamenjen guaninom
<i>GSTP1 Val</i>	<i>GSTP1*B</i> i <i>GSTP1*C</i> genetska varijanta
<i>GSTP1 Ile</i>	<i>GSTP1*A</i> i <i>GSTP1*D</i> genetska varijanta
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	homozigot <i>GSTP1 Ile</i> alela
<i>GSTP1 Ile/Val</i>	heterozigot <i>GSTP1 Ile</i> i <i>GSTP1 Val</i> alela
<i>GSTP1 Val/Val</i>	homozigot <i>GSTP1 Val</i> alela
<i>GSTP1-1</i>	- glutathion transferaza klase pi sa dve subjedinice 1

CDNB	- 1-hlor-2,4-dinitrobenzen (eng. <i>1-chloro-2,4-dinitrobenzene</i>)
hGSTP1-1	- humana GSTP1-1
(I104,A113)	- (Izoleucin104, Alanin113)
(V104,V113)	- (Valin 104, Valin 113)
(+)-anti-BPDE	- (+)-anti-benzo[a]piren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksid
HepG2	- ćelijska linija humanog hepatocelularnog karcinoma
<i>GSTT1-2</i>	- grupa od dva gena glutation transferaza klase teta
<i>GSTT1-1</i>	- glutation transferaza klase teta sa dve subjedinice 1
<i>GSTT1*0</i>	- delecija <i>GSTT1</i> gena
<i>GSTT1*A</i>	- <i>A</i> genetska varijanta <i>GSTT1</i>
<i>GSTT1*B</i>	- <i>B</i> genetska varijanta <i>GSTT1</i>
<i>GSTT1*A/*A</i>	- homozigot <i>GSTT1* A</i> alela
<i>GSTT1*A/*B</i>	- heterozigot <i>GSTT1*A</i> i <i>GSTT1*B</i> alela
<i>GSTT1*0/*B</i>	- heterozigot <i>GSTT1*0</i> i <i>GSTT1*B</i> alela
TU	- tumor urotelijuma
PCR	- reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>polimerase chain reaction</i>)
PCR-RFLPs	- reakcija lančanog umnožavanja-polimorfizmi dužina restrikcionih fragmenata (eng. <i>polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms</i>)
EDTA	- etilen diamin tetra sirćetna kiselina (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
HCl	- hlorovodonična kiselina
<i>CYP1A1</i>	- gen za citohrom P 450 oksidazu 1A1
MgCl ₂	- magnezijum hlorid

bp	- bazni par
<i>GSTA1 CC</i>	- homozigot <i>GSTA1 C</i> (citozin) alela (homozigot eng. <i>wild type</i> alela <i>GSTA1</i>)
<i>GSTA1 CT</i>	- heterozigot <i>GSTA1 C</i> (citozin) i <i>GSTA1 T</i> (timin) alela
<i>GSTP1 AA</i>	- homozigot <i>GSTP1 A</i> (adenin) alela
<i>GSTP1 AG</i>	- heterozigot <i>GSTP1 A</i> (adenin) i <i>GSTP1 G</i> (guanin) alela
<i>GSTP1 GG</i>	- homozigot <i>GSTP1 G</i> (guanin) alela
X^2	- Hi kvadrat test
OR	- eng. <i>odds ratio</i>
CI	- interval poverenja (eng. <i>confidence interval</i>)
HR	- eng. <i>hazard ratio</i>
p	- verovatnoća
<i>n</i>	- broj učesnika
BMI	- indeks telesne težine (eng. <i>body mass index</i>)
SD	- standardna devijacija
EFSA	- eng. <i>EU Committee on Food Safety</i>
<i>GSTA1 *A/ *A</i>	- homozigot <i>GSTA1 *A</i> alela
HK-2	- ćelijska linija humanog proksimalnog tubula
Nrf2	- eng. <i>nuclear redox sensitive erythroid 2-like transcription factor</i>
LLC-PK1	- linija epitelnih ćelija bubrega svinje (eng. <i>pig kidney epithelial cells</i>)
MAP	- eng. <i>mitogen-activated protein</i>
JNK	- eng. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>

Prdx6 - peroksiredoksin VI

IARC - eng. *International Agency for Research on Cancer*

BIOGRAFIJA

Zorica Reljić (devojačko Sretović) je rođena 04.07.1967. godine u Kraljevu. Medicinski fakultet u Beogradu je upisala 1985/86. godine, koji je završila sa prosečnom ocenom 9,57 januara 1992. godine. Nakon volontiranja obaveznog staža u DZ “Dr Simo Milošević” u Železniku i položenog stručnog ispita, zaposlila se u ZC “Studenica” Kraljevo, 1993. godine, gde je dobila specijalizaciju iz kliničke biohemije. Specijalistički staž je započela aprila 1996. godine i obavila ga na Medicinskom fakultetu u Beogradu. U toku specijalističkog staža 1996/97. godine je upisala magistarske studije i završila ih sa prosečnom ocenom 10,00. Odbranila je magistarsku tezu, čiji je mentor bila Prof. dr Jasmina Mimić-Oka novembra 1999. godine, pod nazivom “Antioksidantni kapacitet krvne plazme hroničnih bubrežnih bolesnika”, pred komisijom u sastavu Akademik dr Bogdan Đuričić, Prof. dr Jasmina Mimić-Oka i Doc. dr Nada Dimković. Iste godine je položila i specijalistički ispit iz kliničke biohemije sa odličnom ocenom. Početkom 2002. godine je osnovala privatnu medicinsku laboratoriju “PAN lab” u Kraljevu, koja uspešno posluje četrnaestu godinu.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Zorica Reljić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Značaj genetskog polimorfizma glutation transferaza u nastanku Balkanske endemske nefropatije“

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 06.05.2015. godine

Zorica Reljić

Prilog 2.

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

Ime i prezime autora Zorica Reljić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „Značaj genetskog polimorfizma glutation transferaza u nastanku
Balkanske endemske nefropatije“

Mentor Prof. dr Tatjana Simić

Potpisani Zorica Reljić

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 06.05.2015. godine

Zorica Reljić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Značaj genetskog polimorfizma glutation transferaza u nastanku Balkanske endemske nefropatije“

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 06.05.2015. godine

Zorana Perout