



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI

MEDICINSKI FAKULTET



**ŽANA RADIĆ SAVIĆ**

**ISPITIVANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA  
GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE  
ANTIOKSIDANTNE PROTEINE SA RIZIKOM ZA  
NASTANAK BALKANSKE ENDEMSKE  
NEFROPATIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2024. godine



UNIVERSITY OF BANJA LUKA

FACULTY OF MEDICINE



ŽANA RADIĆ SAVIĆ

**THE ASSOCIATION OF REGULATORY AND  
CATALYTIC ANTIOXIDANT GENE  
POLYMORPHISMS WITH THE RISK OF  
BALKAN ENDEMIC NEPHROPATHY**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2024.

**MENTOR:**

Prof. dr Tatjana Simić, dopisni član SANU, redovni profesor, uža naučna oblast Medicinska i klinička biohemija, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

---

**KOMENTOR:**

Prof. dr Bosa Mirjanić-Azarić, vanredni profesor, uža naučna oblast Medicinska biohemija, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

---

**ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:**

Prof. dr Marija Matić, vanredni profesor, uža naučna oblast Medicinska i klinička biohemija, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, predsjednik komisije

---

Prof. dr Ranko Škrbić, redovni profesor, uža naučna oblast Farmakologija i toksikologija, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, član komisije

---

Prof. dr Radoslav Gajanin, redovni profesor, uža naučna oblast Patologija, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, član komisije \_\_\_\_\_

Doc. dr Vesna Ćorić, docent, uža naučna oblast Medicinska i klinička biohemija, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, član komisije \_\_\_\_\_

Doc. dr Vanja Vidović, docent, uža naučna oblast Humana genetika, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, član komisije \_\_\_\_\_

**DATUM ODBRANE**

**Mentor:** Prof. dr Tatjana P. Simić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dopisni član SANU.

**Komentor:** Prof. dr Bosa Mirjanić-Azarić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci.

**Naslov doktorske disertacije:** Ispitivanje povezanosti polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak Balkanske endemske nefropatije

**Rezime:** Balkanska endemska nefropatija (BEN), oblik hroničnog tubulointersticijskog nefritisa, pogađa stanovništvo pojedinih endemskih sela u aluvijalnim dolinama uz pritoke rijeke Dunav u Bosni i Hercegovini, Srbiji, Hrvatskoj, Bugarskoj i Rumuniji. Među svim karakteristikama ove bolesti, najneobičniji znak je njena snažna povezanost sa urotelnim karcinomom. Decenije intenzivnog istraživanja etiologije BEN sugerišu se da je izlaganje aristolohičnoj kiselini (AA) pravi „krivac”. Složen ćelijski metabolizam AA dovodi do poremećene redoks homeostaze i prekomjernog stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika. Štaviše, prekomerni oksidativni stres kod pacijenata sa BEN može biti povezan sa specifičnim antioksidativnim genetskim profilom. Važno je istaći da polimorfizmi, kako delecioni tako i po tipu zamjene jednog nukleotida, u genima koji kodiraju regulatorne i katalitičke antioksidativne proteine rezultiraju izmijenjenom ekspresijom i/ili oslabljenom antioksidativnom aktivnošću ovih proteina. Stoga je cilj ovog istraživanja bio da se analiziraju pojedinačni, kombinovani i kumulativni efekti polimorfizama antioksidantnih gena (*Nrf2* rs6721961, *KEAP1* rs1048290, *GSTPIAB* rs1695, *GSTPICD* rs1138272, *GPX3* rs81771412 i *MDR1* rs1045642), kao i *GSTPIABCD* haplotipovi sa rizikom za razvoj BEN i pridruženog karcinoma urotelnih ćelija. Sprovedena je studija slučajeva i kontrola u koju je bilo uključeno 209 pacijenata sa dijagnozom BEN i 140 zdravih kontrola iz endemskih područja. Genotipizacija je izvedena korišćenjem *Real Time*-lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) i PCR metodom sa dva seta prajmera (PCR-CTTP). Rezultati su pokazali da pacijentkinje koje nose oba *varijanta* alela *GPX3*\*C rs8177412 i *MDR1*\*T rs1045642 u kombinaciji pokazuju značajan rizik prema BEN (OR 1 = 3,34, 95% IP = 1,16–9,60, p = 0,022; OR2 = 3,79, 95% IP = 1,27–11,24, p = 0,016). Haplotip koji se sastoji od *varijantnih* alela (\*G i \*T) za oba polimorfizma bio je povezan sa 1,6 puta povećanim rizikom za BEN, iako je statistička značajnost izostala (OR = 1,64; 95% IP = 0,75–3,58; p = 0,210). Što se tiče polimorfizma *GPX3* rs8177412, *varijantni* oblik gena, koji daje nižu ekspresiju, je povezan sa značajnim povećanjem rizika od karcinoma gornjeg urotela. Nosioi *varijantnih* oblika genotipa

*GPX3\*TC\*CC* imali su osmostruko povećan rizik od razvoja urotelnih tumora povezanih sa BEN (OR = 8,48, 95%IP = 3,60–19,30, p = 0,001). Nije bilo pojedinačnog ili kombinovanog uticaja na razvoj BEN i tumora povezanih sa BEN među ostalim ispitivanim polimorfizmima. Iz ovog bi se moglo zaključiti da polimorfizmi gena uključeni u antioksidantnu odbranu imaju ulogu u nastanku BEN i udruženih tumora, što ukazuje na značajnu ulogu sistemskog oksidativnog stresa i neadekvatne eliminacije krajnjih proizvoda metabolizma aristolohijske kiseline kod žena. Stoga, pacijente sa BEN koji nose *varijantne* oblike *GPX3* i *MDR1* genotipa treba češće pratiti u cilju ranijeg otkrivanja bolesti, i prepoznavanju pacijenata koji imaju veći rizik za razvoj urotelnog tumora.

**Ključne riječi:** Balkanska endemska nefropatija, aristolohijska kiselina, urotelni tumori, oksidativni stres, *Nrf2*, *KEAP1*, *GSTP1*, *GPX3*, *MDR1* polimorfizmi

**Naučna oblast:** Medicinske i zdravstvene nauke

**Naučno polje:** Medicinske nauke

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrniku:** B 190

**Tip odabrane licence Kreativne zajednice:** Autorstvo - nekomercijalno (CC BY - NC)

**Mentor:** Tatjana P. Simić, Full Professor at the Faculty of Medicine, University of Belgrade; Corresponding member of Serbian Academy of Sciences and Arts.

