

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Slavica R. Cimbalević

**POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA
ZA GLUTATION TRANSFERAZE KLAS
OMEGA SA NIVOOM OKSIDATIVNOG
STRESA KOD BOLESNIKA SA
TERMINALNOM SLABOŠĆU BUBREGA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Slavica R. Cimbaljevic

**ASSOCIATION OF GENETIC
POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE
TRANSFERASES OMEGA CLASS WITH
OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS
WITH END STAGE RENAL DISEASE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTOR:

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

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Nada Dimković**, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu,
Univerzitet u Beogradu
2. **Prof. dr Tatjana Pekmezović**, profesor Medicinskog fakulteta
u Beogradu, Univerzitet u Beogradu
3. **Prof. dr Marija Plješa-Ercegovac**, profesor Medicinskog fakulteta
u Beogradu, Univerzitet u Beogradu
4. **Doc. dr Marija Matić**, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu,
Univerzitet u Beogradu
5. **Dr sc. med Tatjana Damjanović**, naučni saradnik Medicinskog fakulteta
u Beogradu, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: 24. 06. 2016. god.

ZAHVALNOST

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, Prof. dr Tatjani Simić za ukazano poverenje da budem deo njenog kreativnog tima, podršku i podsticaj za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Zahvaljujem se na nesebičnom prenošenju iskustava i znanja još od početka moje specijalizacije iz kliničke biohemije, u toku izrade magistarske teze do pomoći pri izboru i osmišljavanju teme, angažovanju tokom izrade i pisanja ove disertacije i što je uvek bila tu da pruži pomoć pri rešavanju i najkompleksnijih problema.

Izražavam veliku zahvalnost na uloženom trudu i vremenu, pažljivom iščitavanju disertacije i korisnim sugestijama Prof. dr Nadi Dimković, Prof. dr Tatjani Pekmezović, Prof. dr Mariji Plješi-Ercegovac, doc. dr Mariji Matić i dr sc. med Tatjani Damjanović.

Zahvalnost izražavam dragim koleginicama, asistentima dr Sonji Šuvakov i dr Vesni Ćorić, dragoj kolegini dr sc. med Zorici Reljić i medicinskom tehničaru Sanji Sekulić na nesebičnoj pomoći prilikom eksperimentalnog rada.

Posebnu zahvalnost izražavam mom učitelju još od studentskih dana, Prof. dr Jasmini Mimić-Oka, koja nam je svima bila uzor i primer kako uspešan naučnik i profesor treba da izgleda.

Zahvaljujem se svima koji su me podržavali u profesionalnom radu, razumeli moju želju za novim saznanjima i bili uz mene u proteklom periodu.

Onima koje uvek pomenemo na kraju, a prvi su nam u srcu, mojoj porodici Branku, Marini i Nikoli hvala na razumevanju, ljubavi i podršci.

Posvećujem

Mojim roditeljima, Bini i Radiši u ime velike ljubavi i podrške koju su mi uvek pružali.

SAŽETAK

POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZE KLASSE OMEGA SA NIVOOM OKSIDATIVNOG STRESA KOD BOLESNIKA SA TERMINALNOM SLABOŠĆU BUBREGA

Slavica Cimbalević

Uvod: Terminalna bubrežna slabost (TBS) je stanje koje karakteriše oksidativni stres, što pokazuje povećan stepen oksidativnog oštećenja biološki važnih makromolekula. Oksidativni stres je kod pacijenata sa TBS povezan sa brojnim kardiovaskularnim komplikacijama. Pored uloge u detoksikaciji, citosolne glutation transferaze (GST) poseduju i antioksidantnu aktivnost. Članovi GST klase omega, GSTO1 i GSTO2, katališu nekoliko reakcija koje nisu tipične za ostale GST, kao što su reakcija uklanjanja glutationa i dehidroaskorbat reduktazna aktivnost. Polimorfizam gena postoji kod GSTO1 i GSTO2 klase, što rezultuje izmenjenom aktivnošću ovih enzima.

Cilj: Cilj ove studije bio je da se ispita povezanost polimorfizma *GSTO1*(rs 4925) i *GSTO2* (rs156697) gena sa oksidativnim fenotipom bolesnika sa TBS, kao i njihova uloga u preživljavanju kod ovih bolesnika.

Metode: Izvedena je studija slučajeva i kontrola koju je činilo 199 bolesnika sa potvrđenom dijagnozom TBS i 199 ispitanika uparenih po polu i starosti koji su činili kontrolnu grupu. Protokol studije je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta (Odluka broj 29/II-8, 29/XII-14), i istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom (revidiranom 2000.godine). Polimorfizam *GSTO* gena je određivan analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata po PCR-RFLP metodi (*polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism*, PCR–RFLP). Kao markeri oksidativnog oštećenja proteina i lipida spektrofotometrijski su određivani malondialdehid (MDA) (metoda po *Doussset-u*) i proteinske tiol grupe (metoda po *Jocelyn-u*), dok su karbonilne proteinske grupe i nitrotirozin određivani enzimskim

imunoesejima (*OxiSelect™ ELISA kits, Cell Biolabs*). Uticaj *GSTO1* i *GSTO2* genotipova na rizik za smrtni ishod analiziran je pomoću *Cox* regresione analize, a verovatnoća preživljavanja je analizirana pomoću *Kaplan-Meier* metode tokom 36 meseci praćenja bolesnika.

Rezultati: Dobijeni rezultati pokazuju da su osobe sa varijantnim *GSTO2 Asp/Asp* genotipom imale 2,45 veći rizik za razvoj TBS u odnosu na osobe sa referentnim *GSTO2Asn/Asn* genotipom (OR=2,45; 95%CI=1,18-5,07; p=0,016). Rezultati pokazuju da ne postoji povezanost različitih varijanti *GSTO1* gena i oksidativnog oštećenja proteina i lipida kod bolesnika sa TBS (p>0,05). Međutim, kod nosioca varijantnog genotipa *GSTO2Asp/Asp* uočen je statistički značajno viši nivo tiol grupa (p=0,005), dok je koncentracija MDA bila statistički značajno snižena (p=0,041) u odnosu na nosioce referentnog genotipa *GSTO2Asn/Asn* kod bolesnika sa TBS. Rezultati *GSTO1/GSTO2* haplotip analize pokazali su da haplotip kombinacija *GSTO1* varijantni/*GSTO2* referentni alel deluje protektivno na razvoj TSB (OR=0,23; 95%CI=0,12-0,44; p=0,001). Bolesnici koji su nosioci bar jednog *GSTO1* referentnog alela imaju kraće ukupno (log rank=2,844; p=0,241) i kardiovaskularno preživljavanje (log rank=4,211; p=0,122).

Zaključak: Polimorfizam gena za omega glutation transferaze je povezan sa povećanim rizikom za razvoj terminalne slabosti bubrega kao i sa preživljavanjem ovih bolesnika.

Ključne reči: glutation S-transferaza; polimorfizam gena; oksidativni stres, terminalna slabost bubrega

SUMMARY

ASSOCIATION OF GENETIC POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE TRANSFERASES OMEGA CLASS WITH OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH END STAGE RENAL DISEASE

Slavica Cimbalevic

Introduction: End-stage renal disease (ESRD) is a condition characterized by oxidative stress, as indicated by increased levels of oxidative damage of important biological macromolecules. Oxidative stress in patients with end-stage renal disease (ESRD) is associated with long-term cardiovascular complications. Cytosolic family of glutathione S-transferases (GSTs) is involved in detoxification of various toxic compounds, as well as antioxidant protection. GSTO1 and GSTO2 possess, unlike other GSTs, dehydroascorbate reductase and deglutathionylation activities. Gene polymorphism exists in both GSTO1 and GSTO2 class, which alters the expression of these enzymes activities.

The aim of this study was to investigate the association between *GSTO1* (rs 4925) and *GSTO2* (rs156697) polymorphism and oxidative phenotype of ESRD patients, as well as in survival of these patients.

Methods: Case-control study included 199 ESRD patients and 199 age- and gender-matched control subjects. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (permission number 29/II-8, 29/XII-14), and the research was carried out in compliance with the Helsinki Declaration (as revised in 2000). *GSTO* polymorphism was determined by PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) method. Protein thiol groups and malondialdehyde (MDA) were determined spectrophotometrically by the method of Jocelyn and Dousset, respectively. Carbonyl protein derivatives, nitrotyrosine and MDA adducts were measured by enzyme immunoassay (OxiSelect™ ELISA kits, Cell Biolabs). Cox proportional hazard model and Kaplan Meier analysis were performed to investigate the

role of GSTO1 and GSTO2 genetic polymorphism on mortality of ESRD patients during follow-up period (36 month).

Results: The obtained results indicate that individuals carrying variant *GSTO2 Asp/Asp* genotype were at 2.45-fold higher risk of ESRD development compared to wild type *GSTO2Asn/Asn* genotype carrying individuals (OR=2.45; 95%CI=1.18-5.07; p=0.016). The results show that there was no association between different *GSTO1* gene variants and protein or lipid oxidative damage markers (p>0.05). However, carriers of the variant *GSTO2 Asp/Asp* genotype had statistically significant increased concentration of the thiol group (p=0.005), while the concentration of MDA was significantly decreased (p=0.041) compared to the carriers of referent *GSTO2Asn/Asn* genotype.

The results of *GSTO1/GSTO2* haplotype analysis showed that haplotype combination of *GSTO1 (*A)/GSTO2 (*A)* (*GSTO1* variant/*GSTO2* wild type allele) was protective for ESRD (OR=0.23 95%CI=0.12-0.44, p=0.001). Patients carriers of at least one *GSTO1* reference allele have shorter mean overall (Log rank=2.844, p=0.241) and cardiovascular survival probability (Log rank=4.211, p=0.122).

Conclusions: GSTO polymorphisms have been shown to act as significant markers in assessing the risk of ESRD development and patients' survival.

Keywords: end-stage renal disease; genetic polymorphisms; glutathione S-transferase; oxidative stress

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. TERMINALNA BUBREŽNA SLABOST	1
1.2. POREMEĆAJ REDOKS RAVNOTEŽE	5
1.2.1. Kiseonični slobodni radikali	6
1.2.2. Mehanizmi antioksidantne zaštite	9
1.2.2.1. Enzimske komponente sistema antioksidantne zaštite	10
1.2.2.2. Ne-enzimske komponente sistema antioksidantne zaštite	11
1.2.3. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa	12
1.2.3.1. Određivanje produkcije slobodnih radikala direktnim metodama	12
1.2.3.2. Određivanje aktivnosti slobodnih radikala indirektnim metodama	13
1.2.3.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ćelija	13
1.3. GLUTATION TRANSFERAZE	16
1.3.1. Struktura i funkcija glutathion transferaza	16
1.3.2. Nomenklatura glutathion transferaza	19
1.4. GLUTATION TRANSFERAZE KLASA OMEGA	21
1.4.1. Struktura i uloga GSTO1 i GSTO2	21
1.4.2. Tkivna distribucija GSTO1 i GSTO2	26
1.4.3. Polimorfizam glutathion transferaza klase omega	26
1.5. POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZE KLASE OMEGA SA OKSIDATIVNIM FENOTIPOM U TERMINALNOJ BUBREŽNOJ SLABOSTI	30

1.5.1. Značaj polimorfizama gena za glutation transferaze klase omega u oboljenjima čoveka.....	30
1.5.2. Oksidativni stres u hroničnoj slabosti bubrega.....	32
1.5.3. Povezanost polimorfizama gena za glutation transferaze klase omega sa nivoom oksidativnog stresa kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega	35
2. CILJEVI.....	36
3. MATERIJAL I METODE.....	37
3.1. SELEKCIJA ISPITANIKA.....	37
3.2. ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZE KLASA OMEGA	38
3.2.1. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline	38
3.2.2. Lančana reakcija polimerizacije DNK	38
3.2.3. Određivanje GSTO1 polimorfizma	39
3.2.4. Određivanje GSTO2 polimorfizma	41
3.3. ODREĐIVANJE POKAZATELJA NIVOA OKSIDATIVNOG STRESA.....	43
3.3.1. Određivanje koncentracije proteinskih tiol grupa.....	43
3.3.2. Određivanje koncentracije karbonilnih grupa	44
3.3.3. Određivanje koncentracije nitrotirozina	45
3.3.4. Određivanje koncentracije malondialdehida.....	45
3.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	47
4. REZULTATI.....	49
4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	49
4.2. GENSKI POLIMORFIZMI GLUTATION TRANSFERAZA KLASA OMEGA I RIZIK ZA NASTANAK TERMINALNE SLABOSTI BUBREGA	53

4.2.1. Distribucija haplotipova glutation trnsferaza klase omega i terminalna bubrežna slabost	55
4.3. POVEZANOST POKAZATELJA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA I POLIMORFIZAMA GSTO1 I GSTO2 GENA U TERMINALNOJ BUBREŽNOJ SLABOSTI.....	56
4.3.1. Povezanost sadržaja tiol grupa i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću	56
4.3.2. Povezanost sadržaja karbonilnih grupa i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću	59
4.3.3. Povezanost koncentracije nitrotirozina i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću	61
4.3.4. Povezanost sadržaja malondialdehida i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću	63
4.4. UTICAJ GENSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA KLAS E OMEGA NA PROGNOZU KOD BOLESNIKA SA TERMINALNOM SLABOŠĆU BUBREGA.....	65
5. DISKUSIJA	73
6. ZAKLJUČCI.....	84
7. LITERATURA.....	86

1. UVOD

1.1. TERMINALNA BUBREŽNA SLABOST

Terminalna bubrežna slabost (TBS), nastaje usled progresivnog i ireverzibilnog gubitka bubrežne funkcije i predstavlja završni stadijum hronične bubrežne bolesti (HBB). Opšte je prihvaćeno da je najbolji pokazatelj bubrežne funkcije jačina glomerulske filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR), pa se hronična bubrežna bolest definiše kao oštećenje strukture ili funkcije bubrega koje traje duže od tri meseca i/ili ima smanjenje jačine glomerulske filtracije ispod 60ml/min/1.73m² (1). Kao definicija HBB je odabran ovaj prag GFR zato što je pri ovoj vrednosti kod odraslih približno pola normalne funkcije bubrega izgubljeno.

Progresivno smanjenje glomerulske filtracije dovodi do promena u volumenu i sastavu telesnih tečnosti, do nagomilavanja uremijskih toksina kao i disbalansa brojnih hormona i elektrolita, usled čega nastaje uremijski sindrom i dolazi do gubitka funkcije svih sistema organa. Pretpostavlja se da u patogenezi uremijskih komplikacija važnu ulogu imaju akumulacija metabolita endogenog i egzogenog porekla, poremećaj metabolizma lipida, promenjen humoralni i ćelijski imunitet, poremećaj acido-bazne homeostaze i disbalans hormona. Potvrđeno je da se već u ranim stadijumima hroničnog oštećenja bubrega akumuliraju slobodni radikali koji mogu oksidativno modifikovati i oštetiti molekule proteina, lipida i DNK (2). Postoje brojni dokazi o poremećenoj dinamičkoj ravnoteži između antioksidanasa i prooksidanasa na stranu prooksidanasa kao mogućem faktoru nastanka i razvoja komplikacija u hroničnoj slabosti bubrega (3).

Jedinstvena definicija i internacionalna klasifikacija HBB potekla od američke Nacionalne fondacije za bubrege usvojena je 2002. godine i prikazana je u Tabeli 1. (4).

Tabela 1. Klasifikacija hroničnih bolesti bubrega

Stadijum	Opis	GFR ml/min/1,73m ²	Prevalenca %
1	Oštećenje bubrega sa normalnom ili povišenom GFR	>90	3,3
2	Oštećenje bubrega sa blagim smanjenjem GFR	60 – 89	3,0
3	Oštećenje bubrega sa umerenim smanjenjem GFR	30 – 59	4,3
4	Oštećenje bubrega sa teškim smanjenjem GFR	15 – 29	0,2
5	Bubrežna insuficijencija	<15 ili dijaliza	0,2

Danas oko 11% svetske populacije ima neki stepen bubrežne insuficijencije, što predstavlja broj od oko 600 miliona ljudi širom sveta. Incidencija terminalne bubrežne slabosti je eksponencijalno rasla u poslednje dve decenije, pa se danas u svetu preko dva miliona, u Evropi oko 642 000, a u našoj zemlji oko 5208 bolesnika leči nekom od metoda za zamenu funkcije bubrega (5,6). U Srbiji se incidencija terminalne bubrežne bolesti u poslednjih petnaest godina povećala od 107 na 189 bolesnika na milion stanovnika i veća je od prosečne incidencije u zemljama zapadne Evrope (7,6).

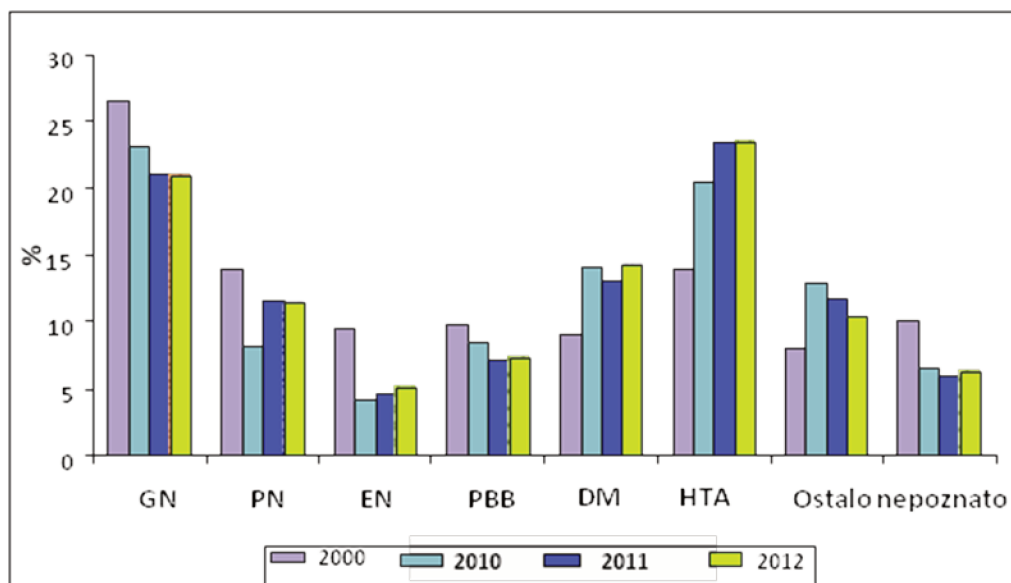
Na nastanak i razvoj hronične bubrežne slabosti utiču faktori koji povećavaju osetljivost bubrega na oštećenje kao što su starost, pozitivna porodična anamneza, pripadnost nekim etničkim grupama, siromaštvo, mala porođajna težina, smanjena masa bubrega. Oboljenja koja neposredno pokreću bolest su najčešće dijabetes, hipertenzija, autoimune bolesti, sistemske bolesti, nefrolitijaza, infekcija i opstrukcija mokraćnih puteva, neoplazme, kardiovaskularna oboljenja, nefrotoksični lekovi i hemikalije. Veoma su važni i faktori koji ubrzavaju napredovanje hronične bubrežne slabosti, obilna proteinurija, neregulisana hipertenzija, neregulisana glikemija, pušenje, gojaznost.

Ispitivanja koja su obuhvatila navedene faktore su pokazala da je 70% bolesnika sa hroničnim oštećenjem bubrega prethodno bolovalo od dijabetesa ili hipertenzije (8). Studija ranog otkrivanja bubrežnih bolesti (ROBB studija) koja je rađena u Srbiji, dala je podatke da su kod 42% bolesnika koji su ispitivani, a boluju od hipertenzije više od 5

godina, otkriveni pokazatelji oštećenja bubrežne funkcije kao i kod 27% bolesnika starijih od 60 godina (6).

Procenjuje se da danas u svetu od hipertenzije boluje oko milijardu ljudi, a dobro je poznata dvosmerna veza između hipertenzije i hronične bolesti bubrega, pa bubreg može da bude i “krivac” i “žrtva” hipertenzije (9).

Devedesetih godina prošlog veka u SAD, a potom i u zapadnoj Evropi, zabeležen je brz porast broja bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne slabosti čija je osnovna bolest bila hipertenzivna nefropatija, koja je postala drugi po učestalosti uzrok terminalne slabosti bubrega (Slika 1) (10,7,6).

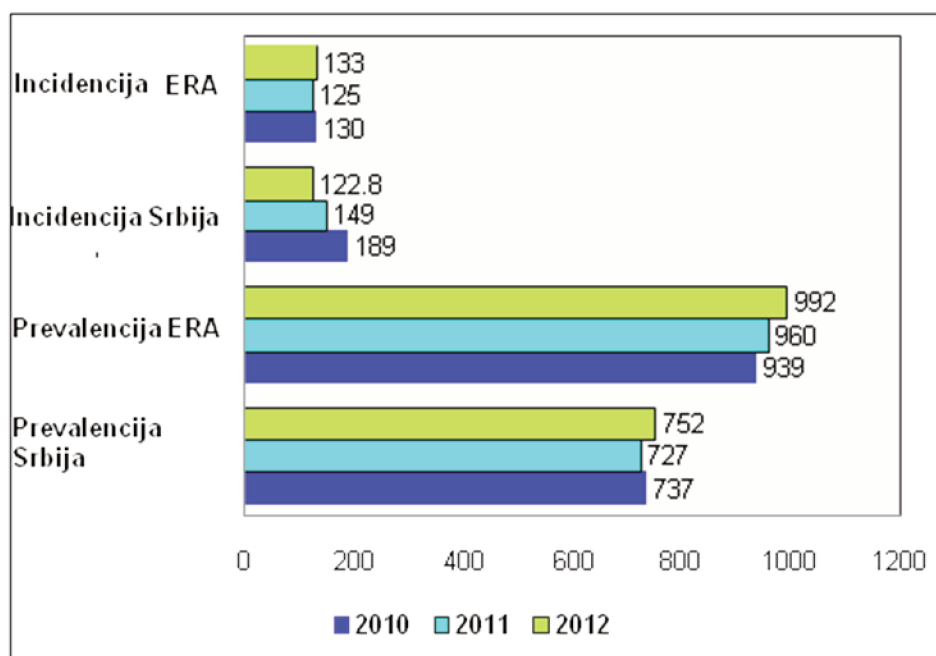


GN–glomerulonefritis (*Glomerulonephritis*);
PN–pijelonefritis (*Pyelonephritis*);
EN–endemska nefropatija (*Balkan nephropathy*);
PBB–policistična bolest bubrega (*Polycystic kidney disease*);
DM–dijabetes melitus (*Diabetes mellitus*);
HTA–hipertenzija (*Hypertension*)

Slika 1. Učestalost uzroka terminalne slabosti bubrega kod bolesnika lečenih metodama za zamenu funkcije bubrega 2000. i u periodu 2010-2012. godine

U Srbiji se poslednjih deset godina beleži porast incidencije i prevalencije hipertenzivne nefropatije kada je ona postala najčešći uzrok terminalne slabosti bubrega. U 2009. godini prevalencija hipertenzivne nefropatije u populaciji svih lečenih bila je 137,7 bolesnika na million stanovnika, a na kraju 2012. godine 176 bolesnika na million stanovnika (6). Poslednjih godina u našoj zemlji je zabeleženo smanjenje incidencije ali postoji dilema da li je to zbog stvarnog smanjenja broja novih bolesnika ili je to zbog promene metoda skupljanja podataka (6).

Prevalencija bolesnika lečenih metodama za zamenu funkcije bubrega u našoj zemlji se neprekidno povećavala od 1997. godine, kada je bila 435 bolesnika na milion stanovnika, do 2012. godine, kada je iznosila 752 bolesnika na milion stanovnika, ali još uvek nije dostigla prevalenciju u zapadnevropskim razvijenim zemljama (Slika 2) (6).



Slika 2. Poređenje incidencije i prevalencije bolesnika (na milion stanovnika) lečenih metodama za zamenu funkcije bubrega u zemljama registrovanim u delu A registra ERA-EDTA (ERA) i Srbiji (S) u periodu od 2010. do 2012. godine

Iz američkog registra saznajemo da je 2011. godine najveća prevalenca zabeležena u Japanu (2309 bolesnika na milion stanovnika), a najmanja na Filipinima (179 bolesnika na milion stanovnika) (10).

Pacijenti sa hroničnom bubrežnom slabošću su u znatno većem riziku da obole od kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze i kancera u odnosu na osobe iste starosti i pola iz opšte populacije (1). Zbog neprekidnog porasta broja bolesnika koji se leče nekom od metoda za zamenu rada bubrega i visokog pratećeg kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta, hronične bolesti bubrega predstavljaju zdravstveni problem širom sveta (5).

Smrtnost bolesnika na hemodijalizi je izuzetno visoka, 10-20 puta veća nego u ostaloj populaciji iste starosti. Mortalitet bolesnika lečenih metodama za zamenu funkcije bubrega izražen je kao procenat umrlih tokom jedne godine od ukupnog broja bolesnika lečenih dijalizom u toku te godine, i on se kreće od 7% u Japanu do 15% u Evropi, odnosno 25% u SAD, a u našoj zemlji je oko 17,4%. Glavni uzrok mortaliteta i dalje ostaju kardiovaskularne bolesti od kojih umire oko 50% bolesnika lečenih hemodijalizom (11), a ubrzana ateroskleroza, hronične inflamacije, neuhranjenost doprinose da je smrtnost jednaka smrtnosti bolesnika sa karcinomom koji je metastazirao (12).

1.2. POREMEĆAJ REDOKS RAVNOTEŽE

Oksidativni stres se obično definiše kao poremećaj ravnoteže u kome slobodni radikali imaju prevagu nad antioksidansima (13). Slobodni radikali su molekuli ili delovi molekula koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj atomskoj ili molekulskoj orbitali i stvaraju se u toku normalne metaboličke aktivnosti ćelija (14). Nespareni elektroni čine slobodne radikale reaktivnim i u uslovima nekontrolisanog stvaranja njihova količina može da prevaziđe antioksidantni kapacitet ćelije i vanćelijske tečnosti. Tada slobodni radikali ispoljavaju veliku reaktivnost i u interakciji sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama dovede do oštećenja ovih molekula i inhibicije njihove funkcije. Okidači oksidacionog stresa mogu biti nasledni ili indukovani genetički defekti, faktori životne sredine, kao i metaboličke fluktuacije (15).

Danas se umesto termina slobodni radikali sve više koristi pojam reaktivne vrste jer su na taj način obuhvaćene sve klase jedinjenja elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti. U zavisnosti od aktivnog centra to su reaktivne vrste sa kiseonikom (ROS), azotom (RNS), ugljenikom (RCS) i sumporom (RSS)(Tabela 2).

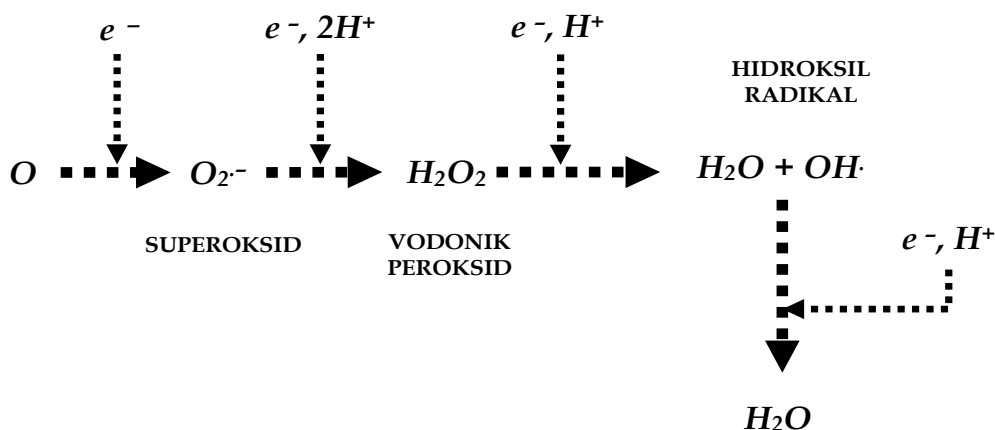
Tabela 2. Jedinjenja visoke reaktivnosti

REAKTIVNE VRSTE		
<i>Aktivni centar</i>	<i>Radikalske vrste</i>	<i>Neradikalske vrste</i>
Kiseonik (ROS)	superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) hidroksil radikal ($HO^{\cdot}$) peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$) alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$) hidroperoksil radikal ($HOO^{\cdot}$)	vodonik peroksid H_2O_2 hipohlorna kiselina $HOCl$ ozon O_3 singlet kiseonik $1O_2$
Azot (RNS)	nitroksil radikal ($NO^{\cdot}$) azot dioksid radikal ($NO_2^{\cdot}$)	azodioksid anjon, azot trioksid, nitronijum jon, peroksinirit anjon, $ONOO^-$ alkil peroksinitrit, nitroksil anjon, nitrozil katjon nitril hlorid.
Ugljenik (RCS)	alkil radikal ($R^{\cdot}$) alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$) peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$)	
Sumpor (RSS)	tiil radikal ($RS^{\cdot}$) glutatiil radikal ($GS^{\cdot}$) diglutiil anjon radikal ($GSSG^{\cdot-}$)	

1.2.1. Kiseonični slobodni radikali

Radikali poreklom od kiseonika predstavljaju najvažniju klasu reaktivnih vrsta koja se stvara u živim sistemima (16). Kiseonični slobodni radikali (KSR), su međuproizvodi parcijalne redukcije molekulskog kiseonika u ćeliji. Od ukupno unetog molekularnog kiseonika (O_2), 90% dospeva u mitohondrije, gde se tokom ćelijskog

disanja, odvija četvoroelektronska redukcija O_2 do H_2O , a oslobođena energija se koristi za sintezu adenozin trifosfata (ATP) u kom je vezana hemijska energija neophodna za odvijanje svih životnih funkcija (17). Više od 95% O_2 unetog u ćeliju prolazi kroz kompletnu redukciju do H_2O , dok se usled parcijalne redukcije oko 1-5% O_2 transformiše u reaktivne vrste kiseonika (18). Postupna redukcija O_2 do H_2O prikazana je na Slici 3.

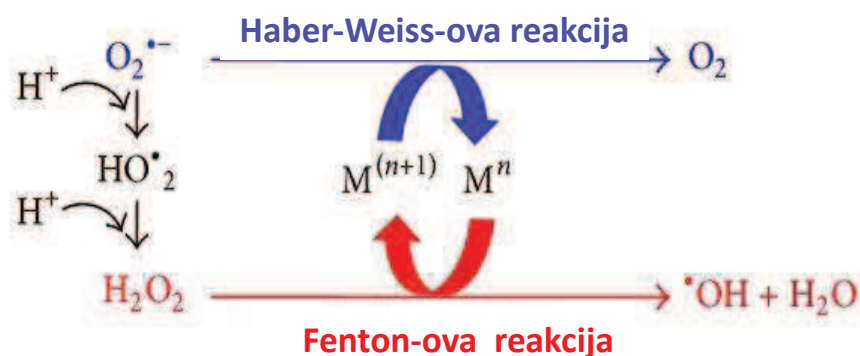


Slika 3. Stvaranje kiseoničnih slobodnih radikala

Enzimskim ili neenzimskim dodavanjem jednog (prvog) elektrona molekulskom kiseoniku stvara se reaktivni slobodni kiseonični radikal, superoksid anjon, $O_2^{\cdot -}$ (16). Superoksid anjon radikal lako prolazi membranu mitohondrija i dospevši u citosol ima ulogu u brojnim patofiziološkim procesima (19). $O_2^{\cdot -}$ kao primarni ROS je umereno reaktivan, ali može da reaguje sa drugim molekulima i generiše sekundarne reaktivne vrste koje su reaktivnije, kao na primer u reakciji sa azot oksidom ($NO^{\cdot}$) kada nastaje izrazito reaktivni peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) (20).