**Co-mentor:** Bosa Mirjanić-Azarić, Associate Professor at the Faculty of Medicine, University of Banja Luka.

**Doctoral thesis:** The association of regulatory and catalytic antioxidant gene polymorphisms with the risk of Balkan endemic nephropathy

**Summary:** Balkan endemic nephropathy (BEN), a form of chronic tubulointerstitial nephritis, affects the population of certain endemic villages in the alluvial valleys of the Danube River tributaries in Bosnia and Herzegovina, Serbia, Croatia, Bulgaria and Romania. Among other characteristics of this disease, the most unusual hallmark is its strong association with upper tract urothelial carcinoma. Decades of intensive research on BEN aetiology suggest that exposure to aristolochic acid (AA) is the true "culprit". The complex cellular metabolism of AA is leading to impaired redox homeostasis, and excessive generation of reactive oxygen species. Moreover, excessive oxidative stress in BEN patients could be related to a specific antioxidant genetic profile. It is important to point out that both deletions and single nucleotide substitutions in genes encoding regulatory and catalytic antioxidant proteins result in altered expression and/or impaired antioxidant activity of these proteins. Therefore, this study aimed to assess the individual, combined and cumulative effects of antioxidant gene polymorphisms (*Nrf2* rs6721961, *KEAP1* rs1048290, *GSTPIAB* rs1695, *GSTP1CD* rs1138272, *GPX3* rs81771412 and *MDR1* rs1045642) with the risk of BEN and BEN-associated urothelial cancer development. Moreover, the effect of the *GSTPIABCD* haplotype in terms of BEN and urothelial tumors was evaluated. A case-control study was conducted in which 209 patients diagnosed with BEN and 140 healthy controls from endemic areas were included. Genotyping was performed using the Real-Time polymerase chain reaction (RT-PCR) and polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTTP). The results showed that female patients carrying both variant alleles of *GPX3*\*C rs8177412 and *MDR1*\*T rs1045642 in combination showed a significant risk of BEN (OR 1 = 3.34, 95% CI = 1.16–9.60, p = 0.022; OR2 = 3.79, 95% CI = 1.27–11.24, p = 0.016). In addition, the haplotype consisting of variant alleles (\*G and \*T) for both polymorphisms was associated with a 1.6-fold increased risk of BEN, although statistical significance was lacking (OR = 1.64; 95% CI = 0.75– 3.58; p = 0.210). Regarding the *GPX3* rs8177412 polymorphism, we observed a significant association of *GPX3* rs8174412 polymorphism with the risk of urothelial carcinoma. Carriers of variant

forms of the *GPX3*\*TC + CC genotype had an eightfold increased risk of developing urothelial tumors associated with BEN (OR = 8.48, 95% CI = 3.60–19.30, p = 0.001). There was no single or combined association of other investigated polymorphisms with BEN and BEN-related tumors. In conclusion, these results indicate a significant role of systemic oxidative stress and inadequate elimination of end-products of aristolochic acid metabolism in women. It should be emphasized that patients with BEN carrying variant forms of *GPX3* and *MDR1* genotypes should be monitored more frequently for detecting the earlier stages of the disease, and potentially recognize patients who have a higher risk of developing urothelial tumors.

**Keywords:** Balkan endemic nephropathy, aristolochic acid, urothelial tumors, oxidative stress, *Nrf2*, *KEAP1*, *GSTP1*, *GPX3*, *MDR1* polymorphisms

**Scientific field:** Medical Sciences

**Narrow scientific area:** Medical biochemistry

**Classification code of the scientific area by CERIF codebook:** B 190

**Type of the selected license of the Creative Commons how to use the content of the doctoral dissertation:** Attribution - Non-Commercial – Share Alike

*Ovu stranicu želim da iskoristim kako bih se zahvalila velikom broju ljudi koji su na najrazličitije načine pomogli da ova doktorska disertacija nastane:*

*Zahvalnost dugujem svom mentoru, dopisnom članu SANU Prof. dr Tatjani Simić, koja mi je dala šansu da budem dio njenog sjajnog tima, a svojim bogatim znanjem i iskustvom oblikovala ovaj rad i bila njegov idejni tvorac. Hvala Vam na privilegiji da budem Vaš učenik.*

*Srdačno se zahvaljujem prof. dr Mariji Matić na bezrezervnoj podršci, toplim majčinskim savjetima i zalaganju za mene. Hvala Vam na ohrabrenju i korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije i pisanja rada.*

*Dragoj doc. dr Vesni Ćorić, koja je do poslednjeg dana izrade ove disertacije bila dostupna za stručni i prijateljski savjet, želim da zahvalim na divnom prijateljstvu i neprocjenjivoj pomoći u svim etapama ove disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Ranku Škrbiću, dekanu Medicinskog fakulteta, na ukazanoj prilici, pomoći i podršci u svim faza mog naučno-istraživačkog stasavanja.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem i prof. dr Radoslavu Gajaninu, čija su pomoć i podrška bili podsticaj u mom dosadašnjem radu, roditeljski pružena ruka otvorila vrata nauke, a vjera u mene bila nepogrešivi putokaz ka srećnom kraju ove priče.*

*Takođe se zahvaljujem i ostalim članovima tima, komentoru prof. dr Bosi Mirjanić-Azarić, članu komisije doc. dr Vanji Vidović, prof. dr Stojku Vidoviću, doc. dr Irini Milovac i master biologu Jeleni Bećarević koji su bili velika pomoć u mojim prvim koracima eksperimentalnog rada i time doprinijeli realizaciji ove doktorske disertacije.*

*Hvala mojim dragim prijateljicama Ljubici i Sanji na nezaboravnim putešestvijama endemskim područjima Republike Srpske. Prijateljicama Vanji, Ranki i Mirni dugujem zahvalnost na ljubavi i razumijevanju koja nikada nije izostala.*

*Mnogo puta zaboravljamo zahvaliti ljudima koji prave najveće razlike u životu. Mojoj sjajnoj porodici, tati Goranu, mami Miri i bratu Ognjenu, dugujem jedno beskrajno hvala na ljubavi, strpljenju, vjeri u mene, riječima podrške i hrabrosti koji su bili moj vjetear u leđa svih prethodnih godina. Hvala vam za lavovsku borbu i trud uloženi u moje obrazovanje, za svaku lekciju koja me je naučila kako ne posustati u teškim trenucima, optimizmu, vjeri u ljude i naše bolje sutra.*



*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mom vjernom saborcu, divnom suprugu i još divnijem tati **Pani** i mojoj **Iskri**, koja je oplemenila moj rad i moj cijeli život. Moje bogatstvo ne leži u materijalnim stvarima, već u posjedovanju vas. Vi ste središte mog univerzuma i ono najvrijednije što imam.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1 BALKANSKA ENDEMSKA NEFROPATIJA .....	1
1.2 ETIOLOGIJA .....	2
1.2.1 Ekspozicija aristolohijske kiseline kao uzrok BEN .....	2
1.2.2 Uloga genetskih faktora u predispoziciji za nastanak BEN .....	4
1.2.3 Metabolizam aristolohijske kiseline .....	6
1.3 POVEZANOST BEN SA MALIGNIM TUMORIMA GORNJEG UROTELIJUMA .....	8
1.4 ZNAČAJ OKSIDATIVNOG STRESA U NASTANKU BEN I TUMORA GORNJEG UROTELIJUMA .....	10
1.4.1 Oštećenje mitohondrija dejstvom aristolohijske kiseline .....	11
1.4.2 Smanjenje antioksidativnog kapaciteta u BEN .....	13
1.5 REGULATORNI I KATALITIČKI ANTIOKSIDANTNI PROTEINI U BEN .....	13
1.5.1. Polimorfizmi regulatornih i katalitičkih antioksidantnih proteina .....	14
1.5.2 Nrf2/Keap1 signalni put .....	15
1.5.2.1 Uloga Nrf2 regulatornog proteina u BEN .....	19
1.5.2.2 Polimorfizam Nrf2 gena .....	19
1.5.2.3 Polimorfizam KEAP1 gena .....	20
1.5.3 Glutation transferaze .....	21
1.5.3.1. Glutation transferaza P .....	22
1.5.3.2. Polimorfizam GSTP1 .....	22
1.5.4 Glutation peroksidaza 3 .....	24
1.5.5 MDR1 (P-glikoprotein) .....	26
1.5.6 Značaj ispitivanja polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u BEN .....	29
<b>2. CILJEVI</b> .....	31
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	32
3.1 SELEKCIJA ISPITANIKA .....	32
3.2 METODE ZA ODREĐIVANJE REGULATORNIH I KATALITIČKIH ANTIOKSIDANTNIH PROTEINA .....	33
3.2.1 Izolacija DNK .....	33
3.2.2 Određivanje <i>Nrf2</i> polimorfizma (rs6721961) .....	34
3.2.3 Određivanje polimorfizama gena za antioksidantne proteine metodom RT-PCR .....	36

3.2.3.1	Određivanje polimorfizma KEAP1 gena (rs1048290) .....	37
3.2.3.2	Određivanje polimorfizama GSTP1 gena (rs1695, rs1138272) .....	37
3.2.3.3	Određivanje polimorfizma GPX3 gena (rs8177412).....	38
3.2.3.4	Određivanje polimorfizma MDR1 gena (rs1045642).....	38
3.3.	STATISTIČKA ANALIZA .....	38
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>40</b>
4.1	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA .....	40
4.2	POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE SA RIZIKOM ZA NASTANAK BEN 41	
4.3	POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE SA RIZIKOM ZA NASTANAK BEN U ODNOSU NA POL.....	46
4.4	KOMBINOVANI EFEKAT POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE NA RIZIK ZA NASTANAK BEN .....	50
4.5	POVEZANOST KOMBINOVANIH POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE RIZIKOM ZA NASTANAK BEN U ODNOSU NA POL.....	53
4.6	ANALIZA POVEZANOSTI HAPLOTIPA GENA ZA GSTP1 SA RIZIKOM ZA NASTANAK BEN.....	58
4.7	KUMULATIVNI EFEKAT POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE NA RIZIK ZA NASTANAK BEN .....	59
4.8	UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTI-OKSIDANTNE PROTEINA NA POJAVU TUMORA GORNJEG UROTELIJUMA U BALKANSKOJ ENDEMSKOJ NEFROPATIJU.....	61
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>77</b>
	<b>LISTA SKRAĆENICA</b> .....	<b>96</b>

## 1. UVOD

### 1.1 BALKANSKA ENDEMSKA NEFROPATIJA

Balkanska endemska nefropatija (BEN), hronična tubulointersticijska bolest bubrega koju karakteriše podmukao početak i postepena progresija do terminalne bubrežne slabosti, prvi put opisana je prije više od pola vijeka [1,2]. Bolest pogađa stanovnike u aluvijalnim dolinama poljoprivrednih sela koja se nalaze uz pritoke rijeke Dunav u Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj, Makedoniji, Srbiji, Bugarskoj i Rumuniji (*Slika 1*) [3–6].



*Slika 1. Distribucija BEN u BiH, Hrvatskoj, Srbiji, Bugarskoj i Rumuniji*  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Danubian\\_endemic\\_familial\\_nephropathy#/media/File:Balkan\\_endemic\\_nephropathy\\_map.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Danubian_endemic_familial_nephropathy#/media/File:Balkan_endemic_nephropathy_map.svg))

Najistaknutije karakteristike BEN su endemska priroda i porodični obrazac distribucije, dok je geografska distribucija ostala iznenađujuće konstantna još od prvih opisa ove bolesti 50-ih godina prošlog vijeka [7,8]. BEN se najčešće otkriva između 40 i 60 godine, i ima dug period latencije. Podjednako su pogođena oba pola, uz neznatnu prevlast žena, a procjenjuje se da je oko 100.000 pojedinaca u riziku, dok oko 25.000 ima bolest [3,5,9]. Ipak, tačan broj oboljelih u Bosni i Hercegovini je nepoznat, a poslednjih se decenija učestalost BEN procjenjuje na osnovu podataka o broju osoba sa ovim oboljenjem koji su započeli liječenje hemodijalizama (10). BEN je bolest, sa iznenadnim početkom, koja vodi ka terminalnom stadijumu bubrežne bolesti. Najveća oštećenja zabilježena su na nivou nefrona i proksimalnih tubula koja posljedično dovode do aminoacidurije i tubularne proteinurije. Klinički simptomi, kao i genetski i biohemijski markeri BEN su oskudni i nespecifični tako da bolest dugo ostaje

neprepoznata. Kao jedan od tipičnih nalaza kod BEN predloženo je prisustvo  $\beta$ 2-mikroglobulinurije, iako se ona može pojaviti i kod zdravih rođaka oboljelih od BEN, kao i djece iz porodica zahvaćenih ovim oboljenjem (12,13). Nakon toga veliki broj proteina je ispitivan u cilju otkrivanja tipičnog biohemijskog markera za BEN. Međutim, nijedan od ispitivanih markera nije pokazao visoku specifičnost i senzitivnost. Predloženo je da skup epidemioloških, kliničkih i biohemijskih karakteristika zajedno sa specifičnim obrascem patoloških promjena, u odsustvo bilo koje druge bubrežne bolesti, budu veoma sugestivni kriterijumi za dijagnozu BEN u pogođenim zemljama [8,9,13].