U fiziološkim uslovima $O_2^{\cdot -}$ ne izaziva toksične efekte jer ga enzim superoksid dismutaza (SOD) transformiše u manje aktivan vodonik peroksid koji lako difunduje kroz membrane. Katalaza razlaže vodonik peroksid do vode i kiseonika i na taj način smanjuje njegovu toksičnost. Međutim, iako ne predstavlja pravi slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona, vodonik peroksid ostvaruje brojne toksične efekte. Umesto neutralizacije do vode, H_2O_2 može biti preveden u prisustvu enzima mijeloperoksidaze

do hipohlorne kiseline (HOCl), koja je 100-1000 puta toksičnija od $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 (20), ili u reakcijama sa jonima metala (Fe^{2+} ili Cu^+) u Fentonovoj reakciji dovodi do stvaranja izuzetno reaktivnog hidroksil radikala (21). Čelija proizvodi oko 50 hidroksilnih radikala svake sekunde, njihov poluživot je veoma kratak (10^{-9} s), ali su izuzetno reaktivni i toksični, tako da blizu mesta formiranja reaguju i dovode do oštećenja molekula DNK, proteina, i lipida (22), i do nastanka neurodegenerativnih (23) i kardiovaskularnih bolesti (24). Ovaj najreaktivniji radikal kiseonika može nastati i pri interakciji $O_2^{\cdot-}$ i HOCl, Fe^{2+} i HOCl, kao i reakcije između H_2O_2 i $NO^{\cdot}$ (20). $OH^{\cdot}$ se formira i kad postoji povećana produkcija $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 u *Haber-Weiss-ovoj* reakciji uz prisustvo prelaznog metala (21). Redukovani oblik prelaznih metala ($M^{(n)}$) se oksiduje u Fentonovoj reakciji sa vodonik peroksidom pri čemu nastaje hidroksil radikal. U *Haber-Weiss-ovoj* reakciji superoksid radikal ($O_2^{\cdot-}$) reaguje sa oksidovanim oblikom prelaznih metala ($M^{(n+1)}$) i prevodi ga u redukovani oblik $M^{(n)}$, koji opet ulazi u redoks ciklus, Slika 4 (25):



Slika 4. Fenton-ova i Haber- Weiss-ova reakcija

Produkcija hidroksilnog radikala, po tipu Fentonove reakcije u uslovima *in vivo* je moguća kada su prisutni joni gvožđa, bakra, hroma i kobalta, ali u fiziološkim stanjima slobodni katalitički joni su skoro nedostupni, jer ih vrlo efikasno uklanjaju metal-vezujući proteini (26). Međutim, postoje stanja „prepunjenosti gvožđem” u organizmu (npr. hemohromatoza) kada su dostupne veće količine „slobodnog gvožđa”, što može imati štetne efekte za ćelijske strukture.

Nespareni elektroni u spoljašnjoj orbitali odgovorni su za reaktivnost svih radikalskih vrsta kiseonika (14). Međusobnom reakcijom dva radikala spajaju se elektroni suprotnih spinova i formira kovalentna veza. Međutim u reakciji sa molekulima *in vivo* koji su uglavnom neradikali, radikali započinju lančanu reakciju stvaranjem novih sekundarnih radikala tj. »radikali rađaju radikale«. Tako da se toksičnost radikala ne ogleda samo u njihovoj sopstvenoj reaktivnosti, već i u njihovoj sposobnosti da izazovu lančanu reakciju stvaranja sekundarnih radikala (27).

1.2.2. Mehanizmi antioksidantne zaštite

Procena je da se dnevno po ćeliji stvori između između 1 i 3 milijarde reaktivnih vrsta, a kako su sve ćelijske strukture potencijalna meta za oksidativna oštećenja, u toku evolucije u ćeliji su se razvili različiti mehanizmi zaštite (28). Prema načinu delovanja oni mogu biti preventivni, reparativni, mehanizmi fizičke odbrane i mehanizmi antioksidativne zaštite (17).

Sistem zaštite od oksidativnih oštećenja (eng. *antioxidant defence system*, AOS) sastoji se iz primarne i sekundarne antioksidativne zaštite. Primarna antioksidativna zaštita uključuje enzimski i neenzimski antioksidantni sistem (Tabela 3).

Sekundarna antioksidativna zaštita uključuje protein specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaza, protein-ADP-ribozil-transferaza, ATP i Ca^{2+} nezavisna proteaza) koje učestvuju u popravci oksidativnih oštećenja biomolekula (29).

Tabela 3. Sistem primarne antioksidantne zaštite

Glavni enzimi	Superoksid dizmutaze Glutation peroksidaze Katalaza
Pomoćni enzimi	Glutation reduktaza NADPH–hinon oksidoreduktaza Hidroksilaza epoksida Enzimi konjugacije (UDP - glukuronil transferaza; glutathion transferaze; sulfonil transferaza) Donori NADPH (dehidrogenaza glukozo 6-fosfata; dehidrogenaza 6-fosfo-glukonata; dehidrogenaza izocitrata; transhidrogenaze) Transportni sistem (za GSSG; za konjugate ksenobiotika)
Ne-enzimski sistem	α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbinska kiselina (vitamin C), Glutation (GSH), Mokraćna kiselina, Albumin, Ceruloplazmin, Transferin, Haptoglobin

1.2.2.1. Enzimске компоненте система антиоксидантне заштите

Prvu liniju odbrane od kiseoničnih slobodnih radikala čini kaskada antioksidantnih enzima, superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutathion-peroksidaza (GSH-Px) (2), dok se glutathion transferaze (GST) svrstavaju u enzime faze II biotransformacije (30).

Superoksid dizmutaza prevodi superoksid anjon u vodonik peroksid, koji se katalitičkom aktivnošću glutathion peroksidaze ili katalaze redukuje u vodu. Međutim, vodonik peroksid može biti preveden i u toksični hidroksil radikal, pa je neophodno da postoji sinhronizacija u aktivnosti superoksid dizmutaze sa jedne strane i glutathion peroksidaze ili katalaze sa druge strane. Svaki poremećaj ravnoteže između ovih antioksidantnih enzima je opasan, jer ako prevlada aktivnost superoksid dizmutaze doći

će do nagomilavanja vodonik peroksida, a ako je veća aktivnost glutathion peroksidaze i/ili katalaze dolazi do nagomilavanja superoksid anjona.

U procesu detoksikacije kiseoničnih slobodnih radikala značajnu ulogu ima i pomoćni enzimski sistemi. Glutathion reduktaza je jedan od pomoćnih enzima i ima ključnu ulogu u procesu regeneracije redukovano glutathiona koji je neophodan za funkcionisanje glutathion peroksidaze. U pomoćne enzime spadaju i enzimi koji katališu reakcije stvaranja NADPH (dehidrogenaza glukozo 6-fosfata, dehidrogenaza 6-fosfoglukonata, dehidrogenaza izocitrata, transhidrogenaze), koji je neophodan za aktivnost glutathion reduktaze.

1.2.2.2. Ne-enzimske komponente sistema antioksidantne zaštite

Ne-enzimski antioksidantni sistem se sastoji od liposolubilnih i hidrosolubilnih komponenti. Kako se početna oštećenja ćelije dešavaju na ćelijskoj membrani, neophodno je prisustvo liposolubilnih antioksidanasa i ko-antioksidanasa u samoj ćelijskoj membrani. Alfa-tokoferol (vitamin E) je najvažniji membranski antioksidans i glavni liposolubilni antioksidans koji štiti lipoproteine male gustine (31). Međutim za efikasnu zaštitu višestruko nezasićenih masnih kiselina od kiseoničnih slobodnih radikala, pored alfa-tokoferola neophodno je prisustvo redukujućeg agensa tj. ko-antioksidansa (npr. ubihinona-10), jer jedino u njegovom prisustvu, alfa-tokoferol prekida lančanu reakciju lipidne peroksidacije (31). Drugi važan liposolubilni antioksidans je β -karoten koji ima sposobnost da svoju antioksidantnu aktivnost postiže i pri niskom pritisku kiseonika. On vezuje singlet kiseonik, sprečava lančane reakcije radikala i inhibiše lipooksigenaznu aktivnost (32).

Od hidrosolubilnih antioksidanasa najznačajnija je askorbinska kiselina, koja upravo zbog svoje hidrosolubilne prirode, prekida lančane reakcije slobodnih radikala ne samo u ćeliji, već i u vanćelijskim tečnostima (33).

Glutathion (GSH) je najznačajnije neproteinsko tiol jedinjenje sa brojnim ulogama u metabolizmu ćelije (34). Osim što je i sam značajan antioksidans, glutathion je i kofaktor

seleno-enzima glutation peroksidaze i glutation transferaze koje učestvuju u procesima konjugacije i detoksikacije ksenobiotika.

Deo ne-enzimskog antioksidantnog odbrambenog sistema su i molekuli koji vezuju slobodne jone prelaznih metala i tako ih onemogućavaju da reaguju sa vodonik peroksidom i stvaraju hidroksil radikal, niti da prevode lipidne peroksidge i peroksid i alkoksil radikale (14). *In vivo*, postoji nekoliko proteina: (a) transferin je glikoprotein koji vezuje i transportuje trovalentno gvožđe u ćeliju, tako da u krvnoj plazmi normalno ne postoje slobodni joni gvožđa, (b) ceruloplazmin, protein krvne plazme koji vezuje bakar, a osim toga svojom feroooksidaznom aktivnošću prevodi Fe^{2+} u Fe^{3+} i time omogućava vezivanje gvožđa za feritin (35). Albumin krvne plazme, osim vezivanja jona bakra i gvožđa, svojom peroksidaznom aktivnošću razlaže vodonik peroksid i sprečava lipidnu peroksidaciju *in vitro* (36). U ne-enzimski antioksidantni sistem krvne plazme spadaju i mokraćna kiselina kao hvatač singlet kiseonika, peroksid radikala i hidroksil radikala (28), kao i bilirubin koji najverovatnije zajedno sa alfa-tokoferolom inhibira proces lipidne peroksidacije u krvnoj plazmi i izolovanim lipoproteinima male gustine (LDL) (37).

1.2.3. Određivanje pokazatelja oksidativnog stresa

Intenzitet oksidativnog stresa se može odrediti direktno određivanjem slobodnih radikala, indirektno merenjem produkata koji su nastali u interakciji slobodnih radikala sa ciljnim molekulima i određivanjem antioksidativnog kapaciteta ćelija.

1.2.3.1. Određivanje produkcije slobodnih radikala direktnim metodama

Direktno određivanje slobodnih radikala u biološkom materijalu je otežano zbog njihove visoke reaktivnosti i kratkog poluživota. U uslovima *in vitro* za merenje slobodnih kiseoničnih radikala primenjuju se metode rezonance elektronskog spina (ESR) ili pulsna radioliza. Međutim za određivanje u uslovima *in vivo* slobodni kiseonični radikali se prvo moraju vezati sa specifičnim jedinjenjima (»*spin traps*«), a zatim se određuju merenjem energije apsorpcije metodom elektronske rezonance spina u

uslovima *ex vivo*. Hidroksilni radikal se može zarobiti *in vivo* sa nekim aromatičnim jedinjenjima kao što je na primer salicilna kiselina, a zatim detektovati *ex vivo* (38).

1.2.3.2. Određivanje aktivnosti slobodnih radikala indirektnim metodama

U kliničkoj praksi je mnogo primenljivije indirektno određivanje aktivnosti slobodnih radikala, pri čemu se mere hemijske promene koje slobodni radikali prouzrokuju u interakciji sa ciljnim molekulima kao što su proteini, lipidi i DNK (Tabela 4) (21).

Tabela 4. Pokazatelji oksidativnog stresa

TIP MAKROMOLEKULA	POKAZATELJI OKSIDATIVNOG STRESA
Proteini	Proteinske tiol grupe (P- SH) Reaktivni karbonilni derivati (RCD) Nitrotirozin produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP)
Lipidi	malondialdehid (MDA) MDA protein adukt 4-hidroksi- 2nonenal (4-HNE) Izoprostani
DNK	8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) 5-OH metiluracil u urinu

Ciljni molekuli oksidativane modifikacije mogu biti proteini sa receptorskim, antigenim, transportnim ili enzimskim funkcijama, bilo da je izazvana direktnim dejstvom slobodnih radikala ili dejstvom dejstvom produkata nastalih pri oksidaciji neke druge vrste molekula. (39). Tako na primer, jedan od produkata procesa lipidne peroksidacije malondialdehid (MDA) može reagovati sa slobodnim amino grupama

proteina i nukleinskih kiselina i dovesti do strukturnih i funkcionalnih promena proteina i enzima i novog oštećenja ćelija (40).

Rezultat oksidativnog oštećenja proteina može biti formiranje protein-protein unakrsnih veza, fragmentacija proteina ili blokiranje proteolize i akumulacija oksidovanih proteinskih produkata (41). Reakcije oksidativnog oštećenja proteina se dešavaju na nivou aminokiselina, a posebno osetljive na oksidaciju su metionin i cistein (17). U reakcijama modifikacije proteina učestvuju amino- (N-terminalna i ϵ -amino grupa bočnog ostatka Lys), guanidino- (bočnog ostatka Arg) i tiol- (bočnog ostatka Cys) grupe, pri čemu je tiol grupa (SH) proteina pri fiziološkom pH jači nukleofil od amino- i guanidino-grupe (42). Oksidativno oštećenje proteina dovodi do nastanka novih funkcionalnih grupa, kao što su hidroksilna i karbonilna grupa (40). Mada pojava karbonilnih grupa nije apsolutno specifična za oksidativnu modifikaciju proteina one se najčešće koriste kao markeri oksidativnog oštećenja proteina (43). Metode koje se koriste za merenje njihove koncentracije su spektrofotometrijski testovi, od kojih je većina ograničene osetljivosti, ELISA testovi (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), imunohistohemijske metode, Western blot imunoeseji (44). Za procenu stepena oksidativnog oštećenja proteina koriste se još i metode za određivanje koncentracije slobodnih SH-grupa, nitrotirozina kao i produkata uznapredovale oksidacije proteina (engl. *Advanced oxidation protein products-AOPP*). U uslovima povećanog stvaranja NO dolazi do nitrovanja slobodnog tirozina i tirozinskih ostatka proteina i nastaje 3-nitrotirozina koji u molekulu proteina remeti njegovu funkciju. Povećana proizvodnja NO se javlja kod inflamatornih, infektivnih i degenerativnih procesa, što dovodi do povećanja količine nitrozilovanog tirozina koji se najčešće određuje spektrofotometrijski (45).

Posledica dejstva slobodnih radikala na polinezasićene masne kiseline, koje su izuzetno osetljive na oksidaciju, je pokretanje procesa lipidne peroksidacije i stvaranje hidroperoksida, endoperoksida, dugoživećih aldehida i krajnjih proizvoda njihove degradacije, malondialdehida (MDA) i 4-hidroksi-2nonenal (4-HNE) (17). Produkti lipidne peroksidacije imaju dug polужivot, veoma su reaktivni i utiču na druge biomolekule, proteine i nukleinske kiseline. Pored važnih bioloških funkcija koje ispoljavaju u intracelularnom prenošenju signala i regulaciji genske ekspresije (46), izraženo je njihovo proaterogeno, proinflamatorno i mutageno dejstvo (47,48).

Malondialdehid kao krajnji produkt oksidativnih oštećenja lipida može da reaguje sa amino grupama proteina i nukleinskih kiselina izazivajući još veće oštećenje ćelije (25). Određivanje koncentracije MDA i MDA-protein adukta u krvi i tkivima se koristi za procenu intenziteta lipidne peroksidacije, a najčešće se primenjuje metoda sa tiobarbiturnom kiselinom (*eng. thiobarbituric acid reacting substances*, TBARs) (49). Iako postoje ograničenja kao što je nespecifičnost testova sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), rezultati mogu biti veoma korisni ukoliko se tumače zajedno sa drugim pokazateljima oksidativnog stresa. Istraživanja su pokazala da je nivo MDA povišen kod bolesnika sa aterosklerozom, dijabetesom, oboljenjima jetre, Alchajmerovom bolešću, kao i kod malignih oboljenja (50,51). U poslednje vreme, kao najpouzdaniji marker procesa lipidne peroksidacije *in vivo* smatra se određivanje urinarne ekskrecije izoprostana (iPF₂α-III), koji predstavlja stabilan proizvod oksidacije arahidonske kiseline (52,53).

Dejstvo slobodnih radikala na DNK dovodi do oštećenja strukture u vidu prekida jednog ili oba lanca, oštećenja na proteinskim vezama, oštećenja na šećernom ili fosfatnom delu polinukleotidnog lanca i modifikacije baze, a efekti se ispoljavaju trenutno ili odloženo. Najčešći indikator oksidativnog oštećenja DNK je 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) koji nastaje adicijom OH[•] na guanine, a određuje se iz urina i u krvi (39). Trajno oksidativno oštećenje DNK je uvod u matagenezu, karcinogenezu i starenje (21).

1.2.3.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ćelija

Postojanje i stepen oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima može se *in vivo* pratiti i na osnovu promene antioksidativnog kapaciteta ćelija koji se sastoji od enzimskog i ne-enzimskog sistema. Razvijeno je više metoda koje se koriste za merenje ukupne antioksidativne aktivnosti plazme/seruma, a može se vršiti i precizno određivanje pojedinačnih antioksidanasa. Dva verovatno najvažnija antioksidativna markera su redukovani GSH i vitamin C koji su sposobni da regenerišu druge antioksidanse do njihovog aktivnog stanja. Zbog toga se i promene drugih lipofilnih antioksidanasa, kao što su vitamin E i koenzim Q, takođe mogu izraziti merenjem GSH i

vitamina C (54). Za procenu ćelijske redoks ravnoteže koristi se odnos redukovano i oksidovanog glutationa (GSH/GSSG) koji u različitim modelima oksidativnog stresa iznosi svega 1-10 dok u fiziološkim uslovima prelazi 100 (55). Smanjenje količine vitamina E, jednog od ne-enzimskih antioksidanasa, može se smatrati specifičnim indeksom lipidne peroksidacije *in vivo* (1). Takođe, dejstvom kiseoničnih slobodnih radikala na mokraćnu kiselinu nastaju proizvodi koji su potencijalni markeri oksidativnog oštećenja (57).

Praćenje nivoa oksidativnog stresa kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću može se vršiti određivanjem koncentracije malondialdehida i MDA proteinskih adukta, proteinskih karbonilnih i tiol grupa, AOPP, TOS, kao i određivanjem antioksidantnog kapaciteta merenjem neenzimskih i enzimskih antioksidanasa (58).

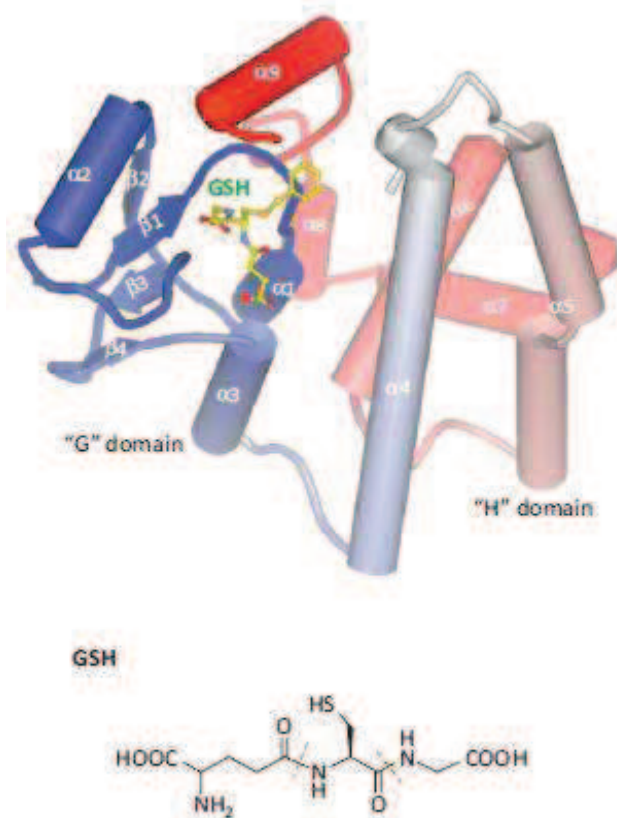
1.3. GLUTATION TRANSFERAZE

Glutation transferaze (GST, EC 2.5.1.18) predstavljaju multigensku superfamiliju enzima koji u ćelijama ljudskog organizma učestvuju u procesima detoksikacije velikog broja različitih jedinjenja i pripadaju enzimima faze II biotransformacije (30). Još 1969. godine je u jetri pacova identifikovan protein, nazvan „ligandin“ za koji je utvrđeno da vezuje elektrofilne kancerogene materije, a 1973. je izolovana frakcija proteina od 50kDa koja posreduje u konjugaciji glutationa sa nizom elektrofilnih jedinjenja i koja je nazvana glutacion transferaza. Struktura pojedinih glutacion transferaza je opisana ranih devedesestih (59). Geni za GST su klonirani sredinom osamdesestih i uvidelo se da su GST kod sisara produkti genske superfamilije.

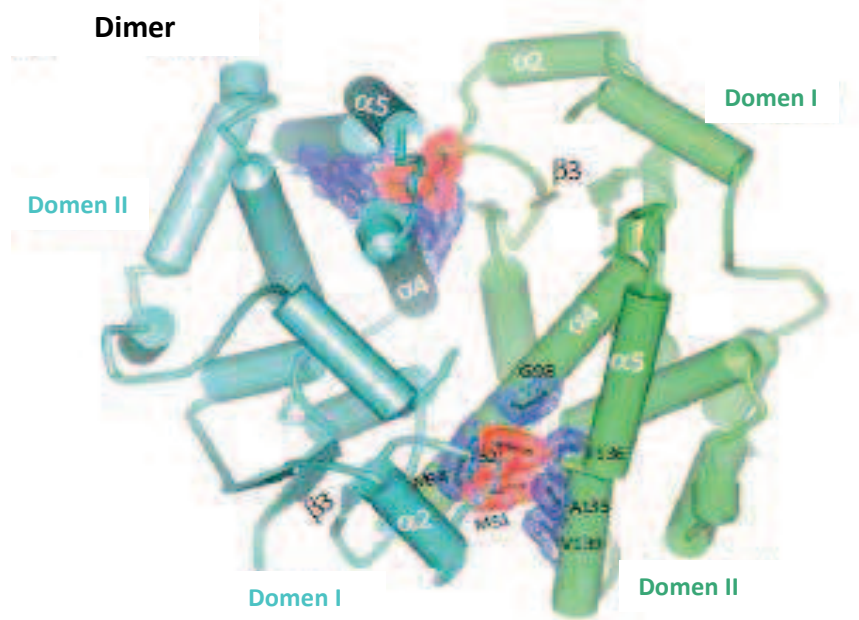
1.3.1. Struktura i funkcija glutacion transferaza

Enzimi GST familije mogu biti homodimeri ili heterodimeri, a molekulska masa svake subjedinice iznosi oko 23-28 kDa. U aktivnom centru svake subjedinice enzima GST nalaze se dva funkcionalna regiona, hidrofilni G-region koji vezuje GSH i hidrofobni H-region koji vezuje različite elektrofilne supstrate i razlikuje se kod različitih izoformi u zavisnosti od supstrata koje vezuje (Slika 5)(60).

a)



b)

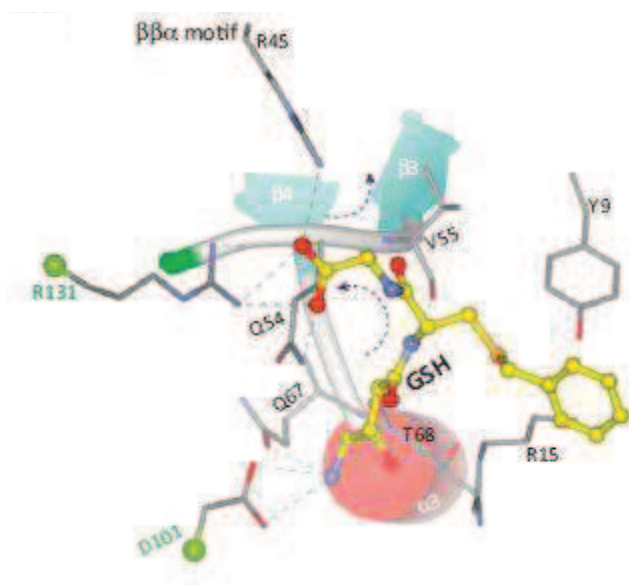
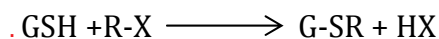


Slika 5. Trodimenzionalna struktura enzima GST

- a) Struktura glutation vezujućeg mesta (G) i vezujućeg mesta za hidrofobni supstrat (H)
- b) Interakcija između subjedinica GST

U najvećem broju slučajeva u aktivnom mestu funkcionalna grupa je ostatak serina ili tirozina. Subjedinice GST imaju nezavisnu katalitičku aktivnost koja se ispoljava samo u formi dimera (30).

Glutation transferaze pripadaju enzimima faze II biotransformacije, i najznačajnija reakcija koju katališu je konjugacija glutationa (GSH) sa različitim elektrofilnim supstratima (R-X) endogenog i egzogenog porekla, pri čemu se smanjuje njihova reaktivnost prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima (Slika 6) (60).



Slika 6. Interakcija molekula GST sa glutationom (GSH)

Nakon vezivanja GSH i elektrofilnog supstrata u aktivnom centru proteina, aktivira se sulfhidrilna grupa GSH, što omogućava nukleofilni "napad" na atom ugljenika, azota ili sumpora elektrofilnog jedinjenja. Formacija tioetarske veze između GSH i

elektrofila, odnosno nastanak GS-konjugata rezultuje u manjoj reaktivnosti i većoj rastvorljivosti supstrata u vodi, tako da je ova reakcija uglavnom detoksifikacione prirode (61). Procese detoksikacije u određenom tkivu i štetne efekte elektrofilnih jedinjenja u velikoj meri određuje odgovarajući izoenzimski profil, odnosno broj i količina raspoloživih izoenzima GST (62).

Konjugacione reakcije sa GSH su ključne i za metabolizam endogenih reaktivnih međuprodukata, koji nastaju lipidnom peroksidacijom ili oksidacionom degradacijom DNK. Nastali GSH konjugati se acetiluju do odgovarajuće merkapturne kiseline, koja se zatim oslobađa u cirkulaciju, žuč ili urin ili podleže daljem metabolizmu (63). GST enzimi imaju važnu ulogu i u anaboličkim procesima, pri sintezi specifičnih medijatora, kao što su prostaglandini i leukotrieni (30).

GST ispoljava i nekatalitički dejstvo, pri čemu kovalentno vezivanje sa karcinogenim metabolitima deaktivira enzim, ali onemogućava reakciju genotoksičnog elektrofila sa molekulom DNK. Nevalentno vezivanje neutralnih i anjonskih lipofilnih jedinjenja (steroidi, hormoni, masne kiseline, žučne kiseline, hem) omogućava izolaciju, transport i olakšanu eliminaciju ovih struktura iz ćelije i organizma (64).

1.3.2. Nomenklatura glutatition transferaza

Superamiliju glutatition transferaza čine većinom solubilni proteini a u manjoj meri su zastupljene forme koje su vezane za različite membrane u ćeliji, tako da se humana GST sastoji od tri familije: citosolne, mitohondrijalne i mikrozomalne GST (MAPEG)(Tabela 5). (30). Citosolne GST su dodatno na osnovu primarne strukture razvrstane na klase Alfa (pet članova), Mi (pet članova), Pi (jedan član), Teta (dva člana), Zeta (jedan član), Omega (dva člana), Sigma (jedan član) (Tabela 5). Članovi iste klase imaju više od 40% identičnih aminokiselinskih sekvenci, a između klasa proteini imaju manje od 25% identičnih sekvenci (65). Klase GST se obeležavaju slovima grčkog alfabeta (α , μ , π ...) ili velikim slovima latinice (A, M, P...), dok se pripadnici unutar klase obeležavaju arapskim brojevima, a struktura nativnih dimernih proteina dobija naziv na osnovu subjediničnog sastava (npr. GSTA1-2 pripada klasi alfa i sastoji se od subjedinica 1 i 2) (65).

Tabela 5. Klasifikacija humanih glutation transferaza na osnovu klase, identičnosti aminokiselinske sekvence i hromozomske lokalizacija njihovih gena

GST	klasa	Oznaka enzima	Gen	Hromozom
CITOSOLNE	Alfa	GST A1-1, A2-2, A3-3, A4-4, A5-5	<i>GSTA1*</i>	6p12
			<i>GSTA2*</i>	6p12
			<i>GSTA3</i>	6p12
			<i>GSTA4</i>	6p12
			<i>GSTA5</i>	6p12
	Mi	GST M1-1, M2-2, M3-3, M4-4, M5-5	<i>GSTM1*</i>	1p13
			<i>GSTM2</i>	1p13
			<i>GSTM3*</i>	1p13
			<i>GSTM4*</i>	1p13
			<i>GSTM5</i>	1p13
	Pi	GST P1-1	<i>GSTP1*</i>	11q13
	Teta	GST T1-1, T2-2	<i>GSTT1*</i> <i>GSTT2</i>	22q11.2 22q11.2
	Zeta	GST Z1-1	<i>GSTZ1*</i>	14q24.3
	Omega	GST O1-1, O2-2	<i>GSTO1*</i> <i>GSTO2*</i>	10q24.3 10q24.3
	Sigma	PGD2/GST S1-1 ^a	<i>PGD2</i>	4q22.3
MITOHONDRIJALNE	Kappa	GST K1-1		
MIKROSOMALNE MAPEG		MGST1, MGST2, MGST3		

^a Klasa sigma GST je poznata kao glutation-zavisna prostaglandin D₂ sintaza

* prisutan polimorfizam

Citosolne GST su kodirane od strane superfamilije GST gena koji su podeljeni u 7 familija: *alfa* (α), *mi* (μ), *pi* (π), *teta* (θ), *sigma* (σ), *zeta* (ζ) i *omega* (Ω) (30). Manja superfamilija GST gena kodira mikrosomalne proteine, koji se zajedničkim imenom nazivaju membranski proteini u metabolizmu eikosanoida i glutationa, (engl. *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*, MAPEG) (66).

Prisustvo genskog polimorfizma je otkriveno u nekoliko familija GST gena: α (*GSTA1* i *GSTA2*), μ (*GSTM1*, *GSTM3* i *GSTM4*), π (*GSTP1*), θ (*GSTT1*), ζ (*GSTZ1*), Ω (*GSTO1*, *GSTO2*) i *MAPEG* (*MGST1*, *LTC₄S* i *FLAP*) (67,68,69,70) (Tabela 5).