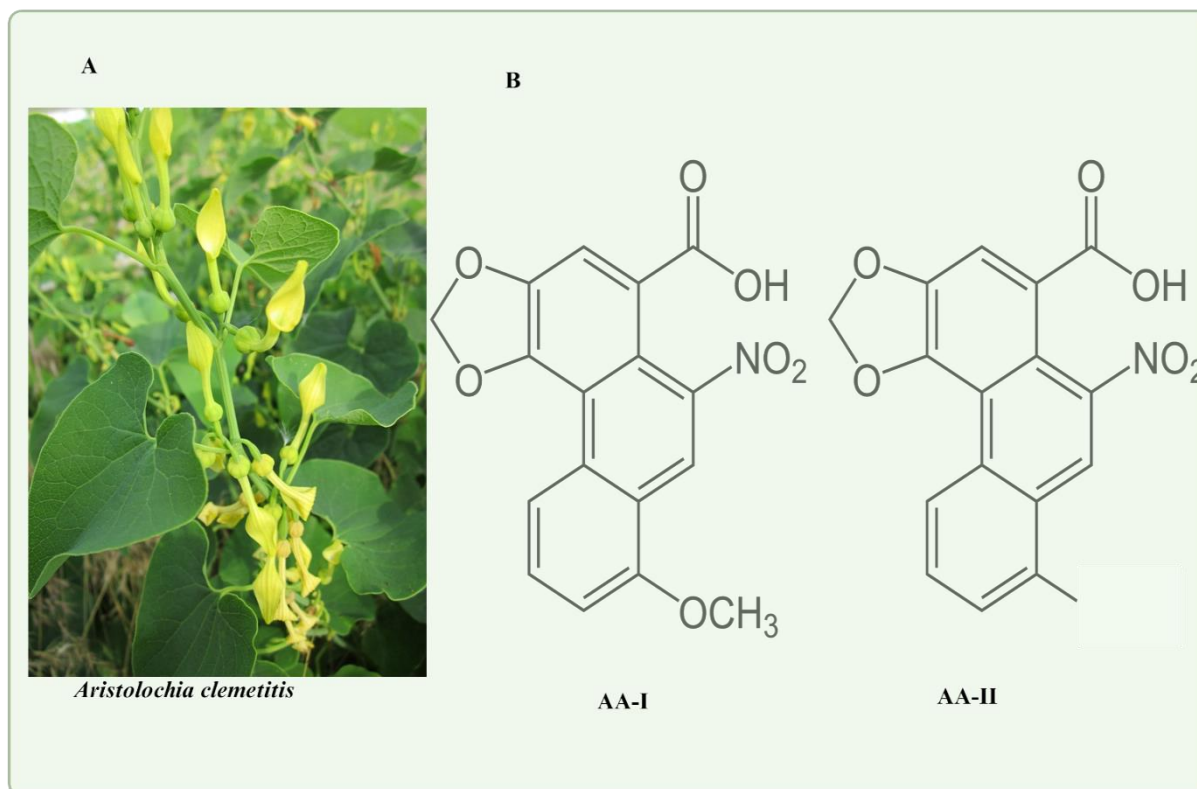
## 1.2 ETIOLOGIJA

Decenijska istraživanja iznjedrila su nekoliko hipoteza o etiologiji BEN, iako je danas većina tih teorija odbačena [3,5–7,9,14–16]. S tim u vezi, istražena je i uloga brojnih etioloških faktora. Među njima najaktuelnije su bile tri teorije koje su uključivale sredinske faktore kao uzrok ove bolesti: (1) hipoteza aristolohijske kiseline (engl. *Aristolochic acid*; AA), koja smatra da bolest nastaje uslijed hronične intoksikacije aristolohijskom kiselinom (Slika 2), (2) hipoteza o ohratoksinu A, mikotoksinu za koga se dugo smatralo da učestvuje u nastanku BEN, i (3) hipoteza pliocenskog lignita, koja je predlagala da je uzrok bolesti dugotrajna izloženost policikličnim aromatičnim ugljovodonicima i drugim toksičnim organskim jedinjenjima u vodi za piće u blizini endemskih naselja [4,7]. Od svih pomenutih, jedna hipoteza o etiologiji BEN, kojoj se danas poklanja najviše pažnje, se naročito istakla. Naime, hronično izlaganje aristolohijskoj kiselinu, odnosno toksinu koji proizvode biljke iz roda *Aristolochia* je predloženo kao uzročni faktor endemske nefropatije na Balkanu. Terenska i eksperimentalna istraživanja u prethodnoj deceniji pružila su ubjedljive dokaze koji idu u prilog AA, te je ekspozicija ovoj kiselinu definisana kao primarni uzročnik BEN, sa specifičnom ulogom u razvoju tumora povezanih sa BEN. Zaista, ekspozicija pacijenata sa BEN ovoj kiselinu je do sada dokumentovana u velikom broju studija [3,5,5,7,9,15,17,18].

### 1.2.1 Ekspozicija aristolohijskoj kiselinu kao uzrok BEN

*Aristolochia clematitis* (Slika 2A), u zemljama Evropskog kontinenta poznatija kao Vučja šapa, pronađena je na lokalnim žitnim poljima endemskih regiona, dok noviji dokazi sugerišu da neki usjevi mogu bioakumulirati AA iz zemlje i vode [5]. Zapravo, prirodni ekstrakt ove biljke glavni je krivac za toksične efekte, a sastoji se od strukturno srodnih nitrofenantren