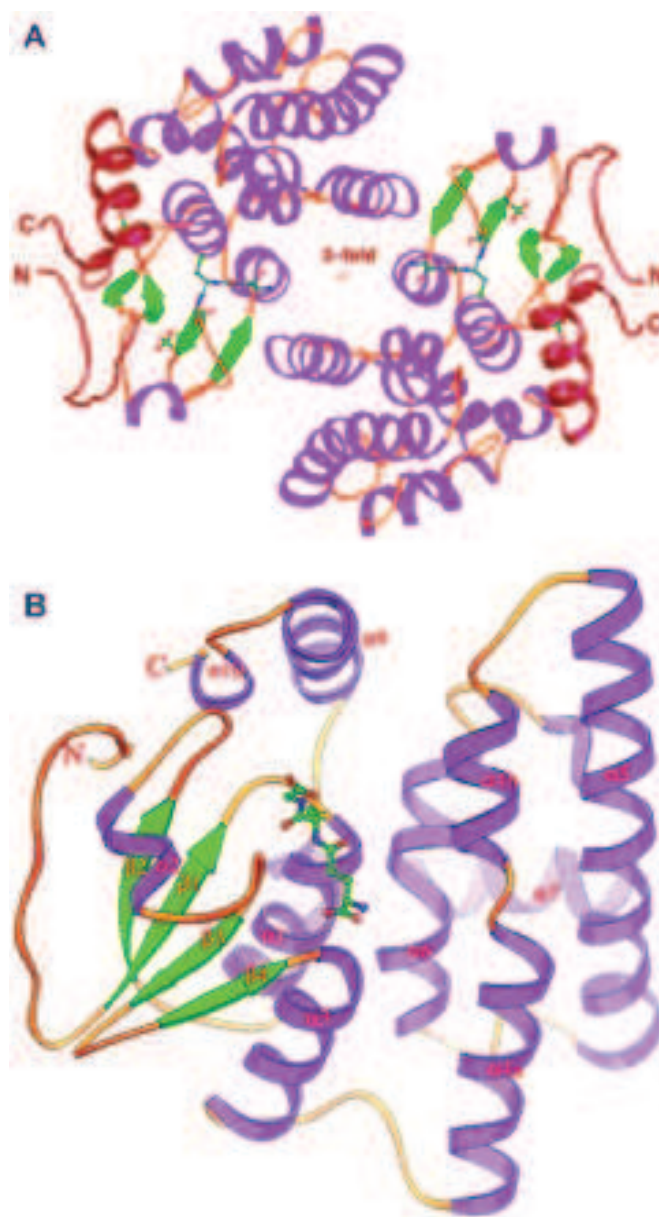
1.4. GLUTATION TRANSFERAZE KLASSE OMEGA

Glutation transferaze klase omega se javljaju u obliku dva izoenzima, GSTO1 i GSTO2, koje kodiraju *GSTO1* i *GSTO2* geni (71). Oba gena se sastoje od šest egzona, veličine 12,5 i 24,5 kb, nalaze se na hromozomu 10q24.3 i međusobno su udaljeni 7,5 kb. Ova poslednje opisana klasa citosolnih glutation transferaza ima samo 20% sekvenci aminokiselina koje se poklapaju sa ostalim članovima GST klase, ali je strukturalnim studijama potvrđeno da i one pripadaju ovoj superfamiliji (Slika 7) (72).

1.4.1. Struktura i uloga GSTO1 i GSTO2

Oba izoenzima glutation transferaza klase omega su dimerni proteini i imaju 68% identičnih aminokiselinskih ostataka, pri čemu se GSTO1 sastoji od 241 aminokiselinskih ostataka, dok GSTO2 ima 243 aminokiseline (71).

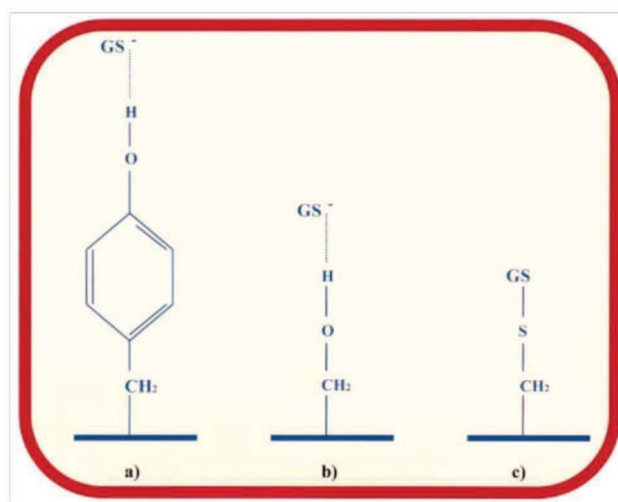
Glutation transferaze klase omega imaju N terminalni tireodoksinu nalik domen i C terminalni domen koji se sastoji od α -heliksa (Slika 7) (71). N-terminalni domen se sastoji iz četiri β -lanca koji se nalaze u sendviču između dva α -heliksa sa unutrašnje strane i jednog α -heliksa sa spoljašnje strane molekula, a vezujući džep za GSH molekul se naziva G mesto. Hidrofobno H mesto se nalazi na drugom domenu, za njega se veže supstrat, elektrofil i zauzima poziciju koja omogućava reakciju sa neutrofilnim glutationom (73).



Slika 7. Struktura GST klase omega
a) struktura dimera GST01
b) struktura monomerne jedinice GST01

Uočeno je da je kod GSTO1 mesto za vezivanje supstrata značajno veće i manje hidrofobno u odnosu na aktivno mesto ostalih glutathion transferaza. Dalje, poređenjem struktura glutaredoksina (arsenat oksidoreduktaza) i GSTO1 i GSTO2, uočena je velika strukturalna sličnost, pa se postavilo pitanje da li i GSTO1 i GSTO2 učestvuju u reakcijama deglutathionilacije. Najnovije istraživanje Borda i saradnika upravo to i pokazuje, ali iako GSTO1 i GSTO2 imaju u 68% istu sekvencu i istu funkcionalnu grupu u aktivnom mestu (ostatak cisteina na poziciji 32), GSTO2 ne katališe reakcije deglutathionilacije, već to radi samo GSTO1(74).

Za razliku od ostalih članova GST familije, gde je u aktivnom mestu funkcionalna grupa ostatak tirozina (alfa, mi, pi) ili serina (teta i zeta) kod omega klase je to ostatak cisteina (Slika 8) (75), čime se objašnjava čitav spektar specifičnih aktivnosti ove klase, uključujući tiol-transferaznu, dehidroaskorbat-reduktaznu i monometilarsonat reduktaznu katalitičku aktivnost (76).



Slika 8. Struktura aktivnog mesta različitih klasa GST
a) tirozin u aktivnom mestu GST klase alfa, mi, pi
b) serin u aktivnom mestu GST klase teta i zeta
c) cistein u aktivnom mestu GST klase omega

Glutation transferaza klase omega sa svoja dva izoenzima, GSTO1 i GSTO2, poseduje više katalitičkih aktivnosti (74):

a) tioltransferazna aktivnost (aktivnost slična glutaredoksinu)

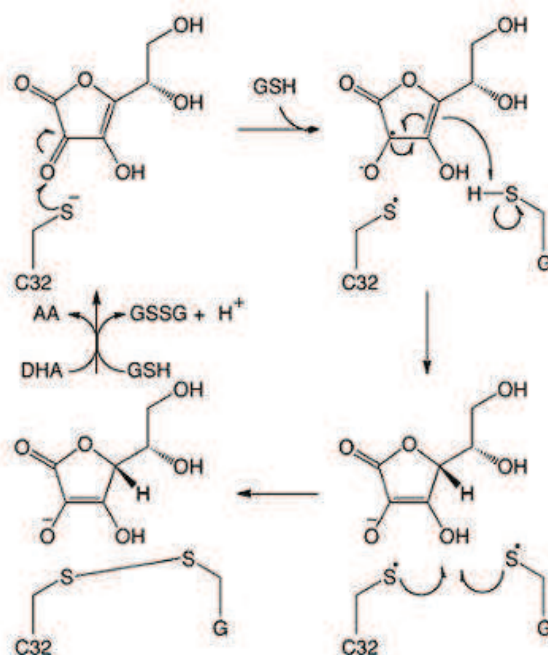


Novootkrivena tiol-transferazna aktivnost ove klase se, zbog prisustva funkcionalne grupe cisteina u aktivnom mestu, sve više povezuje sa procesom S-glutationilacije (posttranslaciona modifikacija proteina dodavanjem glutaciona na specifične cisteinske ostatke). U reakciji dolazi do tioldisulfidne izmene između 2-hidroksietildisulfida i glutaciona, a proizvod reakcije su oksidovani glutation i 2 betamerkaptoetanol. Kada se hidroksietildisulfid (HEDS) koristi kao prosupstrat za glutaredoksin, u prvom koraku reakcije nastaje glutationil-mešoviti disulfid supstrat koji onda može biti deglutationilisan ovim enzimom. Istraživanja Menona i saradnika su pokazala da iako imaju veliku sličnost u strukturi, GSTO2 ne katališe reakcije deglutationilacije već to radi samo GSTO1(77).

b) dehidroaskorbat reduktazna aktivnost

Druga važna katalitička uloga GSTO je dehidroaskorbat reduktazna aktivnost, čiji pretpostavljeni mehanizam je prikazan na Slici 9 (78). Anjonska forma C32 daje elektron dehidroaskorbinskoj kiselini (DHA) pri čemu nastaje stabilni semidehidroksiaskorbat radikal. Vodonik oduzet od glutaciona se uključuje u reakciju i nastaje askorbinska kiselina. Nastali C32-S radikal i GS radikal grade enzim-mešoviti disulfid. Drugi molekul glutaciona koji se uključuje u reakciju regeneriše anjonsku formu enzima i nastaje oksidovani glutation. Dehidroaskorbat-reduktazna (DHAR) aktivnost je 70-100 puta izraženija kod GSTO2, koji se smatra enzimom sa najvećom DHAR aktivnošću u ćelijama sisara, što ukazuje na značaj ovih enzima u regulaciji redoks balansa u ćeliji (78). Ova

aktivnost je posebno značajna za organe u kojima se vitamin C aktivno transportuje u formi dehidraskorbata a zatim u ćelijama redukuje do askorbinske kiseline.



Slika 9. Mehanizam dehidroaskorbat reduktazne aktivnosti GSTO

- c) monometilarsenat reduktazna aktivnost je podjednako prisutna kod oba izoenzima omega klase i ispoljava se u biotransformaciji arsena (79).

Novija istraživanja, međutim, pokazuju da pored poznatih katalitičkih, pojedini GSTO izoenzimi poseduju i nekatalitičke uloge, kao što su modulacija posttranslacione obrade inflamatornog citokina interleukina-1 β i modulacija rijanodinskih receptora (RyR) što može imati ulogu u kalcijumom indukovanoj apoptozi (80). Reakcijom glutationilacije ili deglutationilacije menja se aktivnost apoptotskih signalnih proteina i transkripcionih faktora i modulira apoptotski odgovor. Piaggi i saradnici su pokazali da povećana ekspresija GSTO1 u tumorskim tkivima može imati ulogu u rezistenciji na hemioterapijske agense, kao na primer cisplatinu (81).

1.4.2. Tkivna distribucija GSTO1 i GSTO2

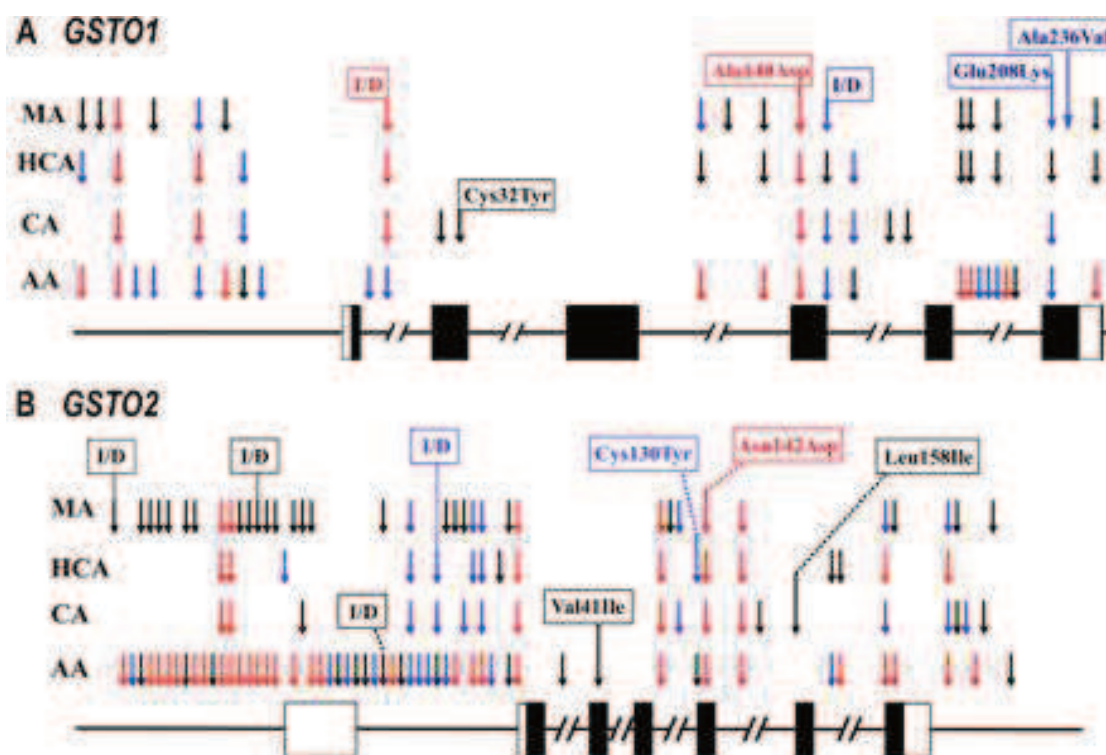
Izoenzimi glutathion transferaza klase omega se razlikuju i po tkivnoj i ćelijskoj distribuciji, pri čemu je GSTO1 eksprimirana u gotovo svim tkivima, uključujući debelo crevo, jetru, srce, pluća, centralni nervni sistem, bubrege, kosti, skeletni mišić, pankreas, prostatu, jajnike, dok je najveća ekspresija GSTO2 u testisima i pankreasu (76,82,83). Raširena distribucija GSTO1 ukazuje na njenu važnu biološku funkciju vezano za njenu tiol transferaznu i dehidroaskorbat-reduktaznu aktivnost potrebnu za normalan ćelijski metabolizam (78). Iako fiziološka uloga GSTO1 nije u potpunosti još razjašnjena smatra se da učestvuje u intracelularnoj homeostazi, pa zato smanjenje tiol-transferazne aktivnosti može dovesti do smanjene zaštite od oksidativnog stresa.

Međutim distribucija izoenzima glutathion transferaza u većini tkiva nije uniformna, odnosno izvesni izoenzimi koji su dominantni u jednom organu, mogu biti odsutni ili prisutni u vrlo niskim koncentracijama u drugim tkivima. Zbog toga procese detoksikacije i štetne efekte elektrofilnih jedinjenja u velikoj meri određuje odgovarajući izoenzimski profil glutathion transferaza tih tkiva (76).

1.4.3. Polimorfizam glutathion transferaza klase omega

Jedan od mogućih uzroka interindividualnih varijacija u aktivnosti glutathion transferaza su polimorfizmi gena za različite glutathion transferaze, a koji za posledicu imaju odsustvo ili izmenjenu katalitičku efikasnost ovih enzima (78).

Pripadnici GST klase omega su kodirani od strane 2 različita gena (*GSTO1* i *GSTO2*), koji se nalaze na hromozomu 10 (10q24.3) i međusobno su udaljeni 7,5 kb. Veličina gena za *GSTO1* je 12,5 kb, dok je za *GSTO2* 24,5 kb, oba gena se sastoje od šest egzona od kojih su 5 identični u veličini a razlika je u četvrtom egzonu koji u genu za *GSTO2* sadrži dodatne tri baze (76). Kod oba *GSTO* gena čoveka je pokazano prisustvo više polimorfizama (72). Istraživanja koja su obuhvatila četiri etničke grupe su pokazala prisustvo 31 polimorfizma kod *GSTO1* gena, a 66 polimorfizama kod gena za *GSTO2* (Slika 10)(84).



→ frekvencija alela <1% → frekvencija alela 1-10% → frekvencija alela >10%

Slika 10. Polimorfizam A) *GSTO1* i B) *GSTO2* u humanojoj populaciji

Na Slici 10. su prikazani polimorfizmi sa frekvencijom javljanja alela, kao i vrsta promene u zavisnosti da li je polimorfizam jednog nukleotida ili inserciono-delecioni polimorfizam. Prikazana je i lokacija SNP na molekulu DNK, gde crni pravougaonici predstavljaju kodirajuće regione, a beli nekodirajući region gena, strelice ukazuju na poziciju polimorfizma, a boja na njihovu učestalost (84).

Najčešće su izučavana tri funkcionalna polimorfizma, *GSTO1 Ala140Asp* (*A140D*; rs 4925), *GSTO1*E155del* (*155E*; rs 11509437) i *GSTO2 Asn142Asp* (*N142D*; rs156697) (72).

Kod *GSTO1* gena više pažnje istraživača je dobio prvi tip *Ala140Asp*, gde je u osnovi zamena citozina (C) adeninom (A) u nukleotidu 419, na kodonu 140 u okviru egzonu 4. To dovodi do promene aminokiseline iz alanina (Ala, A) u aspartat (Asp, D) u aminokiselini 140 (*A140D) pri čemu se tiol transferazna aktivnost smanjuje na 75% u

odnosu na referentni alel, što za posledicu ima smanjen kapacitet za detoksikaciju (72). Drugi polimorfizam *GSTO1* gena je delecija 3 bp na mestu spajanja egzona 4 i introna 4, na kodonu 155 što za posledicu ima deleciju aminokiseline glutamina (72).

U okviru *GSTO2* gena kod polimorfizma *Asn142Asp*, promena nastaje takođe u egzonu 4, usled supstitucije adenina (A) sa guaninom (G) u nukleotidu 424, na kodonu 142, što ima za posledicu zamenu aminokiseline asparagina (Asp, N) u aspartat (Asp, D), u aminokiselini 142 (*N142D).

Istraživanja više autora su pokazala da postoji razlika u učestalosti pojavljivanja polimorfizama *GSTO1* i *GSTO2* gena kod različitih etničkih grupa, što je prikazano u Tabeli 6 (72, 85, 86, 87).

Kod polimorfizma *GSTO1 Ala140Asp* uočava se da je frekvenca javljanja varijantnog *Asp140* alela u Evropskoj populaciji u rasponu 0,302-0,399, kod azijske populacije se kreće od 0,108-0,165, dok je u afričkoj populaciji znatno niža i javlja se u rasponu 0,040-0,081, a slično je i kod Turske populacije, oko 0,085. Međutim, u literaturi se mogu pronaći i noviji podaci koji pokazuju da je frekvenca javljanja *Asp140* alela u Turskoj populaciji ista kao i kod ostalih pripadnika bele rase (88).

Što se tiče polimorfizma *GSTO2 Asn142Asp*, frekvencija alela *Asp142* se kod Azijata javlja u rasponu od 0,173-0,285 i slično je i kod evropske populacije od 0,310-0,341, dok je kod afričke populacije frekvencija *Asp 142* alela značajno veća i kreće se u rasponu od 0,583-0,855.

Tabela 6. Distribucija učestalosti genetskih polimorfizama *GST* klase omega kod pripadnika različitih etničkih grupa

POPULACIJA	N	UČESTALOST ALELA					
		<i>GSTO1 Ala140Asp</i>		<i>GSTO1*E155del</i>		<i>GSTO2 Asn142Asp</i>	
		<i>Ala140</i>	<i>Asp140</i>	<i>E155</i>	<i>del155</i>	<i>Asn 142</i>	<i>Asp 142</i>
Italijanska ¹	116	0,698	0,302	0,956	0,044	0,659	0,341
Španska ³	124	0,601	0,399	0,980	0,020	-	-
Nemačka ⁵	280	0,680	0,320	-	-	-	-
Australijska ²	100	0,665	0,335	0,970	0,030	0,690	0,310
Čileanska ³	111	0,784	0,216	0,986	0,014	-	-
Kineska ²	100	0,835	0,165	0,950	0,050	0,715	0,285
Japanska ^{4,5}	102	0,892	0,108	0,983	0,017	0,784	0,216
Mongolska ⁴	243	0,872	0,128	-	-	0,827	0,173
Južnoafrička ²	62	0,919	0,081	0,984	0,016	0,145	0,855
Ovambo (Namibija) ^{4,5}	163	0,960	0,040	1,000	0,000	0,417	0,583
Turska ⁵	194	0,915	0,085	-	-	0,781	0,219
Turska ⁶	214	0,689	0,311	-	-	-	-

¹Polimanti R i sar.(2009); ²Whitbread AK i sar.(2003); ³Paiva L i sar. (2008); ⁴Fujihara J i sar. (2007); ⁵Takeshita H i sar. (2009); Ada TG i sar., (2013).

N- broj učesnika;

Ala140- referentni alel *GSTO1*

Asp 140- varijantni alel *GSTO1*

Asn142- referentni alel *GSTO2*

Asp 142- varijantni alel *GSTO2*

Iz prikazanih podataka se zaključuje da ovi polimorfizmi mogu da budu antropogenetski marker (89, 87) za razliku od polimorfizma *GSTO1*E155del* gde nije bilo značajne razlike u distribuciji među različitim populacijama i njihove mutacije imaju veoma nisku učestalost.

1.5. POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZE KLASSE OMEGA SA OKSIDATIVNIM FENOTIPOM U TERMINALNOJ BUBREŽNOJ SLABOSTI

1.5.1. Značaj polimorfizama gena za glutation transferaze klase omega u oboljenjima čoveka

Različita ekspresija GST može uticati na predispoziciju za nastanak različitih oboljenja koja su direktno povezana sa faktorima sredine, kao što su izloženost duvanskom dimu, izduvnim gasovima i ostalim polutantima (64). Već je pokazano da postoji značajna povezanost između genskog polimorfizma GST enzima klase A1, M1, P1 i T1 sa nivoom oksidativnog stresa kod bolesti koje u osnovi nastanka imaju oksidativni stress. Polimorfizam gena za poslednje opisanu omega klasu GST je takođe predmet brojnih istraživanja multifaktorijalnih bolesti.

Ranija istraživanja su pokazala da je za patogenezu neurodegenerativnih oboljenja kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest, multipla skleroza i amiotrofična lateralna skleroza, zajednički poremećaj funkcije mitohondrija i oksidativni stres (90). Istraživanja koja su izučavala najčešće polimorfizme GST klase omega, polimorfizam *GSTO1 Ala140Asp* (rs4925) i polimorfizam *GSTO2 Asn142Asp* (rs156697), su pokazala da varijantni genotip može smanjiti ekspresiju GSTO2 u mozgu, odnosno nosioci *GSTO2* varijantnog alela su pod povećanim rizikom za nastanak Alchajmerove, kao i Parkinsonove bolesti (91). Iako je ustanovljeno da je ovaj polimorfizam povezan sa rizikom za nastanak navedenih oboljenja njegov funkcionalni značaj još uvek nije dovoljno jasan. Mogući mehanizmi su poremećaj u regulaciji redoks balansa u ćeliji zbog smanjene dehidroksiaskorbat-reduktazne (DHAR) aktivnost GSTO2, kao i zbog uloge GSTO1 u modulaciji aktivnosti proinflamatornih citokina, interleukina 1 β (92, 74).

Velike studije su pokazale da postoji povezanost između kontaminacije vode sa arsenom i pojavom karcinoma jetre, pluća, bubrega i mokraćne bešike (93). Međutim nivo metabolita arsena u urinu ima širok opseg kod ljudi koji piju istu kontaminiranu vodu pa je mogući uzrok ove varijacije polimorfizam *GSTO1* i/ili *GSTO2* enzima koji

učestvuju u metabolizmu i biotransformaciji arsena svojom monometilarsenat reduktaznom aktivnošću (79).

Poznato je da oksidativni stres pogoršava plućne funkcije i da genetske promene u glutathion transferazama smanjuju njihovu zaštitnu ulogu i povećavaju rizik za nastanak astme (94). Studije koje su ispitivale polimorfizam glutathion transferaza klase omega su pokazale da polimorfizam *GSTO2* gena nosi i do šest puta veći rizik za nastanak astme, dok u distribuciji *GSTO1* genotipa nije bilo značajne razlike između kontrolne grupe i obolelih od astme (95).

Idiopatska hipertenzija kao oboljenje sa kompleksnom i još uvek nerazjašnjenom etiopatogenezom predmet je mnogih istraživanja koja obuhvataju i genetsku varijabilnost. Dosadašnji podaci iz literature su pokazali da ne postoji povezanost *GSTO1* varijanti i rizika za nastanak esencijalne hipertenzije, ali antioksidantna uloga, učešće u metabolizmu arsena i modulaciji upalnih procesa mogu pomoći da se razjasni potencijalna uloga *GSTO1* u patofiziologiji idiopatske hipertenzije (96).

Dosadašnji podaci iz literature pokazuju da postoji povezanost polimorfizma *GSTO2 Asn142Asp* sa rizikom za nastanak hipotireoidizma, i to da je čak četiri i po puta veći rizik za nastanak hipotireoidizma kod osoba nosioca varijantnog *GSTO2* genotipa (97).

Najnovija istraživanja pokazuju da je varijantni genotip *GSTO2* povezan sa povećanim rizikom za nastanak senilne katarakte kod pušača i profesionalne izloženosti ultraljubičastoj svetlosti, što ukazuje na značaj neefikasne regeneracije askorbata u razvoju katarakte (98).

Brojne studije su pokazale da polimorfizmi *GSTO1 Ala140Asp* i *GSTO2 Asn142Asp* povećavaju rizik za nastanak malignih oboljenja. Potvrđena je asocijacija varijantnog *GSTO1 Asp140* alela sa rizikom za nastanak hepatocelularnog carcinoma, holangiokarcinoma i tumora dojke (81,99). Polimorfna ekspresija *GSTO2* je povezana sa rizikom za nastanak tumora jajnika (100). Podaci iz literature su za oba polimorfizma pokazali da udruženi sa povećanom koncentracijom arsena u vodi za piće moduliraju rizik za nastanak karcinoma prelaznog epitela mokraćne bešike (78).

1.5.2. Oksidativni stres u hroničnoj slabosti bubrega

Brojna istraživanja su pokazala da oksidativni stres ima važnu ulogu u nastanku i razvoju mnogih patoloških stanja i bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, hipertenziju, aterosklerozu, diabetes, neurodegenerativne bolesti, kancer, a smatra se da se nalazi i u samoj osnovi procesa starenja (101, 21).

Pacijenti sa hroničnom bubrežnom slabošću predstavljaju posebnu grupu bolesnika sa velikom izloženošću prirodno prisutnim endogenim i egzogenim štetnim jedinjenjima, jer ovi pacijenti akumuliraju krajnje produkte metaboličkih reakcija. Neravnoteža između stvorenih reaktivnih vrsta kiseonika i kapaciteta antioksidantnog sistema imaju važnu ulogu u nastanku i progresiji bolesti bubrega (102). Uzroci povećanog stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika mogu biti: aktivirani oksidativni metabolizam u polimorfonuklearnim leukocitima, opterećenje organizma slobodnim jonima metala promenljive valence usled nekontrolisanog parenteralnog davanja gvožđa ili ponavljanih transfuzija, povećana aktivnosti superoksidizmutaze, flavin i citohrom P450-zavisnih monoksigenaza i ksantin oksidaze (103).

Hronična slabost bubrega se može smatrati hroničnim inflamatornim stanjem, te je jedan od mogućih izvora nekontrolisanog stvaranja kiseoničnih reaktivnih vrsta i aktiviran oksidativni metabolizam u polimorfonuklearnim leukocitima (PMN) i stimulacija nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze. Pokazano je da njihova fiziološka uloga u zapaljenskim reakcijama u uslovima povećane aktivnosti dovodi do povećanog stvaranja vodonik peroksida, superoksid anjona, i do oksidativne modifikacije biološki važnih molekula (104). Nekoliko oksidoreduktaza su prepoznate kao potencijalni izvori kiseoničnih reaktivnih vrsta, uključujući ciklooksigenazu, lipooksigenazu, citohrom P450, azot-oksidi sintazu, ksantin oksidazu, mitohondrijske NADH: ubihinon oksidoreduktazu, i NADPH oksidazu koja je primarni izvor kiseoničnih slobodnih radikala u bubrežnom korteksu (105).

Jedan od osnovnih vidova lečenja bolesnika u terminalnom stadijumu hronične bubrežne bolesti je dijaliza. Međutim, hemoreaktivnost dijalizne membrane i tragovi endotoksina u dijalizatu aktiviraju monocite i neutrofile i stimulišu aktivnost NADPH oksidaze, što takođe doprinosi povećanom stvaranju slobodnih radikala (106). Kod ovih

bolesnika je već izmenjen antioksidantni sistem, a hemodijaliza dalje pogoršava prooksidantno stanje gubitkom hidrofilnih, slobodnih supstanci male molekulske težine, kao što su vitamin C, elementi u tragovima i enzimi (107).

Anemija je čest komorbiditet hronične bubrežne slabosti, javlja se kod 47% bolesnika te je u prevenciji i lečenju potrebna primena preparata gvožđa koja treba da bude kontrolisana. Elektronska struktura gvožđa omogućava davanje jednog elektrona i čini da deluje kao katalizator Fentonove reakcije, olakšavajući konverziju superoksid anjona i vodonik peroksida u hidroksil radikal, koji može da reagije sa različitim biomolekulima, poput lipida, proteina i DNK (108).

U toku protekle dve decenije je potvrđeno da se u hroničnom oštećenju bubrega akumuliraju slobodni radikali koji mogu oksidativno modifikovati i oštetiti molekule proteina, lipida i DNK. Naime, oksidativno oštećenje proteina krvne plazme i povećan nivo proizvoda lipidne peroksidacije je zabeležen već u ranim stadijumima hroničnog oštećenja bubrega (2). Nekoliko markera su se pokazali kao dobri indikatori oksidativnog stresa u hroničnoj slabosti bubrega: malondialdehid, F2 α -izoprostani, lipidni hidroperoksidi, 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), proteinske tiol grupe (P-SH), reaktivni karbonilni derivati (eng. *reactive carbonyl derivatives*, RCD), nitrotirozin, produkti uznapredovale oksidacije proteina (eng. *advanced oxidative protein products*, AOPPs), (58).

Slobodni radikali izazivaju neenzimsku peroksidaciju lipida u ćelijskim membranama i u plazmi dovodeći do formiranja bioaktivnih lipida, kao što su prostaglandinima slični molekuli (tj. F2 α -izoprostani) i različiti međuprodukti, uključujući i malondialdehid (MDA) koji se koristi kao pouzdani marker oksidativnog stresa i kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću (106,109).

Dejstvom slobodnih kiseoničnih radikala nastaje i oksidativno oštećenje proteina plazme hroničnih bubrežnih bolesnika pri čemu nastaju uznapredovali produkti oksidacije proteina. Neka istraživanja su pokazala da je AOPPs povezan sa monocitnom aktivacijom i inflamacijom kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću, te da može da predstavlja marker oksidativnog stresa i monocitne aktivacije (110). Oksidativno oštećenje proteina krvne plazme zabeleženo je već u ranim stadijumima hroničnog oštećenja bubrega.

U plazmi bolesnika sa hroničnom slabošću bubrega značajno je povećana koncentracija 2,4 dinitrofenilhidrazon-reaktivnih karbonilnih derivata, koji su jedan od markera oksidativne modifikacije proteina. Sadržaj proteinskih tiol grupa, koje su važan antioksidant u prekidanju lanca reakcija izazvanih slobodnim radikalima, je značajno smanjen u plazmi ispitivanih bolesnika, ali ne postoji povezanost između stepena oštećenja bubrega i smanjenja nivoa P-SH grupa (27).

Mehanizam nastanka kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću još uvek nije dovoljno jasan. S obzirom da je kod bubrežnih bolesnika prisutan izražen oksidativni stres, moguće je da visoke koncentracije kiseoničnih slobodnih radikala (ROS eng.-*reactive oxygene species*) i vodonik peroksida imaju udela u patogenezi uremijskih komplikacija (111).

U hroničnoj slabosti bubrega povećano je i stvaranje i akumulacija slobodnih radikala pa se očekuje da je povećana i angažovanost detoksikacionih mehanizama. Ljudska plazma sadrži različite antioksidantne biomolekule, a glavna antioksidantna uloga se pripisuje serumskim albuminima koji inhibiraju peroksidaciju lipida eritrocitne membrane (112). Merenjem karbonilnih grupa pokazano je da je albumin dominantan oksidativno modifikovan plazma protein kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću i kod bolesnika na hemodijalizi, što smanjuje antioksidativnu odbranu i povećava mogućnost oksidativnog oštećenja tkiva i nastanak kardiovaskularnih bolesti u ovoj populaciji (113). Ubrzana peroksidacija lipida ćelijske membrane, u prisustvu hipoalbuminemije, može skratiti životni vek eritrocita i povećati njihovu sklonost ka intravaskularnoj hemolizi, što je važan događaj koji dalje olakšava i podstiče održavanje povećanog oksidativnog stresa.

Ranija istraživanja su pokazala da kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću postoje promene i u aktivnostima enzimskih komponenti antioksidativne zaštite. Utvrđeno je da sa progresijom hronične slabosti bubrega dolazi do porasta antioksidantne enzimske aktivnosti eritrocita. Smatra se da povećanje aktivnosti superoksid dizmutaze i glutacion peroksidaze u eritrocitima bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću najverovatnije nastaje zbog aktivacije antioksidantnog odbrambenog sistema zbog povećanog stvaranja kiseoničnih slobodnih radikala (114). Raniji rezultati ovih autora su pokazali da u zavisnosti od stepena oštećenja bubrega

postoji značajna promena nivoa redukovano glutationa u eritrocitima i limfocitima kao i povećanje aktivnosti glutation reduktaze i glutation transferaze (114). Osim eritrocitne potvrđena je povećana aktivnost i vanćelijske superoksid dizmutaze (115), dok je u plazmi bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću zabeležena smanjena aktivnost glutation peroksidaze što je najverovatnije posledica smanjene sinteze enzima de novo u oštećenim ćelijama bubrega (116).

U procesima detoksikacije, najčešće se glutation (GSH), najvažnije unutarćelijsko, neproteinsko tiol jedinjenje, reakcijom konjugacije vezuje za elektrofilne metabolite endogenog i egzogenog porekla. Konjugacijom sa glutationom, u većini slučajeva, smanjuje se reaktivnost elektrofilnih jedinjenja prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima, kao što su nukleinske kiseline i proteini. Istraživanja su pokazala da u progresiji bubrežne slabosti značajnu ulogu mogu imati enzimi sinteze i regeneracije glutationa, kao i antioksidantni enzimi (114). Ključnu ulogu u reakcijama zaštite od slobodnih radikala, kao i reakcijama detoksikacije, imaju glutation transferaze.

1.5.3. Povezanost polimorfizama gena za glutation transferaze klase omega sa nivoom oksidativnog stresa kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega

S obzirom da je nedavno pokazana značajna povezanost između genskog polimorfizma GST enzima, klase A1, M1, P1 i T1 sa nivoom oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika (117), moguće je da polimorfna ekspresija pripadnika omega klase takođe utiče na oksidativni fenotip ovih bolesnika. Interesantno je da je do sada u ovom kontekstu ispitivana samo GSTO2 klasa kod bolesnika sa transplantiranim bubregom. Ispitivanje je vršeno kod iranske populacije pri čemu dobijeni rezultati ukazuju da ne postoji značajna povezanost između polimorfizma *GSTO2* gena i rizika za nastanak terminalne bubrežne slabosti, kao ni akutnog odbacivanja alografta u postupku lečenja. Pošto oksidativni stres ima važnu ulogu ne samo u nastanku terminalne slabosti bubrega, već i u nastanku kardiovaskularnih komplikacija kod ovih bolesnika, moguće je da prisustvo određenih varijanti gena za glutation transferaze klase omega može imati prognostički značaj u proceni rizika za nastanak kardiovaskularnih komplikacija.

2. CILJEVI

Ciljevi ove studije su:

1. Da se ustanovi distribucija genskih polimorfizama *GSTO1* i *GSTO2* kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega i pripadnika odgovarajuće kontrolne grupe;
2. Da se utvrdi da li je prisustvo genskog polimorfizma *GSTO1 Ala140Asp* (rs 4925) i *GSTO2 Asn142Asp* (rs156697) udruženo sa povećanim rizikom za nastanak terminalne slabosti bubrega;
3. Da se ispita da li postoji povezanost između različitih varijanti gena za *GSTO1* i *GSTO2* i oksidativnog fenotipa bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega;
4. Da se ispita da li postoji povezanost različitih varijanti gena za *GSTO1* i *GSTO2* sa ukupnim i kardiovaskularnim preživljavanjem bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. SELEKCIJA ISPITANIKA

Studija je obuhvatila 199 bolesnika sa potvrđenom dijagnozom terminalne bubrežne slabosti koji su lečeni ponavljanim hemodijalizama na Odeljenju za nefrologiju i metaboličke poremećaje sa dijalizom KBC Zvezdara i na Odeljenju za nefrologiju i hemodijalizu KBC Zemun. Kontrolnu grupu je činio isti broj ispitanika uparenih po uzrastu i polu, sa očuvanom funkcijom bubrega. Koristili su se uzorci krvi kontrola iz postojeće banke kontrolnih uzoraka koji su prikupljeni u okviru ranijih istraživanja radi realizacije ciljeva projekta pod nazivom „Značaj glutation transferaza u podložnosti za nastanak oboljenja“, Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj broj 175052. Uzorci krvi bolesnika koji se leče ponavljanim hemodijalizama su uzeti na Odeljenju za nefrologiju i metaboličke poremećaje sa dijalizom KBC Zvezdara i na Odeljenju za nefrologiju i hemodijalizu KBC Zemun, tokom januara 2010. Godine (Etički komitet Medicinskog fakulteta u Beogradu, odluka broj: 29/II-8 i 29/XII-14). Analiza uzoraka i ispitivanje polimorfizama je rađeno u laboratoriji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Grupa bolesnika je obuhvatala 84 muškarca i 115 žena, prosečne starosti 59.9 ± 12.2 godina, a kontrolna grupa je imala 85 muškaraca i 114 žena prosečne starosti 59.3 ± 10.8 godina. Pacijenti su bili starosti preko 21 godine, stabilni, i sa dijaliznim stažom dužim od tri meseca (*HD vintage*) pre uključenja u studiju. Dijalizirani su 12-15 sati nedeljno na dijalizatorima za jednokratnu upotrebu sa nisko-permeabilnom (*low-flux*) i visoko-permeabilnom (*high-flux*) polisulfonskom membranom, površine 1.3-2.1 m². Uzroci nastanka terminalne bubrežne slabosti su bili hipertenzivna nefroskleroza (n=93), glomerulonefritis (n=32), dijabetička nefropatija (n=25), policistična bolest bubrega (n=19), pijelonefritis (n=19), Balkanska endemska nefropatija (n=7) i opstruktivna nefropatija (n=4). Pacijenti nisu dobijali antioksidantnu terapiju, njih 35,2 % su primali angiotenzin- konvertirajuće inhibitore, a 15,1 % je primalo statine.

Sve osobe kojima je uziman biološki materijal i lični podaci dale su pisani pristanak da učestvuju u istraživanjima. Kriterijumi za isključivanje iz studije su bili

prisustvo maligniteta, pojava akutnih infekcija što je procenjivano na osnovu vrednosti CRP, kao i želja ispitanika da više ne učestvuje u studiji.

3.2. ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZE KLASE OMEGA

Polimorfizam *GSTO* gena određivan je analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata, *PCR-RFLP*, (eng. *polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*). Lančanom reakcijom polimerizacije (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) analizirana je DNK izolovana iz leukocita periferne krvi, koja je uzeta u vakutejnere sa EDTA kao antikoagulansom. Uzorci pune krvi su alikvotirani i do izolacije DNK čuvani na -20°C.

3.2.1. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline

Izolacija deoksiribonukleinske kiseline (DNK) iz leukocita periferne krvi je izvršena korišćenjem *QIAamp DNA mini kita*. Postupak izolacije obuhvata nekoliko koraka, najpre se delovanjem deterdženta iz mini kita liziraju ćelijske membrane leukocita, a enzimskom digestijom proteinaze K uklanjaju se histoni i ostali proteini vezani za DNK. Na taj način je dobijena slobodna DNK bez vezanih proteina, nukleaza i drugih kontaminata koji bi mogli da interferiraju i inhibiraju PCR reakciju. Lizat se zatim prenosi u *QIAamp mini spin kolone* sa silika-gel membranom koja selektivno vezuje DNK, a ostatak lizata sa zaostalim kontaminantima je uklanjao ispiranjem membrane sa puferima koji sadrže soli i etanol. Na kraju se DNK ispira sa kolone, puferom 10 mM Tris HCl, 0.5 mM EDTA pH 9.0, alikvotira i čuva na -20°C do izvođenja PCR analiza.

3.2.2. Lančana reakcija polimerizacije DNK

Lančana reakcija polimerizacije je brza, specifična i osjetljiva metoda *in vitro* amplifikacije specifičnog DNK fragmenta. Reakcija se zasniva na cikličnim temperaturnim promenama, uz prisustvo oligonukleotida (prajmera), koji su

komplementarni krajevima sekvence koja se umnožava i međusobno su suprotno orjentisani, a reakcija je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom (Tabela 7).

Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina je određena rastojanjem između sekvenci sa kojima su prajmeri komplementarni. Reakcija je lančana i eksponencijalna, jer novosintetisani lanci DNK postaju matrice za sintezu DNK u narednim ciklusima. Tako se željeni fragment DNK za nekoliko sati može umnožiti u 10^6 - 10^9 kopija.

Tabela 7. Sekvence početnica i restrikcioni enzimi za određivanje polimorfizama gena za GST klase omega

Gen	Sekvenca početnica (5'-3')	Polimorfizam	Temperatura pripajanja (°C)	PCR proizvod	Enzim
GST01	F: <i>GAAC TTGATGCCCC TTGGT</i> R: <i>TGATAGCTAGGAGAA ATA ATT AC</i>	SNP Ala140Asp	60°C	254bp	Cac8I
GST02	F: <i>AGGCAGAAC AGG AAC TGG AA</i> R: <i>GAG GGA CCC CTT TTT TACC</i>	SNP Asn142Asp	60°C	185bp	MboI

F- eng. *forward*

R- eng. *reverse*

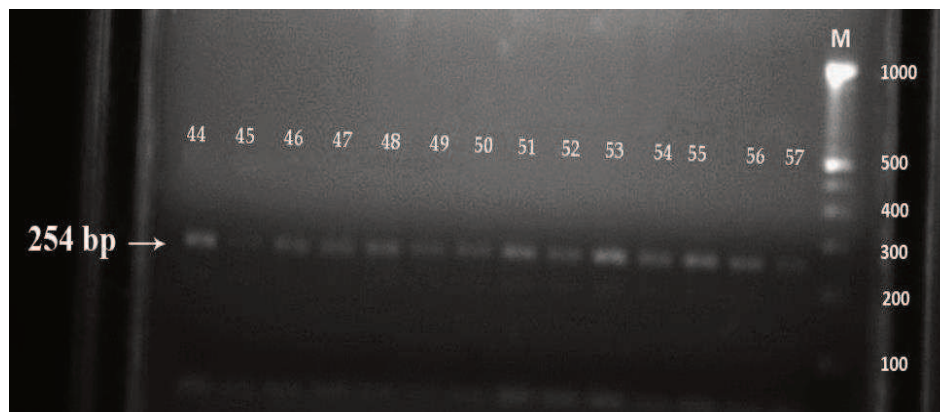
bp- bazni parovi (eng. *base pair*)

3.2.3. Određivanje GST01 polimorfizma

Polimorfizam *GST01 Ala140Asp* je određivan analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata DNK po modifikovanoj PCR-RFLP metodi Marahatta i saradnika (99).

PCR reakciona smeša je inkubirana i inicijalno denaturisana na 94°C u trajanju od 5 minuta. Zatim je usledila amplifikacija DNK u toku serije od 31 ciklusa u kojima se ponavljaju tri sledeće faze: denaturacija (94°C u toku 1 minuta), pripajanje prajmera (1 minut na 60°C) i ekstenzija prajmera (72°C, 1 minut). Nakon poslednjeg ciklusa finalna ekstenzija na 72°C trajala je 5 minuta. Uspešnost amplifikacije proveravana je tako što je rađena elektroforeza PCR proizvoda vezanog za etidijum–bromid na 2% agaroznom gelu u trajanju od 19 minuta na 125V, 0.27A i 50W.

Fluorescencija etidijum-bromida pri ekspoziciji DNK UV zracima na 302nm i prisustvo trake veličine 254 bp ukazivalo je na prisustvo gena za *GSTO1* (Slika 11).



Slika 11. Identifikacija *GSTO1* genotipa

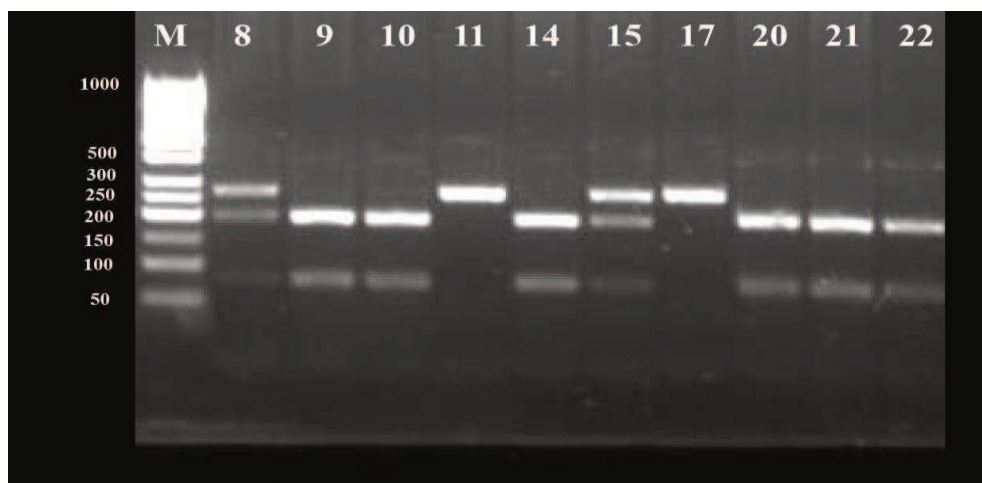
U svim uzorcima prisutna je traka veličine 254bp
M-marker molekulske veličine
bp-broj baznih parova

U cilju određivanja SNP polimorfizma *GSTO1* dejstvom restrikcionog enzima Cac 8 izvedena je restrikciona digestija dobijenih PCR proizvoda. Restrikcioni enzimi spadaju u grupu endonukleaza koje imaju sposobnost da prepoznaju specifične sekvence na dvolančanoj DNK dužine 4-6 baznih parova, takozvana mesta prepoznavanja ili restrikciona mesta, i da iseku DNK molekul u okviru ili veoma blizu tih specifičnih sekvenci. Stvaranje ili ukidanje određenog restrikcionog mesta spada u normalne polimorfizme poznate kao polimorfizmi dužine restrikcionih fragmenata DNK.

Inkubacija PCR proizvoda i Cac 8 enzima odvijala se na 37°C tokom 16 sati, a prisustvo restrikcionog mesta rezultiralo je nastajanjem dva fragmenta DNK dužine 186bp i 68bp. Proizvodi restrikcije su razdvajani elektroforezom na 2% agaroznom gelu i vizuelizovani korišćenjem fluorescencije etidijum bromida vezanog za proizvode restrikcije, pri čemu se mogu dobiti sledeći rezultati (Slika 12):

- Prisustvo traka veličine 186 bp i 68 bp ukazivalo je na DNK uzorke sa *CC* homozigotnim genotipom (uobičajeni *Ala/Ala* homozigotni, referentni genotip),

- prisustvo traka veličine 254bp, 186bp i 68bp na DNK uzorke sa *CA* heterozigotnim varijantnim genotipom (*Ala/Asp*),
- dok prisustvo trake veličine 254 bp na DNK uzorke sa *GSTO1 AA* homozigotnim varijantnim genotipom (*Asp/Asp*).



Slika 12. Analiza genetskih varijanti *GSTO1* PCR-RFLP metodom

M-marker molekulske veličine (broj baznih parova)

Uzorci 9, 10, 14, 20, 21 i 22 pokazuju trake veličine 186bp+68bp-*GSTO1 CC* genotip;

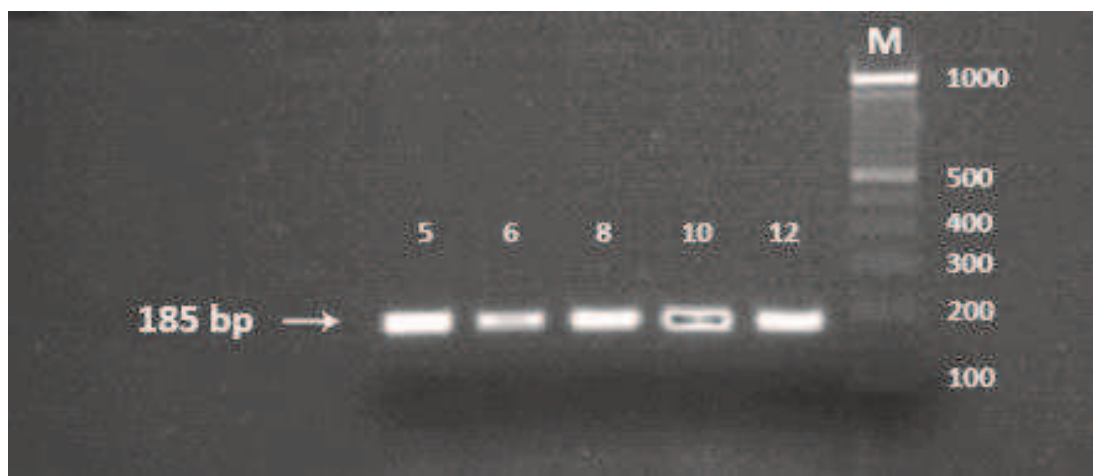
Uzorci 8 i 15 pokazuju trake veličine 254+186bp+68bp- *GSTO1CA* genotip.

Uzorci 11 i 17 pokazuju traku veličine 254bp- *GSTO1AA* genotip.

3.2.4. Određivanje *GSTO2* polimorfizma

Polimorfizam *GSTO2 Asn142Asp* određivan je analizom polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata DNK po modifikovanoj PCR-RFLP metodi Marahatta i saradnika (99).

Za amplifikaciju DNK fragmenta odgovornog za sintezu *GSTO2* korišćeni su prajmeri *forward* 5-AGG CAG AAC AGG AAC TGG AA -3 i *reverse* 5-GAG GGA CCC CTT TTT GTA CC-3, a protokol i uslovi reakcije su isti kao za *GSTO1*. Nakon završenog PCR-a izvršena je elektroforeza na 2% agaroznom gelu. Elektroforeza je trajala 20 minuta na 120V, 0.27A i 80W. Kako je za PCR proizvode vezan etidijum–bromid oni su vizuelizovani UV zracima na 302nm. Dobijene trake veličine 185bp odgovaraju *GSTO2* genu (Slika 13).



Slika 13. Identifikacija *GSTO2* genotipa

U svim uzorcima je prisutna traka veličine 185bp

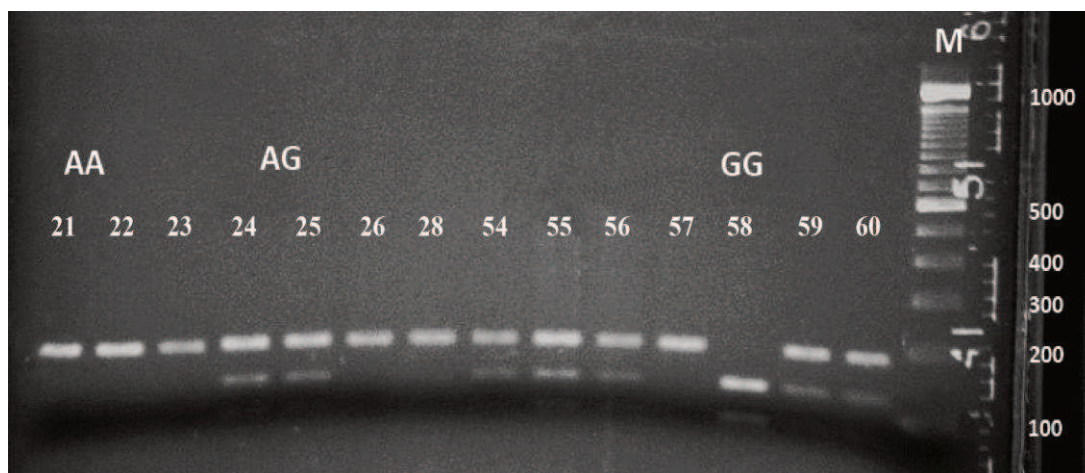
M-marker molekulske veličine

bp- broj baznih parova

Nakon toga je određivan polimorfizam gena za *GSTO2* tako što je izvršena restrikciona digestija PCR proizvoda dejstvom restrikcionog enzima Mbol, u trajanju od 18 sati, na 37°C. Ukoliko je postojalo restrikciono mesto nastajali su fragmenti DNK dužine 122bp i 63bp. Proizvodi restrikcije su razdvajani elektroforezom na 4% agaroznom gelu i vizuelizovani korišćenjem fluorescencije etidijum bromida. Proizvodi restrikcione digestije mogu biti:

- Prisustvo jedne trake veličine 185 bp ukazivalo je na prisustvo uobičajenog *GSTO2 AA (Asn/Asn)* homozigotnog referentnog genotipa,
- prisustvo traka veličine 185bp, 122bp i 63bp na DNK uzorke sa *GSTO2 AG* heterozigotnim varijantnim genotipom (*Asn/Asp*),
- dok se prisustvo traka veličine 122bp i 63 bp se javljalo kod DNK uzoraka sa *GSTO2 GG* homozigotnim varijantnim genotipom (*Asp/Asp*).

Na Slici 14 su prikazani rezultati restrikcione digestije GSTO2:



Slika 14. Analiza genetskih varijanti *GSTO2* PCR-RFLP metodom

M-marker molekulske veličine (broj baznih parova).

Uzorci 21, 22, 23, 26, 28 i 57 pokazuju traku veličine 185bp- *GSTO2* AA genotip;

Uzorci 24, 25, 54, 55, 56, 59 i 60 pokazuju trake veličine 185+122bp+63bp- *GSTO2* AG genotip.

Uzorak 58 pokazuje trake veličine 122+63bp- *GSTO2* GG genotip.

3.3. ODREĐIVANJE POKAZATELJA NIVOA OKSIDATIVNOG STRESA

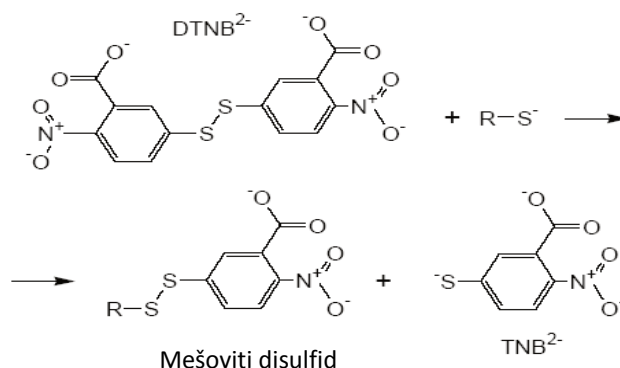
U cilju određivanja nivoa oksidativnog stresa kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću određivani su pokazatelji oksidativnog oštećenja proteina i lipida.

3.3.1. Određivanje koncentracije proteinskih tiol grupa

Koncentracija proteinskih tiol grupa u plazmi određivana je spektrofotometrijski, upotrebom Ellman-ovog reagensa (2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeva kiseline ili DTNB), prema metodi Jocelyn (118).

Proteinske tiol grupe (P-SH) u baznoj sredini (pH 9.0) redukuju 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeve kiseline DTNB stvarajući žuto obojen anjon 5-tio 2-nitrobenzoeve kiseline (TNB).

Na slici 15 je prikazana reakcija DTNB i tiol grupa:



Slika 15. Redukcija Ellmanovog reagensa slobodnim sulfhidrilnim grupama

Molarni apsorpcioni koeficijent TNB anjona na talasnoj dužini od 412nm iznosi $13,6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Koncentracija proteinskih tiol grupa izražena je u $\mu\text{mol/g}$ proteina. Koncentracija proteina određivana je po metodi Lowry-ja i saradnika (119).

Kako se DTNB redukuje i pod dejstvom svetlosti stvarajući TNB, da bi se sprečila nespecifična redukcija Ellman-ovog reagensa, pri određivanju proteinskih tiol grupa, reagensi i uzorci moraju biti zaštićeni od svetlosti.

3.3.2. Određivanje koncentracije karbonilnih grupa

Kao markeri oksidativnog oštećenja proteina najčešće se koriste karbonolne grupe, a metode koje se koriste za merenje njihove koncentracije su spektrofotometrijski testovi, ELISA testovi i imunohistohemijske metode.

U ovom istraživanju koncentracija karbonilnih grupa je određivana korišćenjem enzimске imunološke metode-ELISA, (*OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit, Cell BiolabsInc, SAD*)(120). Sadržaj karbonilnih grupa u uzorku se određuje poređenjem sa standardnom krivom. Princip reakcije je kompetitivno enzim-imunohemijska analiza gde se nakon stvaranja kompleksa karbonil At - anti karbonil-At i ispiranja nevezanih komponenti dodaje sekundarno antitelo obeleženo peroksidazom. Oksidacijom hromogenog substrata delovanjem peroksidaze iz vezanog sekundarnog antitela razvija se boja, čiji intenzitet se meri spektrofotometrijski (450 nm), i obrnuto je proporcionalan koncentraciji karbonilnih grupa u uzorku. Koncentracija karbonilnih grupa se izražava u nmol/mg prot.

3.3.3. Određivanje koncentracije nitrotirozina

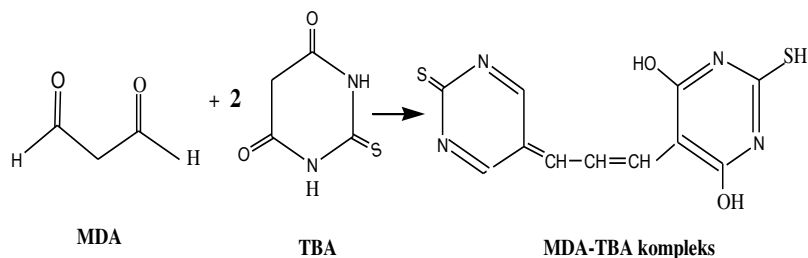
U uslovima povećanog stvaranja NO dolazi do nitrovanja slobodnog tirozina i do povećanja količine nitroilovanog tirozina koji se može određivati spektrofotometrijski i ELISA metodom.

U ovom istraživanju nitrotirozin (NT) je određivan kompetitivnom ELISA metodom (*OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA kit, Cell BiolabsInc, SAD*). Metoda je namenjena merenju koncentracije nitrotirozina u uzorcima biološkog materijala koji sadrže proteine (ćelijski lizat, serum, plazma). Princip reakcije je kompetitivno enzim-imunohemijska analiza gde se nakon stvaranja kompleksa NT antitelo-anti NT antitelo i ispiranja nevezanih komponenti dodaje sekundarno antitelo obeleženo peroksidazom. Oksidacijom hromogenog substrata delovanjem peroksidaze iz vezanog sekundarnog antitela razvija se boja, čiji intenzitet se meri spektrofotometrijski (450 nm), i obrnuto je proporcionalan koncentraciji NT u uzorku, a izražava se u nmol/L (121).

3.3.4. Određivanje koncentracije malondialdehida

Produkti lipidne peroksidacije imaju dug poluživot i veoma su reaktivni, pa je njihovo merenje široko prihvaćeno u proceni oksidativnog oštećenja ćelija, a najčešće se

određuje koncentracija malondialdehida (MDA). Koncentracija MDA je određivana metodom Dousset-a i saradnika (122)(slika16).



Slika 16. Mehanizam reakcije MDA sa tiobarbiturnom kiselinom

Metoda je zasnovana na principu reakcije TBA sa MDA iz uzorka, u uslovima visoke temperature i u kiseloj sredini. MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat crvene boje (u odnosu 1MDA : 2TBA), koji ima maksimum apsorpcije monohromatske svetlosti na talasnoj dužini od 532nm. Molarni apsorpcioni koeficijent za MDA-TBA kompleks na talasnoj dužini od 532nm iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ L/mol cm}$. Koncentracija malondialdehida je izražena u mmol/L plazme. U uslovima *in vitro*, pri povišenoj temperaturi i pri niskim vrednostima pH, dolazi do dodatne peroksidacije lipida plazme, što se može sprečiti dodavanjem antioksidansa (butilirani hidroksitoluen) u inkubacionu mešavinu. Iako su testovi za MDA kritikovani zbog niske specifičnosti i formiranja artefakta, ova metoda ostaje kao jedna od najkorisnijih i najčešće upotrebljivanih za merenje oksidativnog oštećenja.

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Osnovna obeležja varijabli su testirana primenom deskriptivne analize i predstavljena u vidu aritmetičke sredine i standardne devijacije. Vršena je procena da li se genotipovi studijske i kontrolne grupe nalaze u Hardy-Weinberg-ovom ekvilibrijumu i određivanaje značajnost razlike u frekvenciji dobijenih genotipova između ispitivanih bolesnika i kontrolne grupe primenom χ^2 testa.

Povezanost između genetskog polimorfizma i rizika za nastanak terminalne bubrežne slabosti procenjivana je univarijantnom logističkom regresionom analizom, na osnovu veličine i značajnosti relativnog rizika (eng. *odds ratio*, *OR*) sa intervalom poverenja od 95% (CI 95%), usklađenih po polu i godinama kao potencijalni utičući faktori.