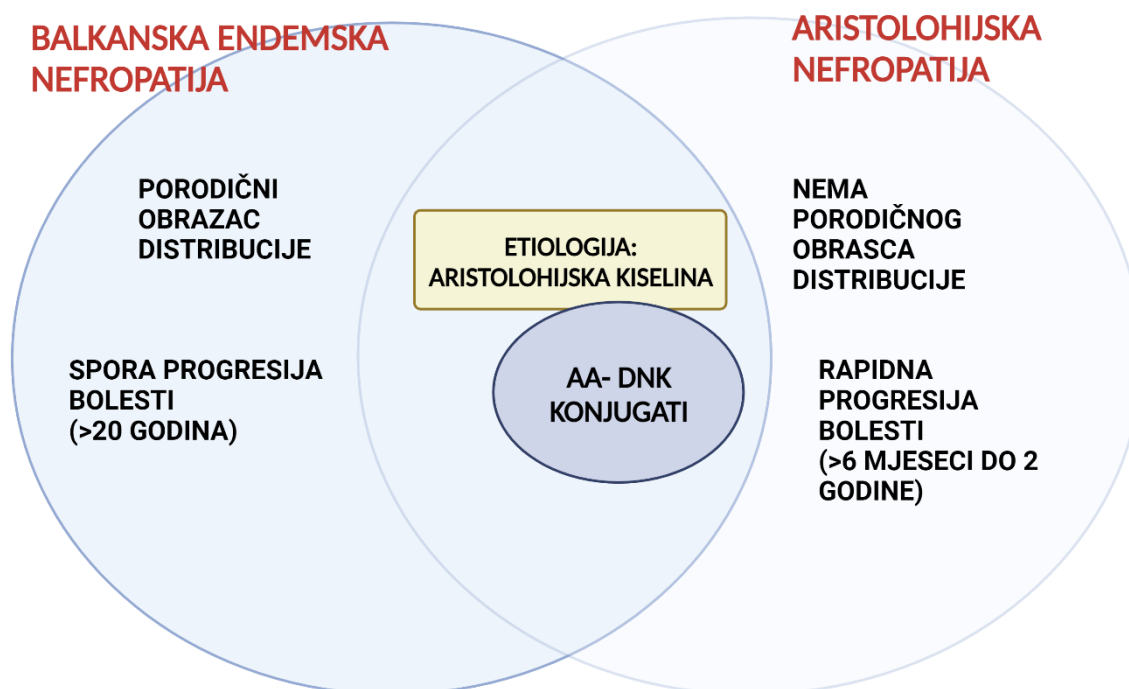
karboksilnih kiselina, među kojima su aristolohijska kiselina I (engl. Aristolochic acid I; AA-I) i aristolohijska kiselina II (engl. Aristolochic acid II; AA-II) glavne komponente [19] (Slika 2B).



**Slika 2.** *Aristolochia clematitis* (A) i formule dvije najvažnije komponente AA (B), aristolohijska kiselina I (AA-I) i aristolohijska kiselina II (AA-II), prilagođeno prema Stiborova et al., 2013. [8]

Preteča današnjih saznanja su istraživanja Ivić i saradnika koji su hipotezu o uključenosti AA u etiologiju BEN-a predložili davne 1967. godine [20], pretpostavljajući da je unos brašna kontaminiranog sjemenom biljaka iz roda *Aristolochia* stvarni uzrok BEN. Brojne *in vivo* studije pružile su dokaze o uključenosti AA u etiologiju endemske nefropatije. Naime, eksperimentalni miševi kojima je davano sjeme AA razvili su oštećenje bubrega, koja su patohistološki izuzetno ličila na histološke nalaze bubrega kod BEN pacijenata. Šta više, u pomenutoj studiji je potvrđen i kancerogeni potencijal ove biljke zapažanjem da su pacovi na mestu injekcije vodenog ekstrakta *Aristolochia clematitis* razvili tumore [20]. Premda su ovi rezultati pružili dosta uvjerljive dokaze o uključenosti AA u razvoj BEN, ova zapažanja decenijama su ostala zanemarena. Spekulacije o ulozi AA u etiologiji endemske nefropatije počinju opet 90-ih godina prošlog vijeka kada se na jednoj klinici u Briselu razvila nefropatija

kod žena koje su pile tablete za mršavljenje sa kineskim biljem, slučajno, kontaminiranim nefrotoksičnom AA [21,22]. Pored toga, o AA kao uzroku nefropatije svjedoči i sličnost BEN sa oboljenjem bubrega poznatijm kao nefropatija kineskog čaja (*engl. Chinese herb nephropathy, CHN*) (Slika 3). Naime, ne mali broj studija pokazao je da AA dovodi do bolesti u Kini, veoma sličnoj endemskoj nefropatiji na Balkanu [22–24]. U svojoj studiji *De Broe* je na osnovu kliničkih i patohistoloških karakteristika obje bolesti došao do zaključka da nefropatija kineskog čaja i endemska nefropatija čine dva entiteta jedne široko rasprostranjene bolesti, kasnije definisane kao aristolohijska nefropatija (*engl. Aristolochic acid nephropathy, AAN*) [24].



*Slika 3. Sumirane sličnosti i razlike između Balkanske endemske nefropatije i aristolohijske nefropatije u pogledu epidemioloških, kliničkih i etioloških karakteristika; Pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com).*

### 1.2.2 Uloga genetskih faktora u predispoziciji za nastanak BEN

Pored sredinskih faktora, u prvom redu AA, porodični obrazac distribucije BEN sugeriše multifaktorsku prirodu ove bolesti koja potencijalno uključuje genetsku predispoziciju pojedinaca za razvoj BEN [25]. Hipoteza multifaktorijalne etiologije predviđa da bi efekti

genetskih faktora i faktora životne sredine u kombinaciji mogli da učestvuju u etiopatogenezi BEN. U studiji koja je sprovedena u Bugarskoj potvrđen je porodični obrazac bolesti, koji upućuje na ulogu genetskih faktora u etiologiji ove bolesti. Naime, u studiji koja je obuhvatala 4077 ispitanika i 417 porodica autori su zaključili da su svi pacijenti sa BEN pripadali istim porodicama [25]. Zanimljivo je, čak, da su stanovnici iz neendemskih sela koji su bili članovi BEN porodica češće obolijevali. Šta više, rizik od razvoja BEN je bio mnogo veći kod prvostepenih nego drugostepenih i bio znatno slabiji kod daljih rođaka. U prilog važne uloge genetskih faktora govori i činjenica da ne obolijevaju svi stanovnici u endemskom području, koji su podjednako izloženi AA [15,26]. Naime, u pomenutoj studiji je zapaženo da je oko 10% stanovnika endemskih regiona razvilo bolest [27]. Sve ovo moglo bi biti posljedica endogenih faktora kao što su efikasnost detoksikacije i/ili bioaktivacije AA, nivoa ekspresije i aktivnosti enzima uključenih u biotransformaciju AA i/ ili njihovih genetskih polimorfizama.

Jedna od prvih genetskih studija pokazala je da je određeni procenat zdravih ispitanika iz BEN porodica imao poseban oblik lipidnih abnormalnosti povezanih sa abnormalnom aktivnošću LCAT, a moguća povezanost između ovih abnormalnosti i etiologije BEN i dalje nije razjašnjena [3,28].

Nakon toga broj istraživanja koji se bavio izučavanjem genetskih faktora u etiologiji BEN je rastao. Neke studije su predstavile rezultate koji pokazuju da je alel *CYP3A5\*1*, koji se povezuje sa smanjenom ekspresijom *CYP3A5* u bubrezima, povezan sa povećanim rizikom od BEN, dok genotipovi *CYP3A4\*1B* i *CYP2D6* ne modifikuju značajno rizik od bolesti [29]. Takođe je pronađeno da se alel *GSTM1* wild type povezuje sa BEN. Značajno niža prevalencija *GSTM1* delecionih homozigota među pacijentima sa BEN sugerise da bi osobe koje nose *GSTM1*-null genotip mogle biti u manjem riziku [30]. Pored toga, neki rezultati su utvrdili da aleli *NQO1\*2* i *NQO1\*3* nisu uticali na BEN rizik [31]. Različite studije su ispitivale da li varijacije u genima koji su odgovorni za proteine uključene u antioksidantnu odbranu i metabolizam ksenobiotika, mogu da utiču na nastanak i razvoj BEN. S tim u vezi, istražena je uloga *CYP2D6*, *GSTA1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *NAT1* i *NAT2*, *MDR1* i drugih enzima i proteina iz sistema za detoksikaciju i odbranu od oksidativnog stresa [29,31–36].

Jedna od ranijih pretpostavki je da se pojava i česta povezanost BEN i tumora može objasniti hromozomskom hipotezom onkogeneze [88]. Prvo citogenetsko ispitivanje kod zdravih srodnika pacijenata sa BEN rođenim u neendemskim područjima urađeno je 1996. godine. Još tada je prepoznato da karakteristične hromozomskih anomalije koje utiču na opseg 3q25, neuobičajeno visoka učestalost stečenih hromozomskih aberacija i porodična istorija sa 1 ili 2



BEN roditelja. Prema tome, pretpostavljeno je da su ove osobe pod visokim rizikom za razvoj bolesti, te da bi genetski mehanizam mogao biti uključen u etiologiju BEN [76].

### 1.2.3 Metabolizam aristolohijske kiseline

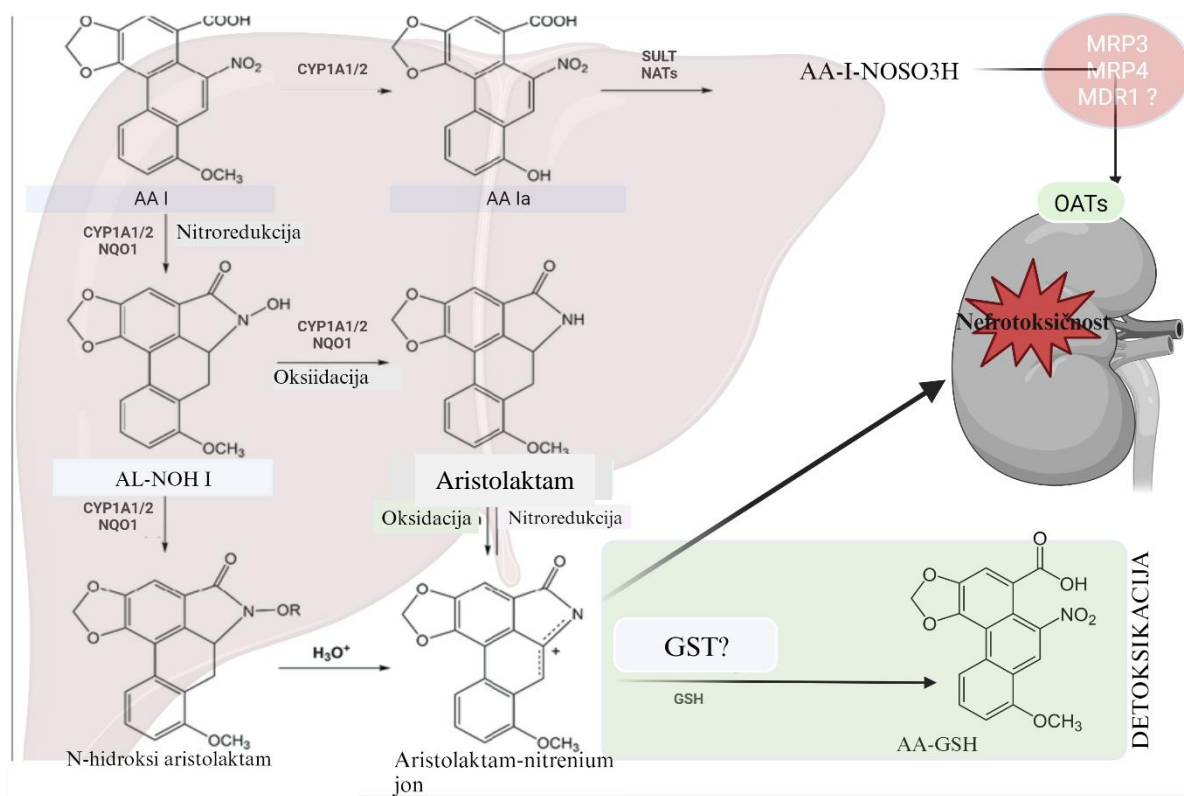
Tokom veoma složenog ćelijskog metabolizma AA, kroz brojne reakcije biotransformacije, dolazi do stvaranja međuproizvoda koji se na kraju mogu vezati za DNK, što je i ključna reakcija koja dovodi do nefrotoksičnosti i kancerogenih efekata ove kiseline [14,37–39]. Reakcije biotransformacije su podijeljene u tri faze; fazu I metabolizma čine reakcije oksidacije, redukcije, hidrolize, ciklizacije/deciklizacije, i reakcije u kojima dolazi do uklanjanja vodonika ili dodavanja kiseonika polarnijim molekulima. Reakcije koje su svrstane u II fazu nazivaju se reakcije konjugacije koje uključuju metilaciju, acetilaciju, sulfatizaciju, glukuronidaciju i konjugaciju glicinom ili glutationom. Prenos konjugata preko ćelijske membrane ponekad se naziva i III faza metabolizma, iako se ne mijenja hemijski oblik metabolita [40]. Studije o metabolizmu AA potvrdile su uključenost enzima sve tri faze, stoga je identifikacija ključnih enzima i transportera uključenih u metabolizam i bioaktivaciju AA od posebne važnosti za razumijevanje i procjenu osjetljivosti pojedinca na ovaj kancerogen. [37,41]. U I fazi biotransformacije AA, potvrđeno je da kroz reakcije nitroredukcije dolazi do transformacije AA i nastanka veoma toksičnih metabolita, N-hidroksi-aristolaktama I (AL-NOH-I) i N-hidroksi-aristolaktama II (AL-NOH-II) čemu svjedoči i prisustvo ovih metabolita u urinu i fecesu kod životinja i ljudi nakon ekspozicije AA. Prema rezultatima *in vitro* studija, među citosolnim reductazama, NAD(P)H-kinon oksidoreduktaza (NQO1) i NADPH-CYP reductaza (CPR) igraju najvažniju ulogu u aktivaciji AA u jetri i bubrezima. Ovo potkrijepljuju i rezultati *in vivo* studija u kojima su miševi tretirani dikumarolom, inhibitorom NQO1, pokazali smanjenu nefrotoksičnost i viši nivo netoksičnog demetiliranog metabolita, u poređenju sa toksičnim reduktivnim metabolitima u urina [42]. U reakcijama oksidativne demetilacije katalizovane citohrom P450 enzimima (CYP P450), prvenstveno CYP1A1 i CYP1A2, dolazi do formiranja manje toksičnog metabolita, 8-hidroksiaristolohne kiseline I (AA-Ia), koja se smatra metabolitom detoksikacije (*Slika 4*) [43,44]. Značaj CYP1A1 i CYP1A2 da katalizuju O-demetilaciju AA-I u AA-Ia potvrđen je u *in vivo* studijama [45], u kojima je pokazano da su nefrotoksični efekti nakon tretmana sa AA bili veći kod miševa bez CYP1A. Šta više, aktivatori CYP1A kod glodara doveli su do supresije formiranja DNK adukata i smanjene nefrotoksičnosti izazvane AA [46,47].