Za ispitivanje postojanja statistički značajnih razlika u nivou pokazatelja oksidativnog stresa kod bolesnika sa različitim varijantama gena za *GSTO1* i *GSTO2* u prvom koraku je testirana normalnost raspodele podataka upotrebom Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Pri postojanju normalne distribucije podataka korišćen je t-test za dve grupe podataka, odnosno ANOVA za poređenje tri ili više grupa podataka. Ukoliko distribucija podataka nije normalna korišćen je Mann-Whitney-jev za dve grupe podataka a pri poređenju tri i više grupa podataka korišćen je Kruskal-Wallis-ov test.

Analiza haplotipovai odedivanje njihove frekvencije vršeno je primenom matematičkog *expectation maximisation* (EM) algoritma u *haplo.stats* paketu (123).

Preživljavanje bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću je analizirano pomoću *Kaplan-Majer* testa za procenu kumulativne verovatnoće preživljavanja. Vreme ulaska u studiju je početak lečenja dijalizom a nastupanje specifičnog ishoda je nastupanje smrti, uz evidenciju datuma i uzroka smrti. Vreme praćenja je trajalo 36 meseci, a informacije o smrti i uzroci smrti su dobijeni iz bolničke evidencije i drugih relevantnih dokumenata. Na osnovu uzroka smrti definisano je kod kojih ispitanika je uzrok smrti bio kardiovaskularni događaj, infarkt miokarda i/ili moždani udar, pa je analiza preživljavanja izvedena kako u odnosu na opštu, tako i u odnosu na

kardiovaskularnu smrtnost. Log-rank testom je upoređivano prosečno preživljavanje u odnosu na ispitivane parametre.

Sve varijable koje su u univariјantnoj analizi bile statistički značajne su analizirane udruženo u multivariјantnoj Cox-regresionoj analizi. Prediktivna vrednost različitih GSTO genotipova u ukupnom i kardiovaskularnom mortalitetu je procenjena Koks regresionim modelom, uključujući različite faktore rizika u tri modela. Brojevi bolesnika uključenih u regresione modele bili su isti za sve testirane GSTO polimorfizme. Za ukupni mortalitet broj bolesnika uključenih u model 1, 2, 3 je bio 186, 183 i 169, respektivno; za kardiovaskularni mortalitet 180, 177 i 166 bolesnika, za infarkt miokarda 189, 186 i 169 bolesnika, a za cerebrovaskularni insult 190, 187 i 169 bolesnika, respektivno. Model 1 uključuje faktore starost i pol, model dva je obuhvatio kovariјable modela 1 uz dodatak statusa pušenja. Model tri uključuje sve kovariјable modela 1 i 2 kao i faktore rizika dijabetes i status holesterola. Povezanost je predstavljena odnosom rizika (engl. *Hazard ratio*) sa intervalom poverenja od 95% (IP 95%).

Dobijeni rezultati su obrađivani statističkim programom SPSS (*Statistical package for the social sciences, Chicago, IL*) verzija 17.0. Statistička značajnost je utvrđena ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05 (dvostrani test).

4. REZULTATI

4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

U studiju je bilo uključeno 199 osoba sa očuvanom funkcijom bubrega koje su činile kontrolnu grupu i 199 bolesnika sa potvrđenom dijagnozom terminalne bubrežne slabosti koji su lečeni ponavljanim hemodijalizama. Osnovne demografske i kliničke karakteristike ispitanika prikazane su na Tabeli 8.

Tabela 8. Osnovne demografske i kliničke karakteristike kontrolne grupe i bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega

Karakteristike	Kontrole n (%)	Bolesnici n (%)	p
Pol			
Muški	85 (43)	84 (42)	p= 0,919
Ženski	114 (57)	115 (58)	
Starosna dob (godine)	59,3±10,8	59,9±12,2	p=0,605
Pušenje			
da	64 (32)	55 (28)	p=0,381
ne	135 (68)	144 (72)	
Hipertenzija	41 (20)	95 (47)	p=0,001*
Dijabetes			
da	10 (5)	25 (13)	p=0,012*
ne	189 (95)	165 (87)	
Vreme trajanja dijalize (godine)	/	6,3 ± 4,5	

vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD;

n – broj učesnika;

* -statistički značajna razlika.

Kontrolnu grupu je činilo 85 muškaraca i 114 žena, dok je grupa bolesnika sa TBS obuhvatala 84 muškarca i 115 žena. Iz rezultata prikazanih na Tabeli 8 se vidi da je prosečna starosna dob u kontrolnoj grupi 59,3 ± 10,8 godina, a kod bolesnika sa TBS

59,9 ± 12,2 godina. Statističkom obradom podataka je utvrđeno da u pogledu polne distribucije, starosne dobi i pušenja nije bilo značajne razlike između kontrolne grupe i bolesnika sa TBS.

Hipertenzija, kao jedno od najčešćih oboljenja koje dovodi do terminalne bubrežne slabosti, je očekivano statistički značajno više prisutna u grupi bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu. Kod 25 (13 %) bolesnika je postojao dijabetes, jedan od faktora koji takođe doprinosi razvoju terminalne bubrežne slabosti.

U obe grupe ispitanika određivani su osnovni biohemijski parametri i dobijene vrednosti su prikazane na Tabeli 9.

Tabela 9. Osnovni biohemijski parametri kod kontrolne grupe i bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega

Biohemijski parametri	Kontrole n (%)	Bolesnici n (%)	p
Albumin (g/L)	43,5 ± 2,6	39,6 ± 4,0*	p < 0.001
Urea (mmol/L)	5,5 ± 1,2	24,4 ± 4,8*	p < 0.001
Kreatinin (μmol/L)	84,4 ± 10,3	880,2 ± 238,6*	p < 0.001
Ukupni holesterol (mmol/L)	4,1 ± 0,9	4,7 ± 1,1*	p < 0.001
HDL holesterol (mmol/L)	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,4*	p = 0.048
LDL holesterol (mmol/L)	2,4 ± 0,9	2,6 ± 0,8*	p = 0.019
Trgliceridi (mmol/L)	1,4 ± 0,4	2,1 ± 1,3*	p < 0.001
Feritin	48,0 ± 29,6	350,2 ± 278,0*	p < 0.001
Serumsko gvožđe (μmol/L)	21,1 ± 4,8	11,3 ± 5,6*	p < 0.001
Hemoglobin (g/L)	144,0 ± 13,7	108,1 ± 15,4*	p < 0.001
Hematokrit (%)	39,8 ± 4,9	32,1 ± 5,2*	p < 0.001

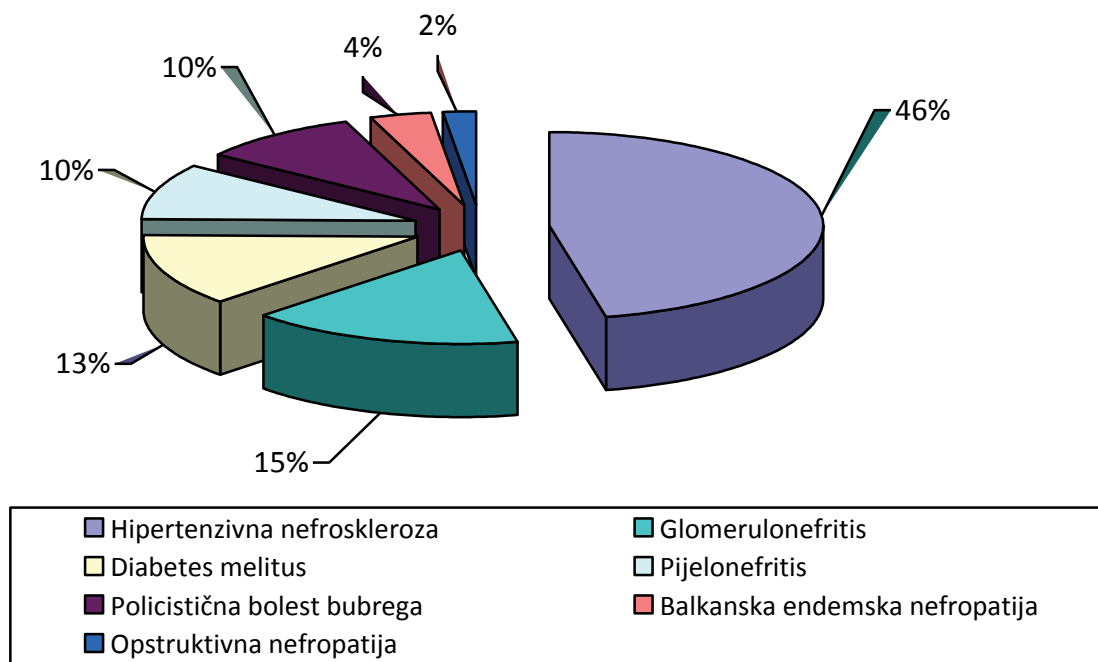
vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD;

n – broj učesnika;

*- statistički značajna razlika.

Iz prikazanih rezultata se uočava da bolesnici sa TBS imaju povišene vrednosti uree, kreatinina i feritina, a niže vrednosti za serumsko gvožđe, hemoglobin i hematokrit, i te promene su u odnosu na kontrolnu grupu statistički visoko značajne. Statistički su značajno veće i vrednosti ukupnog i LDL holesterola, dok je koncentracija HDL holesterola niža kod bolesnika sa TBS u odnosu na kontrolnu grupu.

Postoje brojni faktori koji mogu dovesti do hroničnog oštećenja bubrega. U našoj grupi bolesnika uzroci nastanka krajnjeg stadijuma bubrežne slabosti prikazani su na Grafikonu 1.

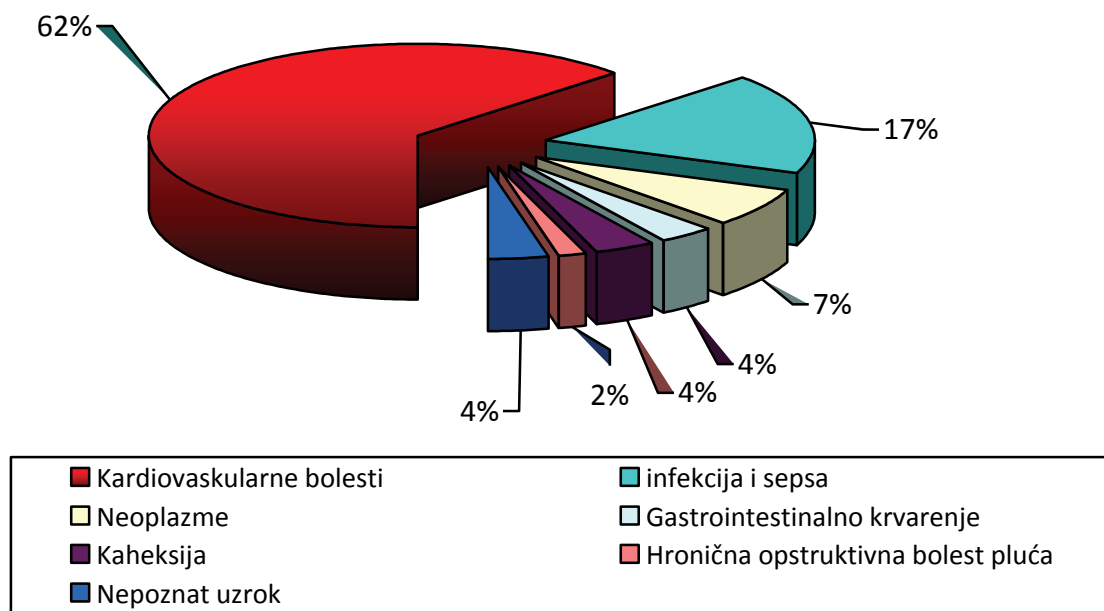


Grafikon 1. Najčešći uzroci nastanka terminalne bubrežne slabosti kod ispitivane grupe

Iz rezultata prikazanih na Grafikonu 1 se uočava da je kod najvećeg broja bolesnika uzrok nastanka terminalne bubrežne slabosti bila hipertenzivna nefroskleroza, i to kod 93 bolesnika što je 47% od ukupnog broja. Kao drugi značajan uzrok pojavljuje se glomerulonefritis kod 32 bolesnika, odnosno kod 16% obolelih. Kod 25 bolesnika (13%) prisutna je dijabetična nefropatija, a podjednako su zastupljeni policistična bolest bubrega i pijelonefritis (19 bolesnika), dok se u nešto manjoj meri javljaju Balkanska endemska nefropatija (7 bolesnika) i opstruktivna nefropatija (4 bolesnika) kao uzroci nastanka TBS.

Početak studije je definisan od trenutka kada je bolesnik započeo lečenje putem hemodijalize i trajala je do završetka praćenja ili do nastupanja smrtnog ishoda.

Prosečna dužina trajanja hemodijalizne terapije za našu grupu bolesnika je bila $6,3 \pm 4,5$ godina. U toku trajanja studije smrtni ishod je nastupio kod ukupno 57 bolesnika, a najčešći uzroci smrti su prikazani na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Najčešći uzroci smrti kod ispitivane grupe bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega

Na Grafikonu 2 se može videti da je smrtni ishod u toku trajanja studije nastupio kod ukupno 57 bolesnika, i da su najčešći uzrok smrti bile kardiovaskularne bolesti (36 bolesnika), od čega je 6 bolesnika imalo udruženo i infarkt miokarda i moždani udar. Infekcija i sepsa su kod 10 bolesnika dovele do smrti, nastanak neoplazme kod 4, gastrointestinalno krvarenje i kaheksija kod 2, hronična opstruktivna bolest pluća kod 1 bolesnika, a kod 2 bolesnika uzrok smrti je bio nepoznat.

4.2. GENSKI POLIMORFIZMI GLUTATION TRANSFERAZA KLASSE OMEGA I RIZIK ZA NASTANAK TERMINALNE SLABOSTI BUBREGA

U okviru našeg istraživanja izvedeno je ispitivanje genetskog polimorfizma glutation transferaza klase omega, *GSTO1* i *GSTO2*, kod kontrolne grupe i kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Izolacija DNK i PCR umnožavanje regiona od interesa je uspešno obavljeno kod svih ispitanika, a nakon digestije odgovarajućim restrikcionim enzimima u grupi bolesnika uspešno su sa agaroznog gela očitani genotipovi kod 198 uzoraka za *GSTO1*, dok je genotipizacija za *GSTO2* bila uspešna kod 191 bolesnika.

U kontrolnoj grupi genotipizacija za *GSTO1* je uspela kod 198 uzoraka, a za *GSTO2* kod 196 uzoraka.

Dobijeni rezultati distribucije učestalosti *GSTO1* i *GSTO2* genotipova kod kontrolne grupe i bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću, kao i povezanost sa rizikom za nastanak terminalne slabosti bubrega prikazani su na Tabeli 10.

Iz prikazanih rezultata distribucije frekvencije *GSTO1* genotipova uočava se da u kontrolnoj grupi genotip *CC* ima 33% osoba, *CA* ima 59%, dok 8% osoba ima *AA GSTO1* genotip. Dobijena distribucija odgovara očekivanoj distribuciji učestalosti varijantnih *GSTO1* genotipova kod bele rase. U grupi bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega distribucija učestalosti je nešto drugačija, tako da genotip *CC* ima 41% bolesnika, *CA* ima 47%, i 12% bolesnika ima *AA GSTO1* genotip. Međutim, statističkom obradom je utvrđeno da razlika u distribuciji učestalosti *GSTO1* genotipova između bolesnika i kontrolne grupe nije statistički značajna ($p=0,110$).

Tabela 10. Distribucija učestalosti *GSTO1* i *GSTO2* genotipova i rizik za nastanak terminalne bubrežne slabosti

GST genotip	Kontrole n (%)	Bolesnici n (%)	OR (95% IP)	p
<i>GSTO1</i>				
CC	65 (33)	81 (41)	1,00 ^a	
CA	117 (59)	94 (47)	0,69 (0,45-1,07)	0,098
AA	16 (8)	23 (12)	1,24 (0,60-2,58)	0,561
				p= 0,110
<i>GSTO2</i>				
AA	82 (42)	66 (34)	1,00 ^a	
AG	100 (51)	97 (51)	1,19 (0,77-1,85)	0,427
GG	14 (7)	28 (15)	2,45 (1,18-5,07)	0,016
				p=0,046*

n- broj učesnika; ^a referentna grupa; p- u odnosu na referentnu grupu; * -statistički značajna razlika;

OR –eng. *odds ratio* (odnos šansi); IP-interval poverenja; kontrolisano u odnosu na pol i godine.

CC (*Ala/Ala*)-referentni genotip *GSTO1*

CA (*Ala/Asp*)- heterozigotni varijantni genotip *GSTO1*

AA (*Asp/Asp*)- homozigotni varijantni genotip *GSTO1*

AA (*Asn/Asn*)-referentni genotip *GSTO2*

AG (*Asn/Asp*)- heterozigotni varijantni genotip *GSTO2*

GG (*Asp/Asp*)- homozigotni varijantni genotip *GSTO2*

Posmatrajući distribuciju učestalosti *GSTO2* genotipova u kontrolnoj grupi može se primetiti da 42% osoba poseduje AA genotip, 51% AG i 7% genotip GG, što odgovara učestalosti distribucije *GSTO2* genotipova u populaciji bele rase. I kod *GSTO2* genotipova distribucija učestalosti u grupi bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega se razlikuje od kontrolne grupe. Naime, učestalost genotipova AA u grupi bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću je nešto manja u odnosu na kontrolnu grupu (34% vs 42%), dok je učestalost AG genotipova 51% kao i kod kontrolne grupe, a učestalost GG genotipova u studijskoj grupi (15%) je veća u odnosu na kontrolnu grupu (7%). Statistička obrada ovih rezultata je pokazala da je ova razlika statistički značajna (p=0,046).

Nakon što je utvrđena različita distribucija učestalosti genotipova GST klase omega kod bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu, ispitivana je povezanost različitih genotipova sa rizikom za nastanak terminalne slabosti bubrega. Pri ispitivanju uticaja varijantnog *GSTO1* gena rezultati su pokazali da je rizik za nastanak terminalne bubrežne slabosti kod nosioca *AA* genotipa oko 1,24 puta veći u odnosu na osobe sa referentnim genotipom. Međutim ta povezanost nije dostigla statističku značajnost (OR=1,24; 95% IP=0,60-2,51; p=0,561), kao ni povezanost kod nosioca *CA* genotipova *GSTO1* (OR=0,69; 95% IP=0,45-1,07; p=0,098). Na osnovu toga možemo zaključiti da polimorfizam *GSTO1* gena nema statistički značajan modifikujući uticaj na nastanak terminalne bubrežne slabosti.

Pored toga, analizirano je i da li polimorfizam *GSTO2* gena doprinosi razvoju terminalne bubrežne slabosti. Pokazano je da ispitanici sa *GSTO2 AG* genotipom imaju 1,19 puta veći rizik za nastanak terminalne bubrežne slabosti u odnosu na osobe sa *GSTO2 AA* genotipom, ali bez statističke značajnosti (OR=1,19; 95% IP=0,77-1,85; p=0,427). Međutim, homozigotni nosioci varijantnog alela *GSTO2* gena (*GG* genotip) imaju oko 2,5 puta veći rizik za nastanak terminalne bubrežne slabosti u odnosu na nosioce referentnog *GSTO2 AA* genotipa, što je i statistički značajno (OR=2,45; 95% IP=1,18 – 5,07; p=0,016).

4.2.1. Distribucija haplotipova glutation transferaza klase omega i terminalna bubrežna slabost

Kako se geni za *GSTO1* i *GSTO2* nalaze na istom hromozomu i međusobno su udaljeni samo 7,5 kb ispitivali smo i učestalost haplotipova ovih gena, odnosno kombinaciju alela na jednom hromozomu i povezanost sa terminalnom bubrežnom slabošću.

Rezultati haplotip analize za *GSTO1* i *GSTO2* polimorfizam kod bolesnika sa TBS prikazani su na Tabeli 11.

Tabela 11. Učestalost haplotipova u kontrolnoj grupi i kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Haplotip		učestalost haplotip kombinacije (%)			
<i>GSTO1</i>	<i>GSTO2</i>	Kontrole	Bolesnici	OR (95% IP)	p
<i>C</i> ^a	<i>A</i> ^c	45,5	55,1	1,00 ^e	
<i>A</i> ^b	<i>G</i> ^d	15,9	30,6	1,47 (0,97-2,23)	0,071
<i>C</i>	<i>G</i>	16,7	9,6	0,62 (0,38-1,03)	0,068
<i>A</i>	<i>A</i>	21,9	4,7	0,23 (0,12-0,44)	0,001*

^a *C* (*Ala*)-referentni alel *GSTO1*; ^b *A* (*Asp*)- varijantni alel *GSTO1*

^c *A* (*Asn*)-referentni alel *GSTO2*; ^d *G* (*Asp*)- varijantni alel *GSTO2*

OR –eng. *odds ratio* (odnos šansi); IP-interval poverenja;

^ereferentna grupa;

p- u odnosu na referentnu grupu;

* -statistički značajna razlika;

Iz rezultata prikazanih na Tabeli 11 vidi se da je najrasprostranjeniji haplotip kod bolesnika sa TBS (55,1%) i osoba unutar kontrolne grupe (45,5%) bio *GSTO1*(**C*) i *GSTO2*(**A*). Pored toga, dobijeni rezultati su pokazali da haplotip kombinacija jedne kopije varijantniog *GSTO1*(**A*) i jedne kopije referentnog *GSTO2*(**A*) alela ima zaštitnu ulogu za nastanak terminalne slabosti bubrega (OR=0,23; 95% IP=0,12-0,44; p=0,001).

4.3. POVEZANOST POKAZATELJA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA I POLIMORFIZAMA *GSTO1* I *GSTO2* GENA U TERMINALNOJ BUBREŽNOJ SLABOSTI

4.3.1. Povezanost sadržaja tiol grupa i *GSTO1* i *GSTO2* genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Rezultati određivanja proteinskih tiol grupa, jednog od pokazatelja oksidativnog oštećenja proteina, i povezanost sa genotipom bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću prikazani su na Tabeli 12 i Grafikonima 3a i 3b.

Tabela 12. Povezanost sadržaja tiol grupa i *GSTO1* i *GSTO2* genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Tiol grupe ($\mu\text{mol/g}$ proteina)	<i>GSTO1</i> genotip			
	CC	CA	AA	p
	6,52 (3,59-10,91)	6,02 (3,27-10,90)	6,94 (3,32-10,64)	0,231
	<i>GSTO2</i> genotip			
	AA	AG	GG	p
	6,77 (3,76-9,87)	5,73 (3,59-10,90)	7,36 (3,27-10,91)	0,005*

vrednosti su izražene kao medijana, min i max vrednost; * -statistički značajna razlika

CC (*Ala/Ala*)-referentni genotip *GSTO1*

CA (*Ala/Asp*)- heterozigotni varijantni genotip *GSTO1*

AA (*Asp/Asp*)- homozigotni varijantni genotip *GSTO1*

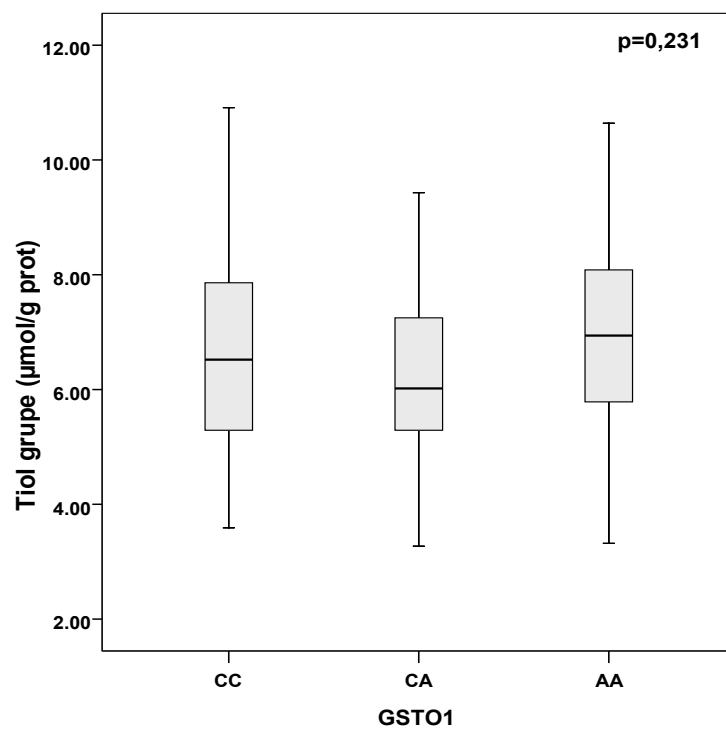
AA (*Asn/Asn*)-referentni genotip *GSTO2*

AG (*Asn/Asp*)- heterozigotni varijantni genotip *GSTO2*

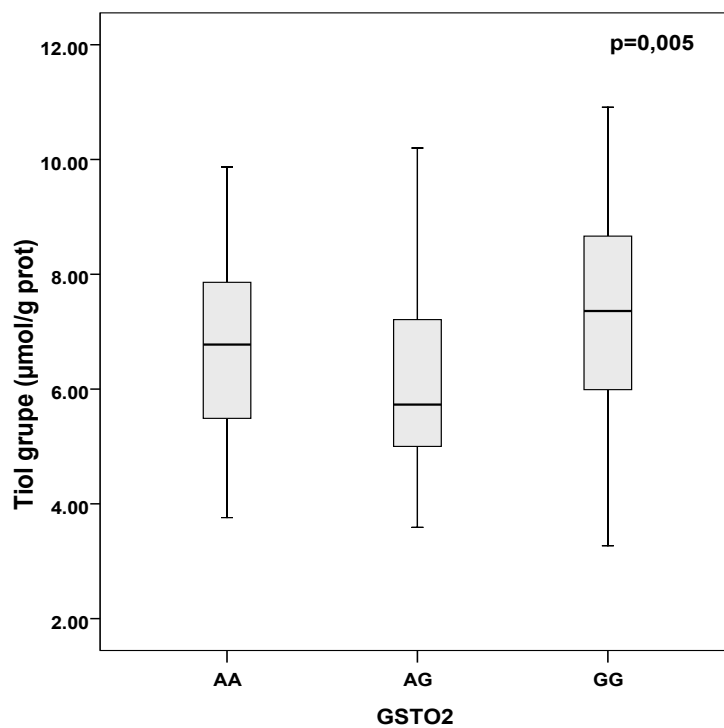
GG (*Asp/Asp*)- homozigotni varijantni genotip *GSTO2*

Iz rezultata prikazanih na Tabeli 12 i Grafikonu 3a se vidi da sadržaj proteinskih tiol grupa kod različitih genotipova *GSTO1* nije bitno izmenjen. Najveća koncentracija tiol grupa je izmerena kod bolesnika sa AA genotipom ali to povećanje u odnosu na druge genotipove nije statistički značajno. Prikazani su i rezultati povezanosti sadržaja proteinskih tiol grupa i različitih *GSTO2* genotipova, koji pokazuju da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji tiol grupa između različitih *GSTO2* genotipova, a da je najveća koncentracija kod bolesnika koji su nosioci homozigotnih varijantnih alela *GSTO2* gena.

3a)



3b)



Grafikon 3a. Povezanost sadržaja tiol grupa i GSTO1 genotipa kod bolesnika sa TBS
3b. Povezanost sadržaja tiol grupa i GSTO2 genotipa kod bolesnika sa TBS

4.3.2. Povezanost sadržaja karbonilnih grupa i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Kao markeri oksidativnog oštećenja proteina najčešće se koriste karbonilne grupe, a rezultati dobijeni kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću su prikazani na Tabeli 13. i Grafikonima 4a. i 4b.

Tabela 13. Povezanost sadržaja karbonilnih grupa i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Karbonilne grupe (nmol/mg proteina)	GSTO1 genotip			
	CC	CA	AA	p
	2,25 (1,62-3,49)	2,26 (1,63-3,74)	2,13 (1,54-2,92)	0,570
	GSTO2 genotip			
	AA	AG	GG	p
	2,28 (1,62-2,77)	2,23 (1,54-3,74)	2,20 (1,82-2,92)	0,940

vrednosti su izražene kao medijana, min i max vrednost;

* -statistički značajna razlika.

CC (Ala/Ala)-referentni genotip GSTO1

CA (Ala/Asp)- heterozigotni varijantni genotip GSTO1

AA (Asp/Asp)- homozigotni varijantni genotip GSTO1

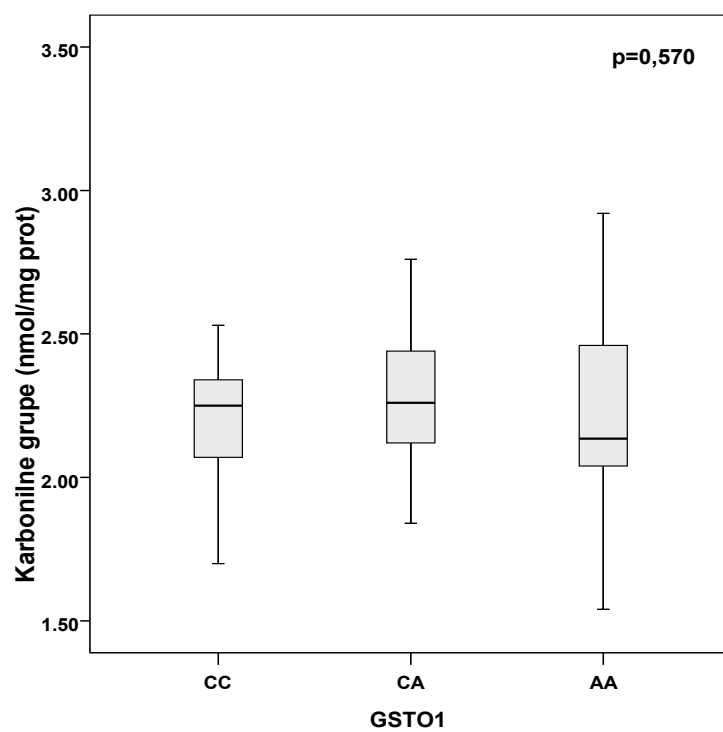
AA (Asn/Asn)-referentni genotip GSTO2

AG (Asn/Asp)- heterozigotni varijantni genotip GSTO2

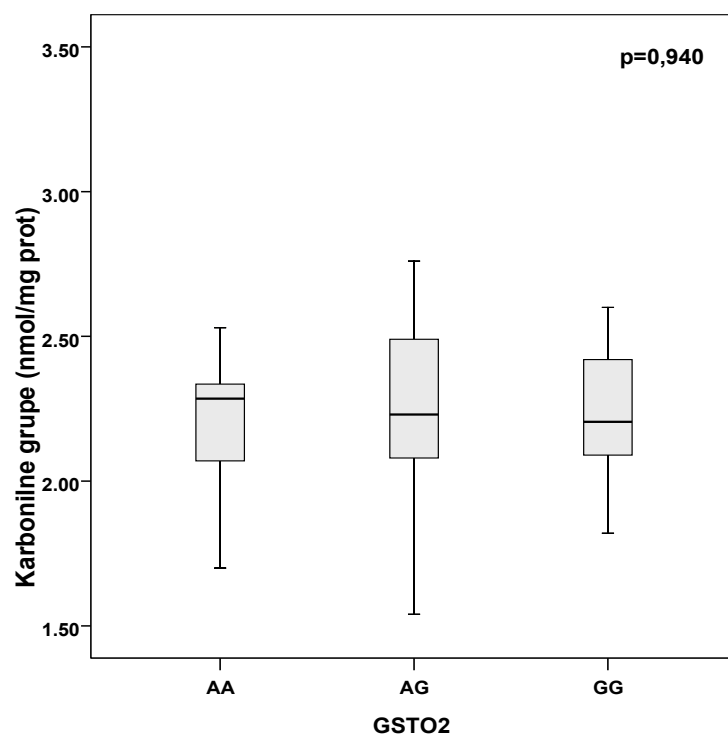
GG (Asp/Asp)- homozigotni varijantni genotip GSTO2

Iz rezultata prikazanih na Tabeli 13. i Grafikonima 4a. i 4b. se vidi da je sadržaj karbonilnih grupa najniži kod varijantnih genotipova GSTO1 (AA) i GSTO2 (GG), ali da nema statistički značajne povezanosti genotipova i nivoa karbonilnih grupa kod bolesnika sa TBS.