Pored gore navedenih enzima, noviji eksperimentalni dokazi sugerišu da su i enzimi druge faze metabolizma uključeni u metabolizam AA. U tom kontekstu, istražena je uloga N-

acetiltransferaza (NAT) i sulfotransferaze (SULT) u nefrotoksičnosti izazvanoj AA. Iako je na početku uloga NAT bila dvosmislena [48], u *in vitro* studiji Okuno i sar. su nedavno ispitali ulogu reakcija konjugacije u genotoksičnosti izazvanoj AL-NOH-I sugerišući da su NAT direktno uključeni u metabolizam AA. Zaključci studije upućuju na nedvosmisleni ulogu NAT, ali i SULT u biotransformaciji AA, sugerišući da su sojevi koji su eksprimirali humani NAT, *SULT1A1* i *SULT1A2* pokazali povećanu genotoksičnost N-hidroksi-aristolaktama [49]. Nedavne studije koje sugerišu ulogu SULT u biotransformaciji AA, zaključuju da bi povećavanje nefrotoksičnosti uzrokovane djelovanjem AA, moglo biti posljedica formiranja adukta sa DNK [50–52], u reakcijama koje katalizuju SULT. Pretpostavlja se da bi AL-NOH mogao poslužiti kao supstrat za SULT, pretvarajući ih u N-sulfatne estre, za koje je pokazano da još efikasnije reaguju sa DNK, što bi svakako moglo da pojača nefrotoksične efekte AA [51,52].

Na suprot pomenutim enzimima uključenim u aktivaciju AA, rezultati najnovijih istraživanja govore u prilog činjenici da su glutathion transferaze (GST), enzimi II faze metabolizma, važne u detoksikaciji AA [53,54]. Naime, jedan od metabolita nastao tokom prve faze biotransformacije AA, aristolaktam-nitrenijum jon, može da se konjuguje sa glutathionom [53], u reakcijama u kojima bi mogli da učestvuju enzimi druge faze metabolizma ksenobiotika, među kojima je i GST (*Slika 5*). Dokumentovani su i dodatni dokazi koji upućuju na ulogu GST u biotransformaciji AA. Naime, studija o metabolizmu AA pokazala je da se i AA-I, već pomenuta najtoksičnija komponenta AA, može direktno vezati za glutathion u reakcijama koje vjerovatno katalizuju GST [54].

Neke eksperimentalne studije sugerišu da pojedini enzimi III faze metabolizma, za koju je već pomenuto da uključuje prenos konjugata preko ćelijske membrane, takođe učestvuju u metabolizmu AA. Nakon nitroredukcije AA-I u AL-NOH-I, ovaj potonji se pretvora u aristolaktam-N-sulfat (AL-NOSO<sub>3</sub>H), toksični metabolit koji se zatim transportuje iz jetre putem transmembranskih proteina koji pripadaju porodici ABC transportera (*engl. ATP-binding cassette; ABC*), a zatim u bubreg preko OAT (*engl. Organ anion transporter*) transportera (*Slika 4*) [55].



**Slika 4.** Predloženi put metaboličke aktivacije i detoksikacije aristolohijske kiseline I (AAI).

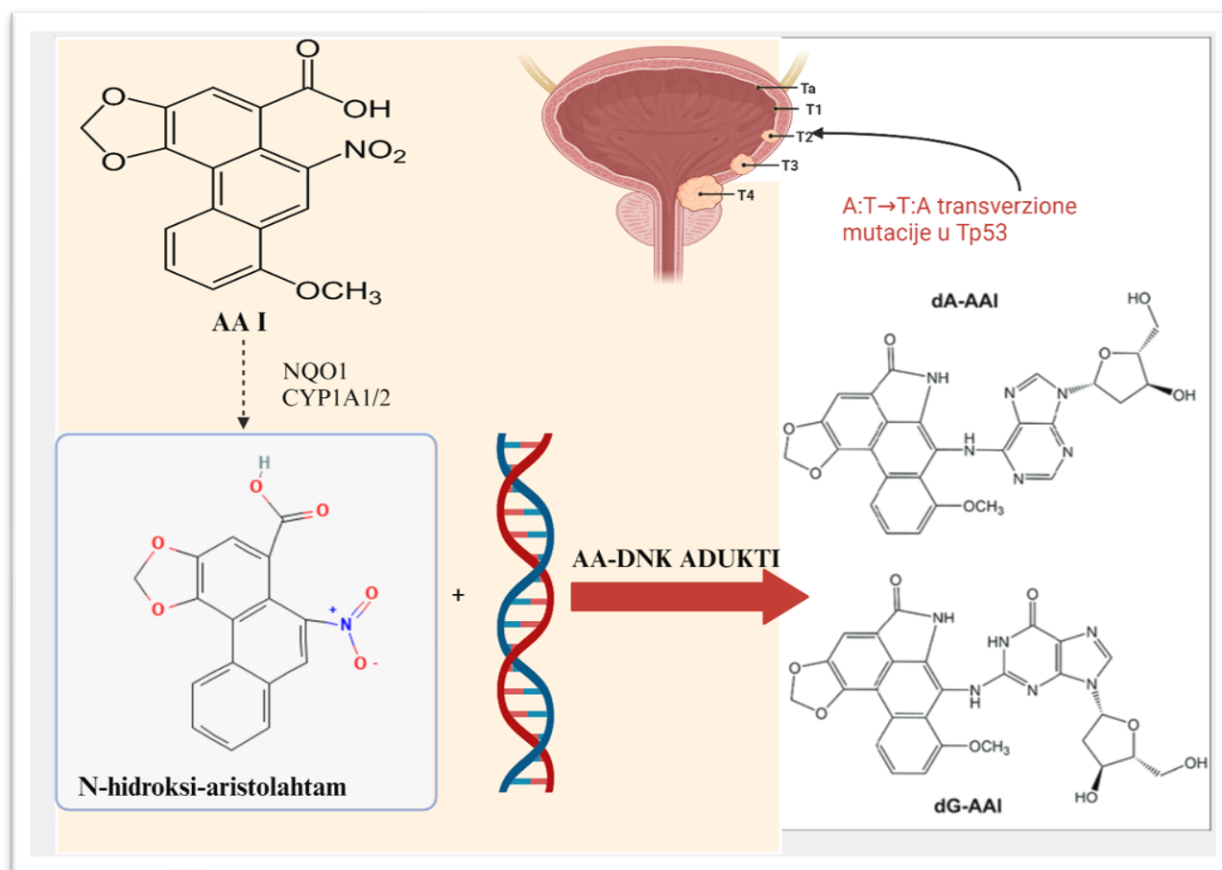
Pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