4a)



4b)



Grafikon 4a. Povezanost sadržaja karbonilnih grupa i GSTO1 genotipa kod bolesnika sa TBS
4b. Povezanost sadržaja karbonilnih grupa i GSTO2 genotipa kod bolesnika sa TBS

4.3.3. Povezanost koncentracije nitrotirozina i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Kako u uslovima povećanog stvaranja NO dolazi do nitrovanja slobodnog tirozina i do povećanja količine nitrozilovanog tirozina, kao pokazatelj nivoa oksidativnog stresa određivana je i koncentracija nitrotirozina. Ispitivana je povezanost koncentracije nitrotirozina sa različitim genotipom *GSTO1* i *GSTO2* kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću, a dobijeni rezultati su prikazani na Tabeli 14 i Grafikonima 5a. i 5b.

Tabela 14. Povezanost koncentracije nitrotirozina i *GSTO1* i *GSTO2* genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Nitrotirozin (nmol/L)	GSTO1 genotip			
	CC	CA	AA	p
	59,31 (25,60-182,30)	66,50 (26,39-234,57)	78,67 (27,84-154,10)	0,254
	GSTO2 genotip			
	AA	AG	GG	p
	59,31 (25,60-198,28)	66,50 (27,24-234,57)	75,50 (27,84-154,10)	0,324

vrednosti su izražene kao medijana, min i max vrednost;

* -statistički značajna razlika.

CC (*Ala/Ala*)-referentni genotip *GSTO1*

CA (*Ala/Asp*)- heterozigotni varijantni genotip *GSTO1*

AA (*Asp/Asp*)- homozigotni varijantni genotip *GSTO1*

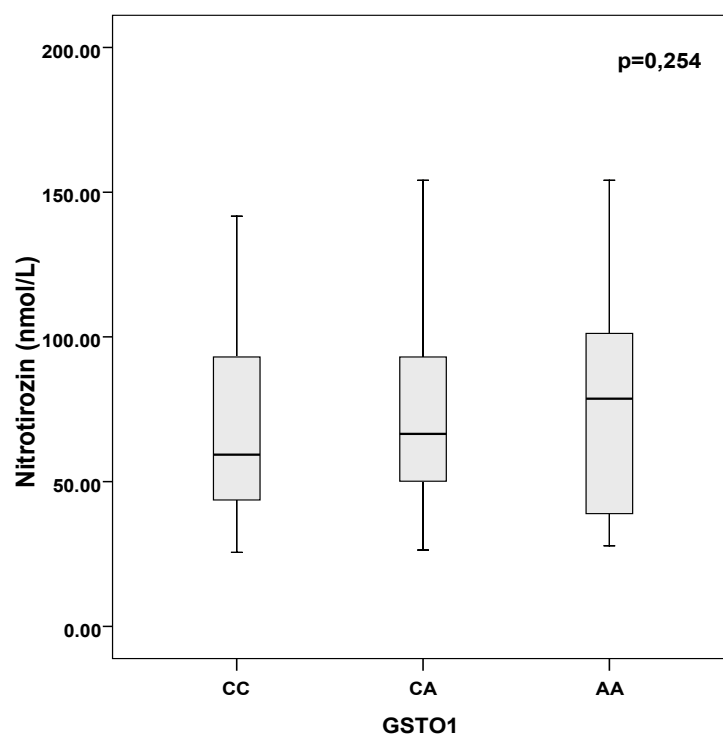
AA (*Asn/Asn*)-referentni genotip *GSTO2*

AG (*Asn/Asp*)- heterozigotni varijantni genotip *GSTO2*

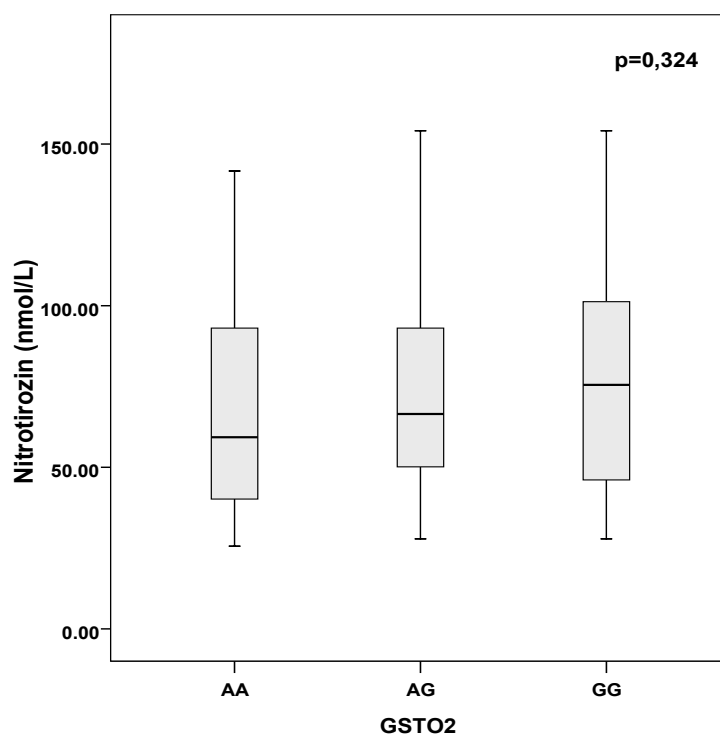
GG (*Asp/Asp*)- homozigotni varijantni genotip *GSTO2*

Iz rezultata prikazanih na Tabeli 14. i Grafikonima 5a. i 5b. se vidi da se koncentracija nitrotirozina povećava kod varijantnih genotipova *GSTO1*(AA) i *GSTO2* (GG) u odnosu na referentne genotipove, ali da to povećanje nije dostiglo statističku značajnost.

5a)



5b)



Grafikon 5a. Povezanost koncentracije nitrotirozina i GSTO1 genotipa kod bolesnika sa TBS
5b. Povezanost koncentracije nitrotirozina i GSTO2 genotipa kod bolesnika sa TBS

4.3.4. Povezanost sadržaja malondialdehida i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Pored određivanja pokazatelja oksidativnog oštećenja proteina određivani su i pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida. Produkti lipidne peroksidacije imaju dug poluživot, veoma su reaktivni pa je njihovo merenje u širokoj upotrebi, a najčešće se određuje koncentracija malondialdehida (MDA). Rezultati dobijeni kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću su prikazani na Tabeli 15 i Grafikonima 6a. i 6b.

Tabela 15. Povezanost koncentracije MDA i GSTO1 i GSTO2 genotipova kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

MDA (mmol/L)	GSTO1 genotip			
	CC	CA	AA	p
	2,25 (0,46-15,19)	2,27 (0,68-5,68)	2,33 (0,51-3,89)	0,472
	GSTO2 genotip			
	AA	AG	GG	p
	2,45 (0,46-15,19)	2,22 (0,52-5,06)	1,99 (0,51-3,87)	0,041*

vrednosti su izražene kao medijana, min i max vrednost;

* -statistički značajna razlika.

CC (Ala/Ala)-referentni genotip GSTO1

CA (Ala/Asp)- heterozigotni varijantni genotip GSTO1

AA (Asp/Asp)- homozigotni varijantni genotip GSTO1

AA (Asn/Asn)-referentni genotip GSTO2

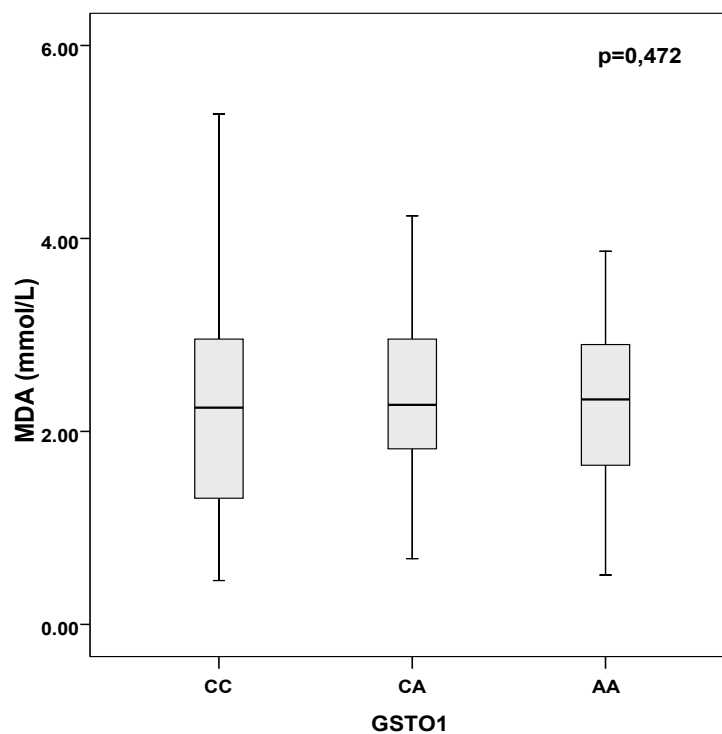
AG (Asn/Asp)- heterozigotni varijantni genotip GSTO2

GG (Asp/Asp)- homozigotni varijantni genotip GSTO2

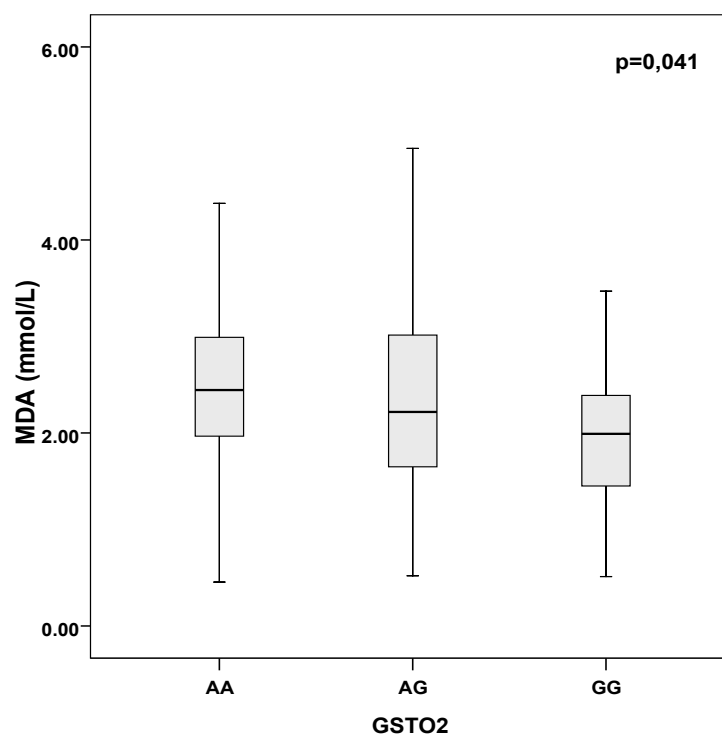
Iz rezultata prikazanih na Tabeli 15 i Grafikonu 6a. se vidi da je koncentracija MDA najniža kod referentnog GSTO1 genotipa, ali da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji MDA kod različitih varijanti gena za GSTO1.

Na Grafikonu 6b. je prikazana koncentracija MDA kod različitih varijanti gena za GSTO2, gde se uočava da varijantne genske varijante GSTO2 imaju niže koncentracije MDA u odnosu na referentni genotip i da je ta razlika statistički značajna.

6a)



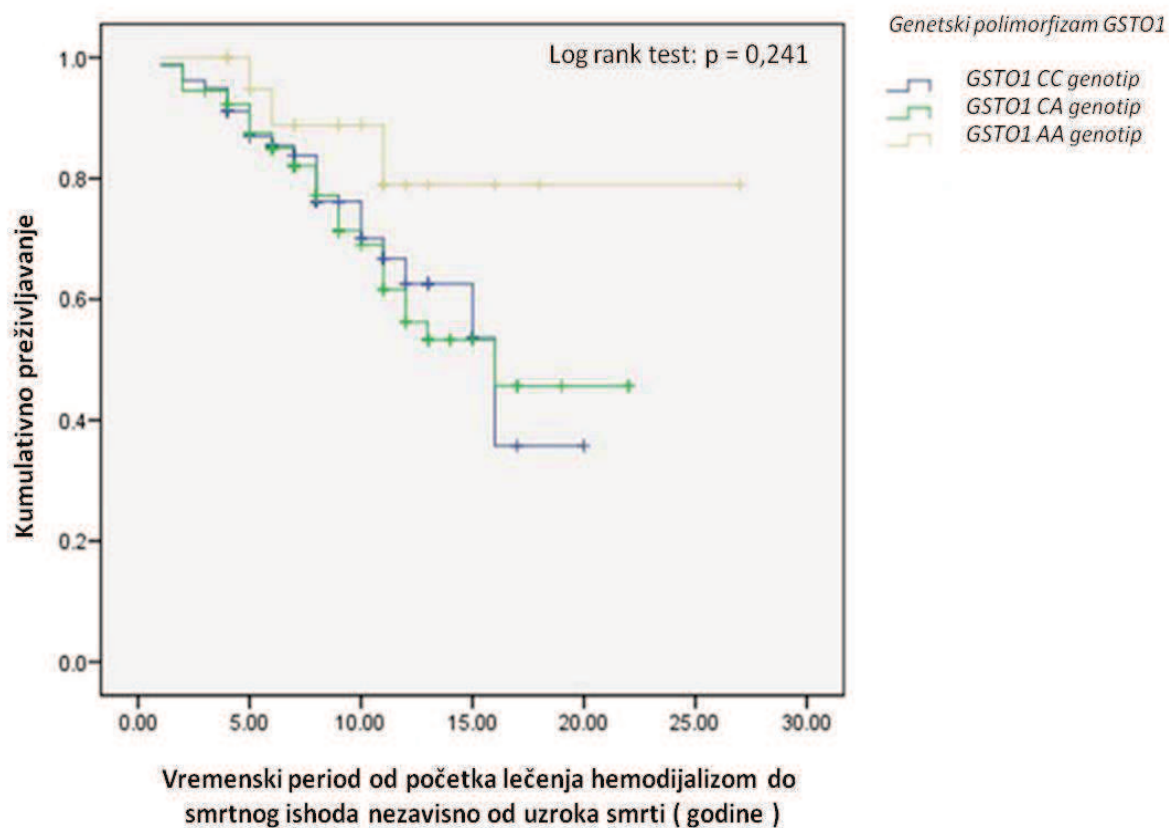
6b)



Grafikon 6a. Povezanost koncentracije MDA i GSTO1 genotipa kod bolesnika sa TBS
6b. Povezanost koncentracije MDA i GSTO2 genotipa kod bolesnika sa TBS

4.4. UTICAJ GENSKOG POLIMORFIZMA GLUTATION TRANSFERAZA KLASSE OMEGA NA PROGNOZU KOD BOLESNIKA SA TERMINALNOM SLABOŠĆU BUBREGA

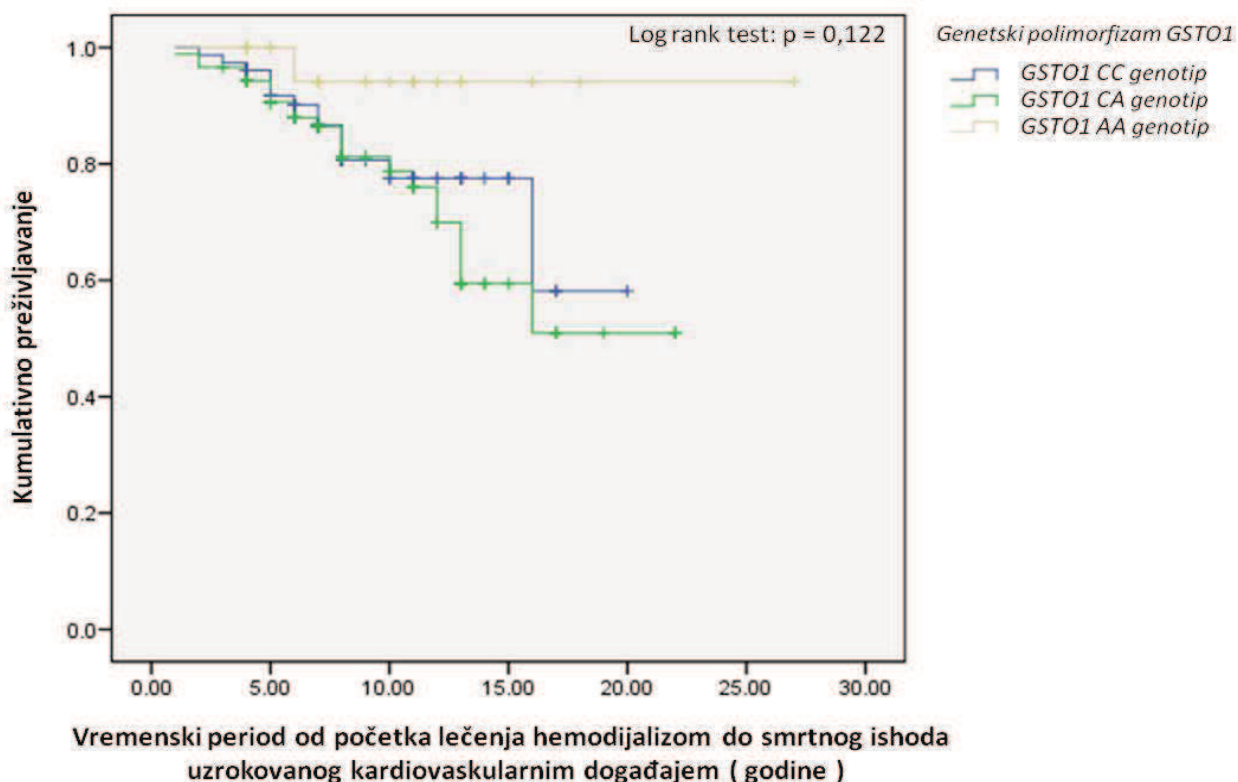
Da bi se procenio uticaj genetskih polimorfizama GST klase omega na terminalnu bubrežnu slabost sprovedena je *case only* studija. Analizirana je povezanost genetskog polimorfizma i dužine vremenskog perioda koji je protekao od započinjanja lečenja hemodijalizom do nastupanja smrtnog ishoda. Vreme proteklo od započinjanja lečenja hemodijalizom do nastupanja smrtnog ishoda ili kraja praćenja kretalo se od 1 do 27 godina, a srednja vrednost je iznosila $6,3 \pm 4,5$ godina. Na osnovu podataka o uzroku smrti izvedena je analiza preživljavanja kako u odnosu na opštu, tako i u odnosu na kardiovaskularnu smrtnost.



Grafikon 7. Kaplan-Meier krive preživljavanja: kumulativno preživljavanje bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega od početka lečenja dijalizom do nastupanja ukupnog smrtnog ishoda u zavisnosti od *GSTO1* genotipova

Na Grafikonu 7. je prikazano kumulativno preživljavanje bolesnika sa TBS i zavisnost od *GSTO1* genotipova. Srednje vreme preživljavanja kod bolesnika nosioca referentnog genotipa (CC) je bilo 14,1 godina, dok je to vreme kod nosioca heterozigotnog varijantnog genotipa (CA) iznosilo 15,0 godina, a kod nosioca homozigotnog varijantnog genotipa (AA) je bilo 23 godine. *Kaplan-Meier* procena funkcije preživljavanja je pokazala da je dužina ukupnog preživljavanja kod bolesnika nakon započinjanja dijalize, kraća kod nosilaca najmanje jednog *GSTO1* referentnog alela u odnosu na nosioce homozigotnog varijantnog *GSTO1* AA genotipa, ali da nema statističke značajnosti (log rank test 2.844 p =0.241).

Rezultati praćenja nastupanja smrtnog ishoda usled kardiovaskularnog događaja i povezanost sa *GSTO1* genotipom kod bolesnika sa TBS su prikazani na Grafikonu 8.



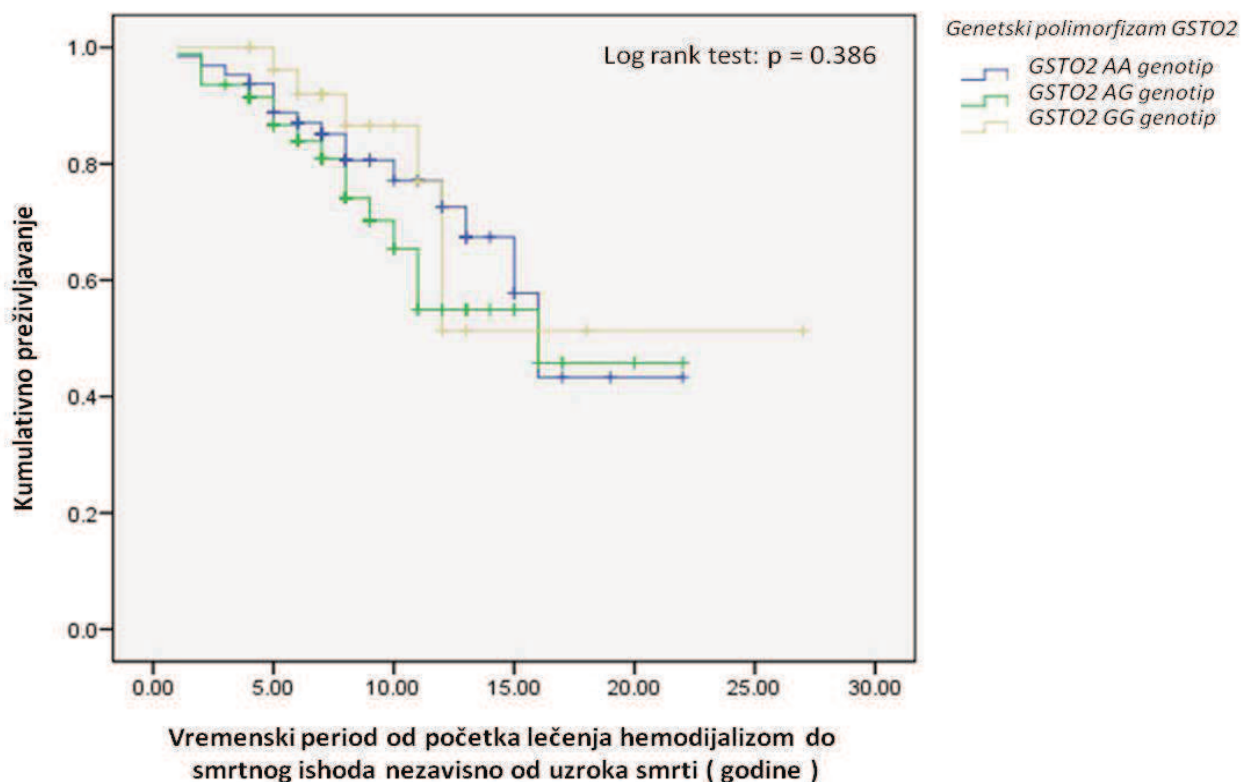
Grafikon 8. *Kaplan-Meierove* krive preživljavanja: kumulativno preživljavanje bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega od početka lečenja dijalizom do nastupanja smrtnog ishoda usled kardiovaskularnog događaja u zavisnosti od *GSTO1* genotipova

Srednje vreme do nastupanja smrtnog ishoda usled kardiovaskularnog događaja kod bolesnika nosioca referentnog genotipa GSTO1 (CC) bilo je 16,19 godina, kod nosioca heterozigotnog varijantnog genotipa (CA) iznosilo 16,22 godina, a kod nosioca homozigotnog varijantnog genotipa (AA) je bilo 25,8 godine. *Kaplan-Meier* analiza je pokazala da je vremenski period od započinjanja dijalize do nastupanja smrtnog ishoda usled kardiovaskularnog događaja takođe kraći kod nosilaca najmanje jednog *GSTO1* referentnog alela u odnosu na homozigotni varijantni *GSTO1* AA genotip. Međutim, statističkom analizom nije dobijena statistička značajnost (Log Rank=4.211, p=0.122, Grafikon 9).

Pored uticaja polimorfizma *GSTO1* u našoj studiji je određivan i uticaj polimorfizma *GSTO2* gena na dužinu ukupnog preživljavanja kao i dužinu kardiovaskularnog preživljavanja bolesnika sa TBS nakon započinjanja dijalize.

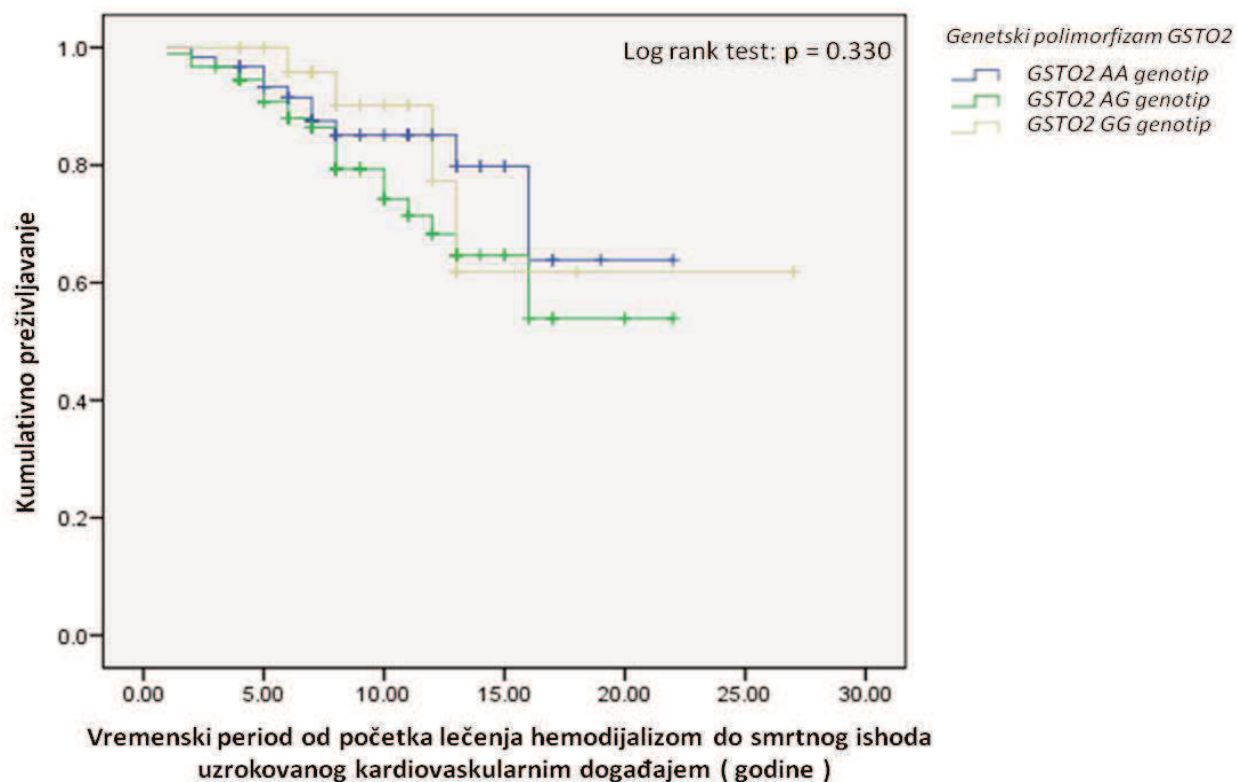
Srednje vreme ukupnog preživljavanja kod bolesnika nosioca referentnog GSTO2 AA genotipa je bilo 15,9 godina, dok je to vreme kod nosioca heterozigotnog varijantnog genotipa (AG) iznosilo 14,9 godina, a kod nosioca homozigotnog varijantnog genotipa (GG) je bilo 18,9 godina. Praćenjem kardiovaskularnog preživljavanja utvrđeno je da su nosioci GSTO2 referentnog genotipa imali srednje vreme preživljavanja 18,1 a nosioci heterozigotnog varijantnog genotipa AG 16,4 godina, odnosno nosioci homozigotnog varijantnog GG genotipa 20,9 godina.

Rezultati za ukupno preživljavanje bolesnika sa TBS u zavisnosti od polimorfizma GSTO2 gena prikazani su na Grafikonu 9. odnosno za kardiovaskularno preživljavanje na Grafikonu 10.



Grafikon 9. Kaplan-Meierove krive preživljavanja: kumulativno preživljavanje bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega od početka lečenja dijalizom do nastupanja ukupnog smrtnog ishoda u zavisnosti od *GSTO2* genotipova

Kao što je prikazano na Grafikonima 9. i 10. kod ispitivanja povezanosti polimorfizma gena *GSTO2* i preživljavanja bolesnika sa TBS utvrđeno je da ne postoji povezanost između genskih varijacija i ukupnog (Log Rank=1.901, $p=0.386$, grafikon 9) odnosno kardiovaskularnog mortaliteta (Log Rank=2.219, $p=0.330$ grafikon 10).



Grafikon 10. *Kaplan-Meierove* krive preživljavanja: kumulativno preživljavanje bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega od početka lečenja dijalizom do nastupanja smrtnog ishoda usled kardiovaskularnog događaja u zavisnosti od *GSTO2* genotipova

Prediktivna uloga različitih *GSTO* genotipova u ukupnom i kardiovaskularnom mortalitetu ispitivana je zatim Koks regresionim modelom, pri čemu je model jedan uključivao faktore starost i pol, model dva je obuhvatio kovarijable modela 1 uz dodatak statusa pušenja, dok je model tri uključivao sve kovarijable modela 1 i 2 kao i faktore rizika dijabetes i status holesterola.

Na Tabeli 16. su predstavljeni rezultati analize polimorfizma gena za *GSTO1* kao prediktora za ukupni, odnosno kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću.

Tabela 16. *GSTO1* polimorfizam kao prediktor ukupnog i kardiovaskularnog mortaliteta kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega

GSTO1 genoti p	Model 1 ^a		Model 2 ^b		Model 3 ^c	
	HR (95% IP)	<i>p</i>	HR (95% IP)	<i>p</i>	HR (95% IP)	<i>p</i>
	Rizik za ukupan mortalitet kod različitih varijanti gena za GSTO1					
C/C	1,00*	0,19	1,00	0,17	1,00	0,30
C/A	1,28 (0,65-2,52)		1,39 (0,70-2,76)		1,24 (0,55-2,79)	
A/A	0,43 (0,11-1,61)		0,45 (0,12-1,73)		0,43 (0,10-1,80)	
	Rizik za kardiovaskularni mortalitet kod različitih varijanti gena za GSTO1					
C/C	1,00	0,052	1,00	0,04	1,00	0,036**
C/A	1,60 (0,74-3,46)		1,64 (0,76-3,55)		1,86 (0,73-4,70)	
A/A	0,23 (0,03-1,88)		0,22 (0,03-1,78)		0,20 (0,02-1,84)	

*referentna grupa

^a kontrolisano u odnosu na pol i godine

^b kontrolisano u odnosu na kovarijante u modelu 1 plus kontrolisano u odnosu na status pušenja

^c kontrolisano u odnosu na kovarijante u modelu 2 plus kontrolisano u odnosu na dijabetes, nivo triglicerida, HDL i ukupnog holesterola.

HR- *hazard ratio*;

IP-interval poverenja

** -statistički značajna razlika

Prikazani rezultati pokazuju da nijedna od *GSTO1* genskih varijanti nije prediktor ukupnog mortaliteta u sva tri testirana modela.

Rezultati dobijeni pri analizi rizika za kardiovaskularni mortalitet kod različitih varijanti gena za *GSTO1* ukazuju da je *GSTO1* polimorfizam prediktor povećanog rizika kardiovaskularnog mortaliteta kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću u sva tri modela (p=0,052; p=0,04; p=0,036, respektivno).

Rezultati dobijeni pri ispitivanju prediktorne uloge polimorfizma *GSTO2* gena za ukupni i kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću su prikazani na Tabeli 17.

Tabela 17. *GSTO2* polimorfizam kao prediktor ukupnog i kardiovaskularnog mortaliteta kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega

GSTO2 genotip	Model 1 ^a		Model 2 ^b		Model 3 ^c	
	HR (95% IP)	<i>p</i>	HR (95% IP)	<i>p</i>	HR (95% IP)	<i>p</i>
	Rizik za ukupan mortalitet kod različitih varijanti gena za GSTO2					
A/A	1,00*	0,43	1,00	0,32	1,00	0,26
A/G	1,41 (0,68-2,93)		1,59 (0,75-3,36)		1,73 (0,69-4,31)	
G/G	0,79 (0,27-2,35)		0,86 (0,29-2,60)		0,74 (0,21-2,66)	
	Rizik za kardiovaskularni mortalitet kod različitih varijanti gena za GSTO2					
A/A	1,00	0,36	1,00	0,36	1,00	0,092
A/G	1,62 (0,69-3,78)		1,59 (0,68-3,74)		2,70 (0,87-8,39)	
G/G	0,83 (0,23-3,00)		0,79 (0,22-2,87)		0,87 (0,18-4,23)	

*referentna grupa

^a kontrolisano u odnosu na pol i godine

^b kontrolisano u odnosu na kovarijante u modelu 1 plus kontrolisano u odnosu na status pušenja

^c kontrolisano u odnosu na kovarijante u modelu 2 plus kontrolisano u odnosu na dijabetes, nivo triglicerida, HDL i ukupnog holesterola.

HR- *hazard ratio*;

IP-interval poverenja

* -statistički značajna razlika

Ispitivanja *GSTO2* polimorfizma u navedenim modelima su pokazala da nijedna varijanta *GSTO2* gena nije prediktor ni za ukupni, niti za kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću.

Analiza povezanosti haplotipova *GSTO1* i *GSTO2* sa rizikom za ukupni i kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću je prikazana na Tabeli 18.

Tabela 18. Povezanost haplotipa *GSTO1* i *GSTO2* sa rizikom za ukupni i kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću

Haplotip		učestalost haplotip kombinacije(%)		OR (95% IP)	<i>p</i>
<i>GST01</i>	<i>GST02</i>	živi	preminuli		
Povezanost haplotipa sa rizikom za ukupni mortalitet kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću					
<i>C</i>	<i>A</i>	53,7	58,5	1 ^a	<i>p</i> =0,077
<i>A</i>	<i>G</i>	30,3	31,6	0,97 (0,52-1,80)	
<i>C</i>	<i>G</i>	9,9	8,8	0,79 (0,32-1,92)	
<i>A</i>	<i>A</i>	6,1	1,1	0,00 (0,00 –NA)	
Povezanost haplotipa sa rizikom za kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću					
<i>C</i>	<i>A</i>	54,2	57,1	1	<i>p</i> =0,260
<i>A</i>	<i>G</i>	30,2	31,3	1,01 (0,50-2,02)	
<i>C</i>	<i>G</i>	10,0	10,0	1,00 (0,36-2,77)	
<i>A</i>	<i>A</i>	5,6	1,6	0,00 (0,00 –NA)	

^areferentna grupa

kontrolisano u odnosu na pol i godine

OR- *odds ratio*;

IP-interval poverenja

Iz rezultata prikazanih na Tabeli 18. uočava se da ne postoje statistički značajna udruživanja u slučaju ukupnog mortaliteta ($p=0,077$), odnosno kardiovaskularnog mortaliteta ($p= 0,260$),

5. DISKUSIJA

U poslednjoj deceniji zabeležen je značajan porast broja bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega koji zahtevaju lečenje nekom od metoda za zamenu funkcije bubrega, što predstavlja veliki zdravstveni problem u svetu (5). Poslednjih godina se velika pažnja posvećuje oksidativnom stresu, hroničnoj inflamaciji i endotelnoj disfunkciji koji leže u osnovi različitih, ali međusobno povezanih patoloških stanja, kao što su kardiovaskularna oboljenja, dijabetes, gojaznost, hronična slabost bubrega (124). Pacijenti sa hroničnom bubrežnom slabošću predstavljaju posebnu grupu bolesnika sa velikom izloženošću egzogenim štetnim jedinjenjima, kao i prirodno prisutnim endogenim jedinjenjima, jer ovi bolesnici akumuliraju krajnje produkte metaboličkih reakcija (124). Brojne studije su pokazale da je kod bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega narušena ravnoteža između prooksidanata i antioksidantne aktivnosti (125,126). Neravnoteža između stvorenih reaktivnih vrsta kiseonika i kapaciteta antioksidantnog sistema je prisutna još u početnim fazama bolesti bubrega i ima važnu ulogu kako u nastanku, tako i u progresiji bubrežne bolesti (102).

Terminalna bubrežna slabost (TBS) je stanje koje karakteriše oksidativni stres, što pokazuje povećan stepen oksidativnog oštećenja biološki važnih makromolekula u korelaciji sa nivoom bubrežne disfunkcije (127). Indirektnu potvrdu da oksidativni stres ima važnu ulogu u nastanku i progresiji bolesti bubrega dale su studije koje su pokazale da sekundarna prevencija kod bolesnika na hemodijalizi sa visokim dozama vitamina E značajno smanjuje pojavu kardiovaskularnog događaja kod ovih bolesnika (128). Pored toga, studija koja je pokazala da upotreba antioksidanta, oralnog acetilcisteina kod bolesnika na hemodijalizi ima kao rezultat manju učestalost javljanja ishemijskog moždanog udara, infarkta miokarda i kardiovaskularne smrtnosti, ukazuje da oksidativni stres značajno utiče na kardiovaskularne komplikacije kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom bolešću (129).

Interakcije između oksidativnog stresa, zapaljenja, udruženih bolesti i oštećenja bubrežne funkcije čine da je teško razlučiti koji proces je odgovoran za pokretanje niza

procesa koji vode do terminalne bubrežne slabosti (130,131). Štaviše, oksidativni stres i zapaljenje su primarni razlozi zbog kojih je čest komorbiditet hronične bolesti bubrega sa oboljenjima kao što su hipertenzija (132), dijabetes (133) i kardiovaskularne bolesti (134), pri čemu se nužno prepliću i progresija jedne bolesti dovodi do razvoja ili progresije drugog oboljenja.

Oboljenja koja neposredno pokreću bubrežne bolesti su najčešće dijabetes, hipertenzija, kardiovaskularna oboljenja, autoimune bolesti, sistemske bolesti, nefrolitijaza, infekcija i opstrukcija mokraćnih puteva, neoplazme, nefrotoksični lekovi i hemikalije (130). U našoj studiji kod najvećeg broja bolesnika (47%) uzrok nastanka terminalne bubrežne slabosti je bila hipertenzivna nefroskleroza, kao drugi značajan uzrok javlja se glomerulonefritis (16%), a na trećem mestu je dijabetesna nefropatija (13%), što je na nivou epidemioloških podataka o bolesnicima na hemodijalizi u našoj zemlji (6). U zapadnoj Evropi i SAD u poslednjoj deceniji je došlo do dramatičnog porasta broja bolesnika sa dijabetesnom nefropatijom, pa je ovo postao jedan od vodećih uzroka nastanka terminalne bubrežne slabosti i razvija se kod oko 40% bolesnika sa dijabetesom, a potom kao uzroci slede hipertenzija i glomerulonefritis (10).

Ranija istraživanja su pokazala da u progresiji bubrežne slabosti značajnu ulogu mogu imati enzimi sinteze i regeneracije glutaciona, kao i antioksidantni enzimi (114). Ključnu ulogu u reakcijama zaštite od slobodnih radikala kao i reakcijama detoksikacije imaju citosolne glutation transferaze (GST). Poslednjih godina posebnu pažnju privlači omega klasa glutation transferaza, koju kod čoveka čine dva dimerna proteina, GSTO1 i GSTO2, koje kodiraju *GSTO1* i *GSTO2* geni. GST izoenzimi klase omega iako pripadaju ovoj superfamiliji, nemaju zajedničke supstrate sa ostalim GST klasama, već katališu nekoliko reakcija koje nisu tipične za ostale GST. Prisustvo funkcionalne grupe cisteina u aktivnom mestu objašnjava čitav spektar specifičnih aktivnosti ove klase, kao što su tiol-transferazna, dehidroaskorbat-reduktazna i monometilarsonat reduktazna katalitička aktivnost (76). Smatra se da je GSTO2 enzim sa najvećom dehidroksiaskorbat-reduktaznom (DHAR) aktivnošću u ćelijama sisara, što ukazuje na značaj ovih enzima u regulaciji redoks balansa u ćeliji (78). Specifičnost ove klase je i u ispoljavanju nekatalitičkih uloga, kao što su modulacija posttranslacione obrade inflamatornog

citokina interleukina-1 β i modulacija rijanodin receptora (RyR) što može imati ulogu u kalcijumom indukovanoj apoptozi (80).

Polimorfizam *GSTO1 Ala140Asp* u osnovi ima zamenu citozina u adenin u egzonu 4, na kodonu 140, što dovodi do promene aminokiseline iz alanina u aspartat (72) pri čemu se tiol transferazna aktivnost smanjuje na 75% u odnosu na referentni alel, što za posledicu ima smanjen kapacitet za detoksikaciju. Kod polimorfizma *GSTO2 Asn142Asp* (rs156697), dolazi do supstitucije adenina sa guaninom na kodonu 142, što ima za posledicu zamenu aminokiseline asparagina u aspartat.

Podaci iz literature ukazuju da je polimorfizam gena za različite glutathion transferaze jedan od mogućih uzroka interindividualnih varijacija u aktivnosti glutathion transferaza, (135)., usled čega je i polimorfizam gena za omega klasu GST takođe bio predmet istraživanja multifaktorijskih bolesti (78).

Istraživanja poslednjih godina koja su obuhvatila 668 ispitanika iz šest različitih etničkih grupa su pokazala da zastupljenost varijantnih oblika GST omega, mi i teta klase zavisi od rase i geografskog područja (136). Obzirom na mali broj podataka o učestalosti ovih genotipova u našoj zemlji ovo istraživanje je za prvi zadatak imalo određivanje distribucije polimorfizma klasa *GSTO1 i GSTO2* u kontrolnoj grupi i kod kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega.

Rezultati distribucije *GSTO1* genotipa u ovoj studiji u kontrolnoj grupi (33% *CC*, 59% *CA* i 8% *AA GSTO1* genotip) su u skladu sa podacima iz literature koji se odnose na distribuciju učestalosti *GSTO1* genotipa u populaciji belaca u srednjoj Evropi. Učestalost varijantnog *Asp140* alela u našoj kontrolnoj grupi je bila 37%, dok se u Evropskoj populaciji javlja u rasponu od 30,2-39,9% (89,136). Poznato je da je kod pripadnika žute rase učestalost *GSTO1 Asp140* alela niža i kreće se od 10,8-16,5%, dok je u afričkoj populaciji u rasponu od 4,0-8,1% (72). Interesantni su rezultati jednog istraživanja koje je pokazalo dosta nisku učestalost *Asp140* alela kod Turske populacije (8,5%) (87). Međutim novija istraživanja koja su obuhvatila Tursku populaciju su pokazala da je frekvencija javljanja *GSTO1 Asp140* alela u Turskoj populaciji ista kao i kod ostalih pripadnika bele rase (88). Kao mogućnost neslaganja ova dva istraživanja Turske populacije autori ističu važnost uključivanja demografskih podataka kao što su starost, pol i kriterijume podobnosti u odnosu na zdravstveno stanje.

U našoj kontrolnoj grupi rezultati distribucije *GSTO2* genotipa (42% *AA*, 51% *AG* i 7% *GG* *GSTO2* genotip) odgovaraju očekivanoj učestalosti *GSTO2* genotipova kod belaca (89). Učestalost varijantnog *GSTO2 Asp142* alela u kontrolnoj grupi (33%) koja je dobijena u našem radu odgovara podacima iz literature kod belaca (31,0-34,1%)(72, 89). Kod pripadnika žute rase učestalost *GSTO2 Asp142* alela je nešto niža i kreće se od 21,6-28,5%, dok je u afričkoj populaciji znatno viša i javlja se u rasponu od 58,3-85,5% (86,87).

Iz ovih rezultata se može zaključiti da *GSTO1 Ala140Asp* (rs 4925) i *GSTO2 Asn142Asp* (rs156697) polimorfizmi mogu da budu antropogenetski marker za razliku od polimorfizma *GSTO1*E155del*, koji ima veoma nisku učestalost i ne pokazuje značajnu razliku u distribuciji među različitim populacijama (87,89).

Analizom distribucije *GSTO1* genotipa u grupi bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega (41% *CC*, 47% *CA* i 12% *AA*) utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u odnosu na distribuciju učestalosti kod kontrolne grupe ($p=0,110$). Međutim, ispitivanje distribucije *GSTO2* genotipova u grupi bolesnika sa TBS uočava se razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Naime, učestalost referentnih genotipova *AA* u grupi bolesnika sa TBS je manja u odnosu na kontrolnu grupu (34% vs 42%), učestalost *AG* genotipova (51%) je kao i kod kontrolne grupe (51%), dok je učestalost homozigotnih varijantnih *GG* genotipova u studijskoj grupi (15%) veća u odnosu na kontrolnu grupu (7%). Statistička obrada ovih rezultata je pokazala da je ova razlika statistički značajna ($p=0,046$).

Ispitivanje povezanosti polimorfizma gena *GST* klase omega i pojave oboljenja koje karakteriše povećan nivo oksidativnog stresa i inflamacija bilo je predmet ispitivanja brojnih studija. Dosadašnja istraživanja su pokazala da osobe nosioci polimorfizma *GSTO2 Asn142Asp* (rs156697), imaju povećan rizik za nastanak Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti (91), a Piacentini i saradnici su pokazali da postoji čak četiri i po puta veći rizik za nastanak hipotireoidizma kod osoba nosioca varijantnog *GSTO2 Asp142* alela (97). Poznato je da oksidativni stres pogoršava plućne funkcije, a istraživanja su pokazala da polimorfizam *GSTO2* gena nosi i do šest puta veći rizik za nastanak astme (95). Marahatta i saradnici su pokazali da *GSTO1 Ala140Asp* polimorfizam može biti važan faktor rizika za pojavu malignih oboljenja i to hepatocelularnog karcinoma, holangiokarcinoma i tumora dojke (99).

Nedavno je pokazana značajna povezanost između genskog polimorfizma GST klase A1, M1, P1 i T1 sa nivoom oksidativnog stresa kod hemodijaliznih bolesnika (117), što upućuje na mogućnost da polimorfna ekspresija pripadnika omega klase takođe utiče na nastanak terminalne slabosti bubrega.

Zbog toga je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio da ispita da li je prisustvo genskog polimorfizma *GSTO1 Ala140Asp* (rs 4925) i *GSTO2 Asn142Asp* (rs156697) udruženo sa povećanim rizikom za nastanak terminalne slabosti bubrega.

Naši rezultati su pokazali da kod bolesnika nosioca varijantnog homozigotnog *GSTO1 Asp/Asp* genotipa postoji oko 1,24 puta veći rizik u odnosu na bolesnike sa referentnim genotipom. Međutim, iako postoji povećanje rizika ono nije dostiglo statističku značajnost (OR=1,24; 95%IP=0,60-2,51; p=0,561). Prisustvo varijantnog heterozigotnog genotipa *GSTO1 Ala/Asp*, takođe nije statistički značajno povezan sa rizikom za nastanak TBS (OR=0,69; 95%IP=0,45-1,07; p=0,098). Na osnovu toga možemo zaključiti da polimorfizam *GSTO1* gena nije značajno povezan sa rizikom za nastanak terminalne bubrežne slabosti. Pored toga, analizirana je i povezanost polimorfizma *GSTO2* gena sa rizikom za nastajanje TBS. Dobijeni rezultati pokazuju da bolesnici sa varijantnim heterozigotnim *GSTO2 Asn/Asp* genotipom imaju 1,19 puta veći rizik za nastanak TBS u odnosu na bolesnike sa referentnim *GSTO2 Asn/Asn* genotipom, ali bez statističke značajnosti (OR=1,19; 95%IP=0,77-1,85; p=0,427). Međutim, homozigotni nosioci varijantnog *GSTO2 Asp/Asp* genotipa su bili pod 2,45 puta većim rizikom razvoj TBS u odnosu na osobe sa referentnim *GSTO2 Asn/Asn* genotipom, što je i statistički značajno (OR=2,45; 95% IP=1,18 – 5,07; p=0,016).

Zanimljivo je da postoji samo jedna studija koja je ispitivala *GSTO2* genski polimorfizam kod bolesnika sa TBS. Studija je izvedena u Iranu i obuhvatila je bolesnike sa TBS kod kojih je izvršena transplantacija bubrega (137). Rezultati njihovog ispitivanja nisu pokazali da postoji statistički značajna povezanost *GSTO2* genskih varijanti i rizika za nastanak terminalne slabosti bubrega, kao ni akutnog odbacivanja alografta u postupku lečenja. Razlozi neslaganja sa našim rezultatima moguće je da jednim delom potiču i od razlike u ispitivanim populacijama. Naime, Iranska populacija ima široku lepezu etničkih grupa, tako da je u njihovom istraživanju u kontrolnoj grupi dobijena

nešto veća učestalost varijantnog alela GSTO2 Asp142 (35%) u odnosu na podatke koji u literaturi postoje za belu rasu (31 -34%).

Značaj polimorfizama *GSTO1* i *GSTO2* gena smo razmatrali i u analizama interakcije između SNP-ova, s obzirom da su studije asocijacije pokazale da proučavanje haplotipova ima veću statističku snagu u odnosu na proučavanje pojedinačnih SNP-ova (138).

Bliska lokalizacija *GSTO1* i *GSTO2* gena na istom hromozomu takođe je dala osnov za ispitivanje učestalosti haplotipova ovih gena kod kontrone grupe i kod bolesnika sa TBS, kao i razmatranje povezanosti sa terminalnom bubrežnom slabošću.

Naši rezultati su pokazali da je najzastupljeniji haplotip kod bolesnika sa TBS (55,1%) kao i kod osoba unutar kontrolne grupe (45,5%) bio haplotip od jedne kopije referentnog alela *GSTO1* (Ala140) i jedne kopije referentnog *GSTO2* (Asn142) alela. U kontrolnoj grupi zatim po učestalosti slede kombinacije varijantni *GSTO1* Asp140 alel i referentni *GSTO2* Asn142 alel (21,9%), referentni *GSTO1* Ala140 i varijantni *GSTO2* Asp142 alel (16,7%) i najmanje je zastupljen haplotip varijantnih alela *GSTO1* Asp140 i *GSTO2* Asp142 (15,9%).

U grupi bolesnika sa TBS najmanje je prisutan haplotip jedne kopije varijantnog *GSTO1* Asp140 alela i jedne kopije referentnog *GSTO2* Asn142 alela (4,7%), a analiza je pokazala da ova haplotip kombinacija, ima zaštitnu ulogu za nastanak terminalne slabosti bubrega (OR=0,23; 95% IP=0,12–0,44; p=0,001). Kod nosioca haplotipa varijantnih alela oba gena (*GSTO1* Asp140 i *GSTO2* Asp142) postoji povećanje rizika za nastanak TBS ali nije dostiglo statističku značajnosti (OR=1,47; 95% IP=0,97–2,23; p=0,071).

Kod bolesnika sa TBS efekti oksidativnog stresa i inflamacije su jako povezani i dovode do endotelne disfunkcije, s obzirom da endotel predstavlja i izvor i metu oksidanasa i učestvuje u inflamatornom odgovoru. Treba naglasiti da u toku razvoja TBS dolazi do kompleksnih promena kako u ćelijskom, tako i u vanćelijskom redoks sistemu, pri čemu se napredovanjem bubrežne slabosti ravnoteža pomera prema oksidovanom stanju molekula (117, 139). Postoji sve više dokaza, iz eksperimentalnih i kliničkih ispitivanja, da oksidativni stres može biti važan u patogenezu aterosklerozе i drugih komplikacija TBS, kao što su dijalizna amiloidoza, nehranjenost i anemije.

Do povećanja nivoa oksidativnog stresa kod bolesnika sa TBS dolazi jer bolesti koje su najčešći uzroci nastanka TBS, hipertenzija, dijabetes i zapaljenja (npr glomerulonefritis), aktiviraju različite molekulske puteve koji povećavaju proizvodnju slobodnih radikala u bubrezima. S druge strane, kod bolesnika sa TBS smanjena je količina antioksidanasa male molekulske mase kao što je askorbinska kiselina, kako zbog smanjenog unosa, tako i zbog gubitka tokom hemodijalize i povećanog katabolizma u upalnom procesu (140). Jedna od vitalnih funkcija ćelije je redukcija dehidroaskorbata u askorbinsku kiselinu, pri čemu je veoma važna dehidroaskorbat-reduktazna aktivnost GST klase omega. Ova aktivnost je posebno izražena kod izoenzima GSTO2, koji se smatra enzimom sa najvećom DHAR aktivnošću u ćelijama sisara, što ukazuje na značaj ovih enzima u regulaciji redoks balansa u ćeliji (78). Izmenjena aktivnost GSTO2 enzima može da dovede do interindividualnih razlika u sposobnosti sakupljanja i detoksikacije reaktivnih vrste koje nastaju u toku hemodijaliznog procesa kod bolesnika sa TBS (78). Postoje pretpostavke da je dehidroaskorbat reduktazna aktivnost GSTO2 pod uticajem rs156697 polimorfizma, tako da se kod bolesnika sa oba varijantna alela *GSTO2* smanjuje aktivnost enzima što dovodi do nedovoljne DHAR aktivnosti, odnosno smanjene redukcije dehidroaskorbata u askorbinsku kiselinu, što sve dovodi do smanjenja nivoa askorbinske kiseline u plazmi, kao i nedovoljne antioksidantne zaštite (78).

Na osnovu ovih činjenica postavljen je cilj da se ispita povezanost različitih varijanti *GSTO1* i *GSTO2* gena i oksidativnog fenotipa bolesnika sa TBS. Radi procene povezanosti analizirana je oksidativna modifikacija ciljnih makromolekula, kao što su proteini i lipidi kod bolesnika sa TBS nosioca različitih genotipa. Reakcije oksidativnog oštećenja proteina se dešavaju na nivou aminokiselina, u reakcijama učestvuju amino-, guanidino- i tiol- grupe, a od njih su pri fiziološkom pH tiol grupe najjači nukleofili. Tiol grupe učestvuju u prekidanju lančanih reakcija stvaranja radikala u plazmi, te spadaju u redoks najosetljivija jedinjenja kod bolesnika sa TBS i odražavaju nivo oksidativnog stresa kod ovih bolesnika (141). Poremećena homeostaze tiola u krvi bolesnika sa TBS uključuje poremećaj redoks parova, kao što su GSH/GSSG i cistein/cistin, u plazmi i krvnim zrnima (142).

Albumin, kao glavni ciljni protein oksidativnog stresa u plazmi bolesnika sa TBS i na hemodijalizi, deluju kao žrtveni antioksidansi, a nivo proteinskih tiol grupa se snižava

usled njihove modifikacije (117,113). Među post-translacijskim modifikacijama P-SH od značaja za ove efekte kod bolesnika sa TBS su reakcije alkilovanja nizom elektrofilnih karbonila i oksidacija u sulfensku kiselinu dejstvom reaktivnih vrsta (143). Dalja oksidacija sulfenske kiseline do sulfinske i sulfonske kiseline dovodi do degradacije proteina. Ovakav nepovoljan redosled reakcija sprečava takozvani S-glutationilacioni ciklus, u kome redukovani glutathion reaguje sa proteinima koji takođe sadrže sulfhidrilne grupe (P-SH) pri čemu nastaju protein-SG mešani disulfidi (glutathionilovani protein P-SSG) i na taj način se sprečava oksidacija proteinskih SH grupa i njihovo unakrsno povezivanje pomoću S-S mostova. Reakcija glutathionilacije može da se odvija spontano, ali takođe može da je katalizuje glutaredoksin, tioredoksin i protein disulfid izomeraza, kao i član porodice GST enzim GSTP1 (143). Novija istraživanja su pokazala da je koncentracija tiol grupa smanjena kod bolesnika sa TBS nosioca *GSTP1Val/Val* homoziga u odnosu na nosioce najmanje jednog *GSTP1Ile* referentnog alela (117).

Uočena je velika strukturna sličnost GST enzima klase omega sa glutaredoksinom, a istraživanja Borda i saradnika su pokazala da GSTO1 katališe reakcije deglutathionilacije (71). Otkriće da GSTO1 učestvuje u glutathionilacionom ciklusu i cilja specifične proteine može da objasni povezanost GSTO1 polimorfizama sa širokim spektrom kliničkih poremećaja (77). Pokazano je da prisustvo *GSTO1Ala140* alelne varijante ima za posledicu jaču deglutathionilacionu aktivnost, što doprinosi većoj podložnosti za oksidaciju, a što rezultira većim proteinskim modifikacijama i pojačanim oksidativnim stresom (77). Naša studija je pokazala da je sadržaj proteinskih tiol grupa u plazmi smanjen kod bolesnika sa TBS, nosioca najmanje jednog *GSTO1Ala140* referentnog alela, i moguće je da je to smanjenje posledica jače deglutathionilacije. Rezultati određivanja povezanosti sadržaja proteinskih tiol grupa i različitih GSTO2 genotipova, pokazuju da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji tiol grupa između različitih *GSTO2* genotipova. Interesantno je da je kod bolesnika koji su nosioci varijantnog *GSTO2* genotipa koncentracija tiol grupa veća, dok je sadržaj MDA snižen, a da je analiza preživljavanja pokazala da imaju duže ukupno preživljavanje.

U cilju razjašnjavanja potencijalne uloge polimorfizma *GSTO1* i *GSTO2* gena u glutathionilacionom/deglutathionilacionom ciklusu potrebno je ispitivanje širokog spektra ćelijskih proteina. Modifikacije na proteinima uzrokovane slobodnim radikalima,

izazivaju formiranje karbonilnih grupa na mestima u lancu gde su amino grupe. Osim toga, malondialdehid stvara *Schiff-ove* baze sa amino grupama amino kiselinskih ostataka proteina i dovodi do povećanja sadržaja karbonilnih grupa u plazmi. Ovaj vid sekundarne oksidacije proteina, poznat kao »karbonilni stres« je potvrđen i u oštećenju proteina kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću (27). Naši rezultati pokazuju da je sadržaj karbonilnih grupa najniži kod varijantnih genotipova *GSTO1 (Asp/Asp)* i *GSTO2 (Asp/Asp)*, ali da nema statistički značajne povezanosti genotipova i nivoa karbonilnih grupa kod bolesnika sa TBS.

Kako u uslovima povećanog stvaranja NO dolazi do nitracije tirozina i do povećanja količine nitrotirozina, kao pokazatelj nivoa oksidativnog stresa određivana je i koncentracija nitrotirozina. Dobijeni rezultati su pokazali da se koncentracija nitrotirozina povećava kod varijantnih genotipova *GSTO1 (Asp/Asp)* i *GSTO2 (Asp/Asp)* u odnosu na referentne alele genotipova *GSTO1* i *GSTO2*, ali da to povećanje nije dostiglo statističku značajnost.

Radi procene povezanosti između genskog polimorfizma GST omega klase i oksidativnog fenotipa, određivani su i pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida. Produkti lipidne peroksidacije imaju dug poluživot, veoma su reaktivni, pa je njihovo merenje u širokoj upotrebi, a najčešće se određuje koncentracija malondialdehida (MDA). Rezultati određivanja MDA pokazuju da je koncentracija najniža kod nosioca referentnog *GSTO1* genotipa, ali da razlika u koncentraciji MDA kod različitih varijanti gena za *GSTO1* nije dostigla statističku značajnost. Kod polimorfizma *GSTO2* gena, se uočava da nosioci varijantnog *GSTO2* genotip imaju niže koncentracije MDA u odnosu na referentni genotip i da je ta razlika statistički značajna.

Uticaj oksidativnog stresa kod bolesnika sa TBS je znatno izraženiji nego kod opšte populacije, pri čemu postoji jaka korelacija između oksidativnog stresa, hronične inflamacije i kardiovaskularnih bolesti koje su veoma rasprostranjene u većini bolesnika na hemodijalizi. Takođe, rizik za razvoj kardiovaskularnih komplikacija je skoro 100 puta veći kod bolesnika sa TBS u odnosu na opštu populaciju iste starosne dobi (144). Glavni uzrok mortaliteta bolesnika sa TBS i dalje ostaju kardiovaskularne bolesti od kojih umire oko 50% bolesnika lečenih hemodijalizom (11,145), a ubrzana ateroskleroza, hronična

inflamacija, neuhranjenost doprinose da je smrtnost ovih bolesnika jednaka smrtnosti bolesnika sa karcinomom koji je metastazirao (12).

Kod bolesnika iz naše studije, najčešći uzrok smrti su bile kardiovaskularne bolesti (67%), od čega je skoro jedna petina bolesnika imalo udruženo i infarkt miokarda i moždani udar. Infekcija i sepsa su kod 17% bolesnika dovele do smrti, a ostali uzroci smrti su bili nastanak neoplazme, gastrointestinalno krvarenje, kaheksija i hronična opstruktivna bolest pluća.

Dokazana uloga oksidativnog stresa u nastanku terminalne slabosti bubrega i kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika sa TBS, ukazuje na mogućnost da prisustvo određenih varijanti gena za glutathion transferaze klase omega mogu imati prognostički značaj u proceni rizika za nastanak kardiovaskularnih komplikacija.

Pri ispitivanju povezanosti polimorfizma gena *GSTO1* i preživljavanja bolesnika sa TBS utvrdili smo da polimorfizam gena *GSTO1* utiče na preživljavanje bolesnika sa TBS, naime, dužina ukupnog i kardiovaskularnog preživljavanja je kraća kod nosioca najmanje jednog *GSTO1* referentnog alela u odnosu na nosioce varijantnog *GSTO1* genotipa. Rezultati Kölscha i saradnika su pokazala da kod bolesnika sa varijantnim *Asp/Asp* i *Ala/Asp* genotipom postoji povećan rizik od moždanog udara (146). Interesantno je da ovi rezultati nisu u skladu sa nalazima Peddareddygar i saradnika koji nisu našli vezu polimorfizma gena za *GSTO1* i cerebralnog odgovora na ishemiju (147). Kako je polimorfizam *GSTO1 Ala140Asp* rezultat izmene aminokiseline alanina u aspartat, ova promena u redosledu proteina smanjuje aktivnost enzima što može da utiče na podložnost tkiva prema oksidativnom stresu.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da povezanost između genskih varijacija *GSTO2* i ukupnog ($p=0.386$) odnosno kardiovaskularnog mortaliteta ($p=0.330$) kod bolesnika sa TBS nije dostigla statističku značajnost.

Novija saznanja otkrivaju funkcionalnu ulogu polimorfizma *GSTO1* gena u ciklusu glutathionilacije/deglutathionilacije što može da pruži dodatna objašnjenja za kraće preživljavanje kod bolesnika sa *GSTO1Ala140* referentnim alelom (77). Menon i Board su u svojoj studiji istakli da bi polimorfne varijante *GSTO1* potencijalno mogle da utiču na regulisanje glutathionilacije, ukazujući da *GSTO1Ala140* referentni alel pokazuje veću aktivnost uklanjanja glutathiona u odnosu na varijantne alele (77). Glutathionilacijom ili

deglutinationilacijom proteina menja se njihova aktivnost. U procesu glutathionilacije dolazi do posttranslacione modifikacije proteina dodavanjem glutathiona na specifične cisteinske ostatke čime se reguliše veliki broj apoptotskih signanih proteina i transkripcionih faktora. Za razliku od GSTO1, GSTO2 ne ispoljava deglutathionilacionu aktivnost, iako ima 68% identičnih sekvenci sa GSTO1 i cisteinski ostatak u aktivnom mestu (71).

Prediktivna vrednost različitih *GSTO* genotipova u ukupnom i kardiovaskularnom mortalitetu kod bolesnika sa TBS je procenjivana uz uključivanje različitih faktora rizika u tri modela. Analiza je pokazala da *GSTO1* polimorfizam ima statistički značajan modifikujući uticaj na povećanje rizika za nastanak kardiovaskularnog mortaliteta.

Pored toga rađena je i analiza povezanosti haplotipa sa rizikom za ukupni i kardiovaskularni mortalitet kod bolesnika sa TBS. Dobijeni rezultati u našoj studiji ukazuju da haplotip kombinacija jednog primerka referentnog alela *GSTO1Ala140* i jedne kopije varijantnog *GSTO2Asp142* alela ispoljava veći rizik za ukupnu smrtnost (OR=0,79; 95% IP=0,32–1,92; p=0,077).

Rezultati prikazani u ovom radu kombinovanim metodološkim pristupima potvrđuju da *GSTO* polimorfizam može biti značajan marker u proceni rizika za razvoj terminalne bubrežne slabosti, kao i za procenu preživljavanja bolesnika sa TBS.

6. ZAKLJUČCI

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

- Učestalost varijantnih alela *GSTO1Asp140* (37%) i *GSTO2Asp142* alela (33%) u kontrolnoj grupi odgovara očekivanoj učestalosti *GSTO1Asp140* alela (30,2-39,9%) i *GSTO2Asp142* alela (31-34%) kod belaca, i potvrđuje saznanje da postoji razlika u odnosu na učestalost genotipova pripadnika klase omega kod drugih rasa, kao što je učestalost *GSTO1Asp140* alela niža i kod žute i kod crne rase (4-16,5%), dok je učestalost *GSTO2Asp142* alela niža kod žute (21-28%), a znatno viša kod afričke populacije (58-85%).
- Analiza genskog polimorfizma *GSTO1 Ala140Asp* (rs 4925) nije pokazala statistički značajnu razliku u učestalosti alela i genotipova između grupe bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću i kontrolne grupe, pa se može zaključiti da ovaj polimorfizam ne doprinosi razvoju terminalne slabosti bubrega.
- Analiza genskog polimorfizma *GSTO2 Asn142Asp* (rs156697) pokazala je statistički značajnu razliku u učestalosti alela i genotipova između grupe bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću i kontrolne grupe. Utvrđeno je da polimorfizam gena za *GSTO2* doprinosi nastanku terminalne bubrežne slabosti. Homozigotni nosioci varijantnog *GSTO2 Asp/Asp* genotipa su bili pod 2,45 puta većim rizikom za razvoj terminalne slabosti bubrega u odnosu na osobe sa referentnim *GSTO2 Asn/Asn* genotipom.
- Haplotip analiza je pokazala da haplotip kombinacija jedne kopije varijantnog *GSTO1 Asp* alela i jedne kopije referentnog *GSTO2 Asn* alela ima zaštitnu ulogu u pogledu nastanka terminalne slabosti bubrega (OR=0,23; 95%IP=0,12–0,44; p=0,001), dok kod nosioca haplotipa varijantnog *GSTO1Asp140* i varijantnog

GSTO2Asp142 alela postoji povećanje rizika za nastanak TBS, koje ali nije dostiglo statističku značajnosti.

- Iako oksidativni stres ima značajnu ulogu u nastanku hronične slabosti bubrega pokazano je da ne postoji povezanost između različitih varijanti gena *GSTO1* i *GSTO2* i nivoa pokazatelja oksidativnog stresa, što ukazuje da ovi proteini imaju drugačije uloge od ostalih klasa glutation transferaza.
- Analiza povezanosti *GSTO1* polimorfizama i preživljavanja pokazuju da je referentni alel *GSTO1* gena, *GSTO1 Ala140*, udružen sa lošijim kardiovaskularnim preživljavanjem bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Zapažena veza je najverovatnije posledica postojanja funkcionalne uloge ovog polimorfizma u ciklusu glutationilacije/deglutinationilacije.
- Mada je utvrđeno da nosioci varijantnog oblika *GSTO2* gena imaju veći rizik za nastanak terminalne bubrežne slabosti, nije utvrđena povezanosti polimorfizma gena za *GSTO2* sa preživljavanjem.
- Dobijeni rezultati u našoj studiji ukazuju da haplotip kombinacija jedne kopije referentnog *GSTO1 Ala140* alela i jedne kopije varijantnog *GSTO2 Asp142* alela ispoljava veći rizik za ukupnu smrtnost.
- Iz svega navedenog se može zaključiti da polimorfna ekspresija gena za *GSTO1* i *GSTO2* ima funkcionalni značaj u nastanku i prognozi terminalne bubrežne slabosti.

7. LITERATURA

1. Levey AS, De Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification and prognosis of chronic kidney disease: KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011; 80(1): 17-28.
2. Mimić-Oka J, Simić T, Djukanović L, Reljić Z, Davicević Z. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1999; 51: 233-41.
3. Fiorillo C, Oliviero C, Rizzuti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P. Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36 (3): 149-53.
4. National Kidney Foundation K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(2): 1-246.
5. Bello AK, Nwankwo E, El Nahas AM. Prevention of chronic kidney disease: a global challenge. *Kidney Int* 2005; 68(98): 11-17.
6. Đukanović Lj, Aksić-Miličević B, Antić M, Baković J, Varga Ž, Gojaković B, et al. Epidemiology of end-stage renal disease and hemodialysis treatment in Serbia at the turn of the millennium. *Hemodial Int* 2012; 16: 517-25.
7. ERA-EDTA registry 2003. annual report. Academic Medical Centre, Amsterdam Netherlands), 2005.
8. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romundstad S, et al. International Comparison of the Relationship of Chronic Kidney Disease Prevalence and ESRD Risk. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2275-84.
9. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217-23.
10. U.S. Renal Data System, USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013.

11. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med* 2004; 164: 659-63.
12. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *American Journal of Kidney Diseases* 2003; 41(6): 1212-8.
13. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997; 2(82): 291-5.
14. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (3). Oxford University Press Inc., New York, USA, 1999; 617-783.
15. Andreyev AY, Kushnareva YE and Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 2005; 70: 200-14.
16. Miller MJ, Zhang XJ, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, McIntyre JA, Clark DA, et al. Nitric oxide release in response to gut injury. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 149-54.
17. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2010; 15: 186-90.
18. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 995-1014.
19. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.
20. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(12):1997-2015.
21. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
22. Kehrler JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1): 21-48.
23. Castellani RJ, Honda K, Zhu X, Cash AD, Nunomura A, Perry G, et al. Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Research Reviews* 2004; 3(3): 319-26.

24. Lipinski B, Pretorius E. Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron. *Hematology* 2012; 4(17): 241–7.
25. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 360-438.
26. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(8):1037-46.
27. Mimic-Oka J, Simic T, Pljesa M, Stupar N, Turkovic S. Oxidative modifications of plasma proteins in different stages of chronic renal failure. *Facta Universitatis* 2001; 8: 1–5.
28. Ames BN, Shigenaga MK, Hagan TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915–22.
29. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 1989;58:79-110.
30. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione S-transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 51-88.
31. Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem Sci*. 1999 (6):219-23.
32. Rautalahti M, Huttunen J. Antioxidants and carcinogenesis. *Ann Med*. 1994 ;26(6):435-41.
33. Diplock AT. Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med*. 1994;15(4):293-376.
34. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711-60.
35. Samokyszyn VM, Reif DW, Miller DM, Aust SD. Effects of ceruloplasmin on superoxide-dependent iron release from ferritin and lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun*. 1991;12-13 Pt 1:153-9.
36. Cha MK, Kim IH. Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;222(2):619-25.
37. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1994 ;269(24):16712-9.

38. Teismann P, Ferger B. The salicylate hydroxylation assay to measure hydroxyl free radicals induced by local application of glutamate in vivo or induced by the Fenton reaction in vitro. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2000;5(2):204-10.
39. Đukić M. Oksidativni stres - kliničko dijagnostički značaj. Mono i manjana, Beograd, 2008.
40. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000; 32(3-4): 307-26.
41. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272(33): 20313-6.
42. Baynes JW and Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000;28(12): 1708-16
43. Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol.* 2001;36(9):1495-502.
44. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1-2):23-38.
45. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Aug 1;356(1):1-11.
46. Ceaser EK, Moellering DR, Shiva S, Ramachandran A, Landar A, Venkartraman A, et al. Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc T,* 2004; 32: 151.
47. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Brit Med Bull* 1993; 49: 566-76.
48. Markesbery WR, Lovell MA. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 33-6.
49. Moore K, Roberts LJ. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998; 28: 659-71.
50. Del Rio D, Stewart A, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc* 2005; 15: 316-28.
51. Delibas N, Ozcankaya R, Altuntas I. Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker for cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval. *Clin Biochem* 2002; 35: 137-41

52. Basu S. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1405–34.
53. Il'yasova D, Wagenknecht LE, Spasojevic I, Watkins S, Bowden D, Wang F, et al. Urinary F2-Isoprostanes and Metabolic Markers of Fat Oxidation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015;1-5.
54. Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen HE. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(11):1439-47.
55. Pastore A, Federici G, Bertini E, Pieminte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003;333:19-39.
56. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;570:7-22.
57. Grootveld M and Halliwell B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochem J.* 1987; 243(3): 803–8.
58. Tucker PS, Dalbo VJ, Han T, Kingsley MI. Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease. *Biomarkers.* 2013;18(2):103-15.
59. Homma H, Maruyama H, Niitsu Y, Listowsky I. A subclass of glutathione S-transferases as intracellular high-capacity and high-affinity steroid-binding proteins. *Biochem J* 1986; 235(3): 763–8.
60. Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(12): 656-68.
61. Hayes JD, Strange RC. Invited Commentary Potential Contribution of the Glutathione S-Transferase Supergene Family to Resistance to Oxidative Stress 1995; 3(22): 193-207.
62. Vos RM, Van Bladeren PJ. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chemico-biological interactions* 1990; 75(3): 241-65.
63. Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 335-55.
64. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600.
65. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for

- Mammalian Soluble Glutathione Transferases. Methods in Enzymology; glutathione Transferases and gamma-Glutamyl Transpeptidases (Sies H, Packer L.) Elsevier Inc, San Diego, 2005; 401: 1-8.
66. Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Common structural features of MAPEG- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* 1999; 8: 689-92.
 67. Rohrdanz E, Nguyen T, Pickett CB. Isolation and characterization of the human glutathione S-transferase A2 subunit gene. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 747-52.
 68. 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(1): 271-6.
 69. Xu S, Wang Y, 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. Patskovsky YV, Huang MQ, Takayama T, Listowsky I, Pearson WR. Distinctive structure of the human GSTM3 gene-inverted orientation relative to the Mu class glutathione transferase gene cluster. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361: 85-93.
 71. Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastaugh S, Jermini LS, Schulte GK, et al. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* 2000; 275(32): 24798-806.
 72. Whitbread AK, Tetlow N, Eyre HJ, Sutherland GR, Board PG. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 131-44.
 73. Ivarsson Y, Mannervik B. Combinatorial protein chemistry in three dimensions: a paradigm for the evolution of glutathione transferases with novel activities. *The toxicology of glutathione transferases*(Awasthi Y.C.), Taylor & Francis Group 2007; 47-70.
 74. Board PG. The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. *Drug Metab Rev* 2011; 43: 226-35.
 75. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001; 360: 1-16.

76. Whitbread AK, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board PG. Characterization of the Omega Class of Glutathione Transferases. *Methods in Enzymology* 2005; 401: 78–99.
77. Menon D, Board PG. A role for Glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle. *J Biol Chem* 2013; 288(36): 25769-79.
78. Zhou H i sar., 2012). Zhou H, Brock J, Liu D, Board PG, Oakley AJ. Structural insights into the dehydroascorbate reductaseactivity of human omega-class glutathione transferases. *J Mol Biol* 2012;420:190-203.
79. Chung CJ i sar., 2011Chung CJ, Pu YS, Su CT, Huang CY, Hsueh YM. Gene polymorphisms of glutathione S-transferase omega 1 and 2, urinary arsenic methylation profile and urothelial carcinoma. *Sci Total Environ* 2011; 409: 465-70.
80. Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Gareth Chelvanayagam G , Philip Board P. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem* 2001; 276: 3319–23.
81. Piaggi S, Raggi C, Corti A, Pitzalis E, Mascherpa MC, Saviozzi M, et al. Glutathione transferase omega 1-1 (GSTO1-1) plays an anti-apoptotic role in cell resistance to cisplatin toxicity. *Carcinogenesis* 2010; 31: 804-11.
82. Wang L, Xu J, Ji C, Gu S, Lv Y, Li S, et al. Cloning, expression and characterization of human glutathione S-transferase Omega 2. *International Journal of Molecular Medicine* 2005; 19-27.
83. Yin ZL, Dahlstrom JE, Le Couteur DG, Board PG. Immunohistochemistry of omega class glutathione Stransferase in human tissues. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 983-7.
84. Mukherjee B, Salavaggione OE, Pelleymounter LL, Moon I, Eckloff BW, Schaid DJ, et al. Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(7): 1237-46.
85. Paiva L, Marcos R, Creus A, Coggan M, Oakley AJ, Board PG. Polymorphism of glutathione transferase Omega 1 in a population exposed to a high environmental arsenic burden. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 1–10.
86. Fujihara J, Kunito T, Takeshita H. Frequency of two human glutathione-S-transferase omega-1 polymorphisms (E155 deletion and E208K) in Ovambo and Japanese populations using the PCR-based genotyping method. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 621–24.

87. Takeshita H, Fujihara J, Takastuka H, Agusa T, Yasuda T, Kunito T. Diversity of glutathione s-transferase omega 1. A140D; and 2. N142D; gene polymorphisms in worldwide populations. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 283-6.
88. Ada TG, Ada AO, Kunak SC, Alpar S, Gulhan M, Iscan M. Association between glutathion S-transferase omega 1 A140D polymorphism in the Turkish population and susceptibility to non-small cell lung cancer. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2013;64(2):61-7.
89. Polimanti R, Piacentini S, Porreca F, Fuciarelli M. Glutathione S-transferase Omega class (GSTO) polymorphisms in a sample from Rome (Central Italy). *Human Biological Survey* 2010; 37: 585-92.
90. Stewart VC, Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Rad. Biol. Med* 2003; 34: 287-303.
91. Allen M, Zou F, Chai HS, Younkin CS, Miles R, Nair AA, et al. Glutathione S-transferase omega genes in Alzheimer and Parkinson disease risk, age-at-diagnosis and brain gene expression: an association study with mechanistic implications. *Mol Neurodegener* 2012; 7: 13.
92. Schmuck EM, Board PG, Whitbread AK, Tetlow N, Cavanaugh JA, Blackburn AC, et al. Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15: 493-501.
93. Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Bates MN, Goeden HM, Hertz-Picciotto I, Duggan HM, et al. Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 1992; 97: 259-67.
94. Piacentini S, Polimanti R, Moscatelli B, Re MA, Fuciarelli R, Manfellotto D, et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and air pollution as interactive risk factors for asthma in a multicentre Italian field study: a preliminary study. *Ann Hum Biol.* 2010 Jun; 37(3): 427-39.
95. Polimanti R, Piacentini S, Moscatelli B, Pellicciotti L, Manfellotto D, Fuciarelli M. GSTA1, GSTO1 and GSTO2 gene polymorphisms in Italian asthma patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37(8): 870-2.
96. Polimanti R, Piacentini S, Lazzarin N, Re MA, Manfellotto D, Fuciarelli M. Glutathione S-transferase variants as risk factor for essential hypertension in Italian patients. *Mol Cell Biochem* 2011; 357(1-2): 227-33.

97. Piacentini S, Monaci PM, Polimanti R, Manfellotto D, Fuciarelli M. GSTO2*N142D gene polymorphism associated with hypothyroidism in Italian patients. *Mol Biol Rep* 2013; 40(2): 1967-71.
98. Stamenković M, Radić T, Stefanović I, Coric V, Sencanic I, Pljesa-Ercegovac M, i sar. Glutathione S-transferase omega-2 polymorphism Asn142Asp modifies the risk of age-related cataract in smokers and subjects exposed to ultraviolet irradiation. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2014; 42(3): 277-83.
99. Marahatta SB, Punyarit P, Bhudisawasdi V, Paupairoj A, Wongkham S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett*. 2006; 236(2):276-81.
100. Pongstaporn W, Rochanawutanon M, Wilailak S, Linasamita V, Weerakiat S, Petmitr S. Genetic alterations in chromosome 10q24.3 and glutathione S-transferase omega 2 gene polymorphism in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 107-14.
101. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315-424.
102. Shah SV, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca VA. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(1):16-28.
103. Massy ZA, Stenvinkel P, Drueke TB. The role of oxidative stress in chronic kidney disease. *Semin Dial*. 2009; 4: 405-8.
104. Witko-Sarsat V, Ngyen-Khoa T, Jungers P, Drüeke TB, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14 (1): 76-8.
105. Wang D, Chen Y, Chabrashvili T, Aslam S, Borrego Conde LJ, Umans JG, et al. Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 11(14), 2783-9.
106. Galli F, Ronco C. Oxidant Stress in Haemodialysis. *Nephron* 2000; 84: 1-5.
107. Morena M, Cristol JP, Canaud B. Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. *Blood Purif* 2000; 18(3): 191-9.
108. McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tang KL, et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Current Medical Research and Opinion*. 2004; 20(9): 1501-10.

109. Kolagal V, Karanam SA, Dharmavarapu PK. Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications. *Indian J Nephrol* 2009; 19(1): 8-12.
110. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-32.
111. Miyata T, Kurokawa K, Van Ypersele de Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int* 2000; 58(76): 120-25.
112. Soejima A, Matsuzawa N, Miyake N, Karube M, Fukuoka K, Nakabayashi K, et al. Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1999; 51(2): 92-7.
113. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney International* 2001; 60: 358-63.
114. Mimic-Oka J, Simic T, Djukanovic L, Stefanovski J, Ramic Z. Glutathione and its associated enzymes in peripheral blood cells in different stages of renal insufficiency. *Amino Acids* 1992; 2: 215-24.
115. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta*. 1982;126(1):41-51.
116. Yoshimura S, Suemizu H, Nomoto Y, Sakai H, Katsuoka Y, Kawamura N, et al. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. *Nephron*. 1996;73(2):207-11.
117. Šuvakov S, Damjanović T, Stefanović A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac i sar. 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: 202-12.
118. Jocelyn PC. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymology*, 1987; 143: 44-67.
119. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall TD. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265-75.
120. Winterbourn CC, Buss IH. Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods Enzymol*. 1999;300:106-11.

121. Profumo E, Di Franco M, Buttari B, Masella R, Filesi C, Tosti ME et al. Biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Mediators of inflammation* 2012; 503-942.
122. Dousset JC, Trouilh M, Foglietti MJ. Plasma malonaldehyde levels during myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1983; 129(3): 319-22.
123. Fallin D, Schork N. Accuracy of haplotype frequency estimation for biallelic loci, via the expectation – maximization algorithm for unphased diploid genotype data. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 947-59.
124. Kao MP, Ang DS, Pall A, Struthers AD. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J Hum Hypertens* 2010;24(1):1-8.
125. Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM. Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other non-traditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8(3): 475–86.
126. Tepel M, Echelmeyer M, Orie NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 58(2): 867–72.
127. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int* 2004; 66(5): 1988–93.
128. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356(9237): 1213–8.
129. Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2003; 107(7): 992–5.
130. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 806358:8.
131. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *American Journal of Kidney Diseases* 2003; 41(6): 1212–8.

132. Manning RD Jr, Tian N, Meng S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage, *Am J Nephrol*. 2005 25(4): 311-7.
133. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics* 2012; 30(1): 49–59.
134. Cottone S, Lorito MC, Riccobene R, Nardi E, Mulè G, Buscemi S, et al. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Journal of Nephrology* 2008; 21(2): 175–9.
135. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 21-6.
136. Polimanti R, Carboni C, Baesso I, Piacentini S, Iorio A, De Stefano GF, Fuciarelli M. Genetic variability of glutathione S-transferase enzymes in human populations: functional inter-ethnic differences in detoxification systems. *Gene*. 2013;512(1):102-7.
137. Marnany N, Saadat I, Karimi MH, et al. Influence of GSTO2 (N142D) genetic polymorphism on acute renal rejection. *Mol Biol Rep* 2013; 40(8): 4857-60.
138. Bader J. The relative power of SNPs and haplotype as genetic markers for association tests. *Pharmacogenomics* 2001; 2: 11-24.
139. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62: 1524-38.
140. Deicher R , Hörl W H. Vitamin C in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res*. 2003; 26: 100-6.
141. Colombo G, Reggiani F, Podestà MA, Garavaglia ML, Portinaro NM, Milzani A, et al. Plasma protein thiolation index (PTI) as a biomarker of thiol-specific oxidative stress in haemodialyzed patients. *Free Radic Biol Med* 2015; 89: 443-51.
142. Galli F, Piroddi M, Bartolini D, Ciffolilli S, Buoncristiani E, Ricci G, et al. Blood thiol status and erythrocyte glutathione-S-transferase in chronic kidney disease patients on treatment with frequent (daily) hemodialysis. *Free Radic Res* 2014; 48: 273-81.
143. Tew KD, Townsend DM. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 17: 1728-37.

144. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. J Am Soc Nephrol. 1998; 9(12): 16-23.
145. Deng D, Forbes A. Cardiovascular Risk Factors in Patients on Dialysis. Nephrol Nurs J. 2015; 42(1):45-50.
146. Kölsch H, Linnebank M, Lütjohann D, Jessen F, Wüllner U, Harbrecht U, et al. Polymorphisms in glutathione S-transferase omega-1 and AD, vascular dementia, and stroke. Neurology 2004; 63: 2255-60.
147. Peddareddygari LR, Dutra AV, Levenstien MA, Sen S, Grewal RP. An analysis of methylenetetrahydrofolate reductase and glutathione S-transferase omega-1 genes as modifiers

SPISAK SKRAĆENICA

ANOVA	-	analiza varijanse
AOPP	-	produkti uznapredovale oksidacije proteina (eng. <i>Advanced Oxidation Protein Products</i>)
AOS	-	antioksidantni zaštitni sistem (eng. <i>antioxidant defence system</i>)
ADP	-	adenozin difosfat
ATP	-	adenozin trifosfat
BMI	-	indeks telesne mase (eng. <i>body mass index</i>)
CAT	-	katalaza
95% CI	-	95% interval poverenja (eng. <i>Confidence Interval</i>)
DHA	-	dehidroaskorbinska kiselina
DHAR	-	dehidroaskorbat-reduktazna aktivnost
DNK	-	deoksiribonukleinska kiselina
DM	-	dijabetes melitus (<i>diabetes mellitus</i>)
EDTA	-	etilen diamino tetra acetat (eng. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	-	enzimski imunoesej (eng. <i>enzyme –linked immunosorbent assay</i>)
EN	-	endemska nefropatija (<i>Balkan nephropathy</i>);
ERA-EDTA	-	<i>European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association</i>
GN	-	glomerulonefritis (<i>glomerulonephritis</i>)
GFR	-	eng. <i>glomerular filtration rate</i> (jačina glomerularne filtracije)
<i>GST01</i>	-	gen za glutation transferazu <i>GST01</i>
<i>GST02</i>	-	gen za glutation transferazu <i>GST02</i>
<i>GST01CC</i>	-	referentna genetska varijanta <i>GST01</i> (<i>wild type GST01</i>)
<i>GST01CA</i>	-	heterozigotna genetska varijanta <i>GST01</i>

<i>GSTO1AA</i>	-	homozigotna genetska varijanta <i>GSTO1</i>
<i>GSTO2AA</i>	-	referentna genetska varijanta <i>GSTO1</i> (<i>wild type GSTO1</i>)
<i>GSTO2AG</i>	-	heterozigotna genetska varijanta <i>GSTO1</i>
<i>GSTO2GG</i>	-	homozigotna genetska varijanta <i>GSTO1</i>
GSH	-	redukovani glutation
GSSG	-	oksidovani glutation
G-SR	-	konjugat elektrofilnog supstrata i glutationa
GSH-Px	-	glutation peroksidaza
GST	-	glutation transferaze
HEDS	-	hidroksietildisulfid
HBB	-	hronična bubrežna bolest
HD	-	hemodijaliza
HTA	-	hipertenzija (<i>hypertension</i>)
HR	-	eng. <i>hazard ratio</i> (rizik količnik)
4-HNE	-	4-hidroksi-2nonenal
8-OHdG	-	8-hidroksideoksiguanozin
KV bolesti	-	kardiovaskularne bolesti
kb	-	kilo-baza
KDOQI	-	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KSR	-	Kiseonički slobodni radikali
LDL	-	lipoproteini male gustine
MDA	-	malondialdehid
MDA add	-	malondialdehid protein adukt
NADPH	-	nikotin amid adenin dinukleotid redukovani oblik

NO	- azot-oksidi
OR	- odnos šansi (engl. <i>Odds Ratio</i>)
O ₂ ⁻	- superoksidni anjon
O ₂	- singlet kiseonik
p	- verovatnoća
PCR	- reakcija lančanog umnožavanja (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLPs	- reakcija lančanog umnožavanja- polimorfizmi dužina restrikcionih fragmenata (eng. <i>polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms</i>)
PBB	- policistična bolest bubrega (<i>polycystic kidney disease</i>)
PN	- pijelonefritis (<i>pyelonephritis</i>)
P-SH	- proteinske tiol grupe
ROS	- reaktivne vrste kiseonika (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
RNS	- reaktivne vrste azota (eng. <i>reactive nitrogen species</i>)
RCS	- reaktivne vrste ugljenika (eng. <i>reactive carbonyl species</i>)
RSS	- reaktivne vrste sumpora (eng. <i>reactive sulfur species</i>)
R-X	- elektrofilni supstrat
RyR	- rijanodin receptor
SD	- standardna devijacija
SNPs	- polimorfizam jednog nukleotida (eng. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
SOD	- superoksid dismutaza
TBARs	- tiobarbiturine reaktivne vrste (eng. <i>tiobarbituric acid reacting substances</i>)
TBS	- terminalna bubrežna slabost

BIOGRAFIJA

Slavica Cimbalević (devojačko Dizdarević) je rođena 23. marta 1962. godine u Brveniku, Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Raški. Medicinski fakultet u Beogradu, odeljenje u Kragujevcu je upisala školske 1981/82., a diplomirala 22. oktobra 1986. godine, sa prosečnom ocenom 7,96.

Nakon obavljenog jednogodišnjeg pripravničkog staža u Zdravstvenom centru Novi Pazar, i položenog stručnog ispita radila je u Domu zdravlja Raška u Raški, u službi Opšte medicine u periodu od 1987. do 1994. godine. Specijalizaciju iz Kliničke biohemije je započela oktobra 1994. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu i završila 1997. godine sa odličnom ocenom, uz izradu specijalističkog rada pod nazivom "Određivanje katalazne i glutation peroksidazne aktivnosti u tkivu bubrega".

Poslediplomske magistarske studije na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu je upisala 1999. godine a magistarsku tezu, pod nazivom „Aktivnost gama-glutamil transpeptidaze i alkalne fosfataze u serumu kao pokazatelj postojanja metastaza karcinoma bubrežnog parenhima“, čiji je mentor bila Prof. dr Jasmina Mimić-Oka, odbranila je 2003. godine.

Od februara 1998. godine do jula 2014. godine je radila u Službi kliničko-biohemijske dijagnostike, Doma zdravlja "Novi Beograd". U periodu od 2003. do 2010. godine bila je načelnik navedene Službe. Od jula 2014. godine je na mestu direktora Komore biohemičara Srbije, Beograd.

Mentor je opšteg dela specijalističkog staža iz Kliničke biohemije i angažovani nastavnik u okviru specijalističke nastave iz Kliničke biohemije na Institutu za kliničku i medicinsku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U okviru svog naučno-istraživačkog rada učestvovala je na brojnim naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu gde je prezentovala svoja istraživanja kao usmena izlaganja i posterske prezentacije. Do sada je bila autor i koautor više naučnih publikacija, prema Science Citation Index-u ima 3 citata.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Slavica Cimbalević

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Povezanost polimorfizma gena za glutathion transferaze klase omega sa
nivoom oksidativnog stresa kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega”**

- 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

Slavica Cimbalević

U Beogradu, 14.04.2016.godine

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Slavica Cimbaljević

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „Povezanost polimorfizma gena za glutation transferaze klase omega sa nivoom oksidativnog stresa kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega”

Mentor Prof. dr Tatjana Simić

Potpisani Slavica Cimbaljević

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

Slavica Cimbaljević

U Beogradu, 14.04.2016.godine

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Povezanost polimorfizma gena za glutathion transferaze klase omega sa nivoom oksidativnog stresa kod bolesnika sa terminalnom slabošću bubrega”

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 poledini lista).

Potpis doktoranda

Slavica Gabašević

U Beogradu, 14.04.2016.godine