8 hidroksiaristolohna kiselina I (AA-Ia); aristolaktam-N-sulfat (AL-NOSO3H); N-hidroksi-aristolaktama I (AL-NOH-I); citohrom P (CYP); sulfotransferaze (SULT); N-acetiltransferaze (NAT); NAD(P)H-kinon oksidoreduktaza (NQO1); organski anjonski transporter (OAT); glutation S transferaza (GST).

### 1.3 POVEZANOST BEN SA MALIGNIM TUMORIMA GORNJEG UROTELIJUMA

Jedno od najznačajnijih obilježja BEN je udruženost sa visokom učestalošću malignih tumora gornjeg urotelijuma, koja je zapažena još u prvim opisima bolesti [4,17,56,57]. Veza između intoksikacije AA i tumora urotelijuma je dokumentovana kako u kliničkim studijama [4,56,58–60], tako i u eksperimentalnim studijama [23,55,61–63]. Raniji podaci navode da pacijenti oboljeli od BEN imaju, čak i do 100 puta, veću prevalenciju tumora gornjeg urotelijuma [4,56], iako se razlika poslednjih decenija smanjuje [64]. Ovi tumori se najčešće javljaju kod bolesnika koji već boluju od BEN, ali je pojava tumora zabilježena i kod onih koji prethodno nisu imali postavljenu dijagnozu ove bolesti [4,56]. Predmet mnogobrojnih istraživanja s ciljem pronalaska molekularnih dokaza o ulozi AA u etiologiji endemske

nefropatije bile su detekcija i kvantifikacija DNK konjugata u tkivima bubrega i urotelnim tumorima oboljelih pacijenata [40]. Kasnije publikacije su dodatno potvrdile tu činjenicu pokazujući da je nakupljanje specifičnih DNK adukata bilo prisutno u bubrežnom korteksu kod pacijenata iz endemske regije, ali nije pronađeno kod drugih bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabosti iz needemskih regiona. Uzimajući u obzir sve dostupne podatke, Međunarodna agencija za istraživanje tumora (*engl. The International Agency for Research on Cancer, IARC*) 2002. godine svrstala je aristolohijsku kiselinu u prvu grupu kancerogena, djelujući genotoksičnim mehanizmom [65]. Kao što je ranije opisano, tokom biotransformacije AA dolazi do stvaranja reaktivnih metaboličkih međuproizvoda koji mogu da reaguje sa egzocikličkim amino grupama purinskih baza DNK i grade specifične DNK-adukte, od kojih je dA-AAI dominantni i najpostojaniji adukt AA sa DNK (*Slika 6*). U službi biomarkera dugotrajne izloženosti AA ovi adukti se mogu akumulirati u ciljnim organima kao što su bubrezi, preciznije, bubrežni korteks. Takođe, dokazano je da u nekim tkivima, uključujući i gornji dio urogenitalnog sistema, AA uzrokuju mutacije Tp53 (*engl. Tumor protein 53; Tp53*) [66], tumor supresorskog gena koji igra ključnu ulogu u kancerogenezi [67]. Najčešće prijavljena mutacija je specifična AAG u TAG transverziona mutacija (A:T → T:A transverzija) u kodonu 139 (Lis → Stop) egzona 5 u Tp53 [63]. U kohorti oboljelih od endemske nefropatije u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini, mutacije Tp53 na parovima adenin-timin činile su 89 % svih mutacija od čega su većina bile A:T→T:A transverzije [45]. Predlagano je da AA-indukovano A:T → T:A transverziona mutacije u Tp53 genu u kombinaciji sa specifičnim AA-DNK aduktima mogu da se koriste kao relevantni biomarkeri izloženosti AA [68–70]. Osim stvaranja adukata sa DNK, sugerisano je da AA se takođe može vezati na RNK, što dovodi do formiranja adukata sa RNK [71], što bi takođe moglo doprinijeti AA-indukovanoj toksičnosti [39]. Važno je napomenuti da su adukti DNK sa AA i karakteristične A→T transverzije otkriveni u uzorcima maligno izmijenjenog tkiva bubrega koje je dobijeno od pacijenata sa BEN [72]. Ovi podaci bi mogli ukazivati na molekularni mehanizam koji objašnjava kako AA može da učestvuje na nastanku urotelnog maligniteta kod BEN pacijenata (*Slika 5*) [73–75].



**Slika 5.** Predloženi metabolički put AAI koji dovodi do aktivacije aristolohijske kiseline. Pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com), prilagođeno prema Anger et al, 2020 [39].

Aristolohijska kiselina I (AAI) se redukuje pomoću NAD(P)H: kinon oksidoreduktaze 1 (NQO1) i citohroma P450 1A1/1A2 (CYP1A1/2) u N-hidroksiaristolaktame, koji se dalje mogu vezati za DNK i formirati adukte AA-DNK, uključujući 7- (deoksiadenozin-N6-il) aristolaktam I (dA-AAI) i 7- (deoksigvanozin-N2-il) aristolaktam I (dG-AAI). Ovi adukti DNK dovode do mutacija gena Tp53.

#### 1.4 ZNAČAJ OKSIDATIVNOG STRESA U NASTANKU BEN I TUMORA GORNJEG UROTELIJUMA

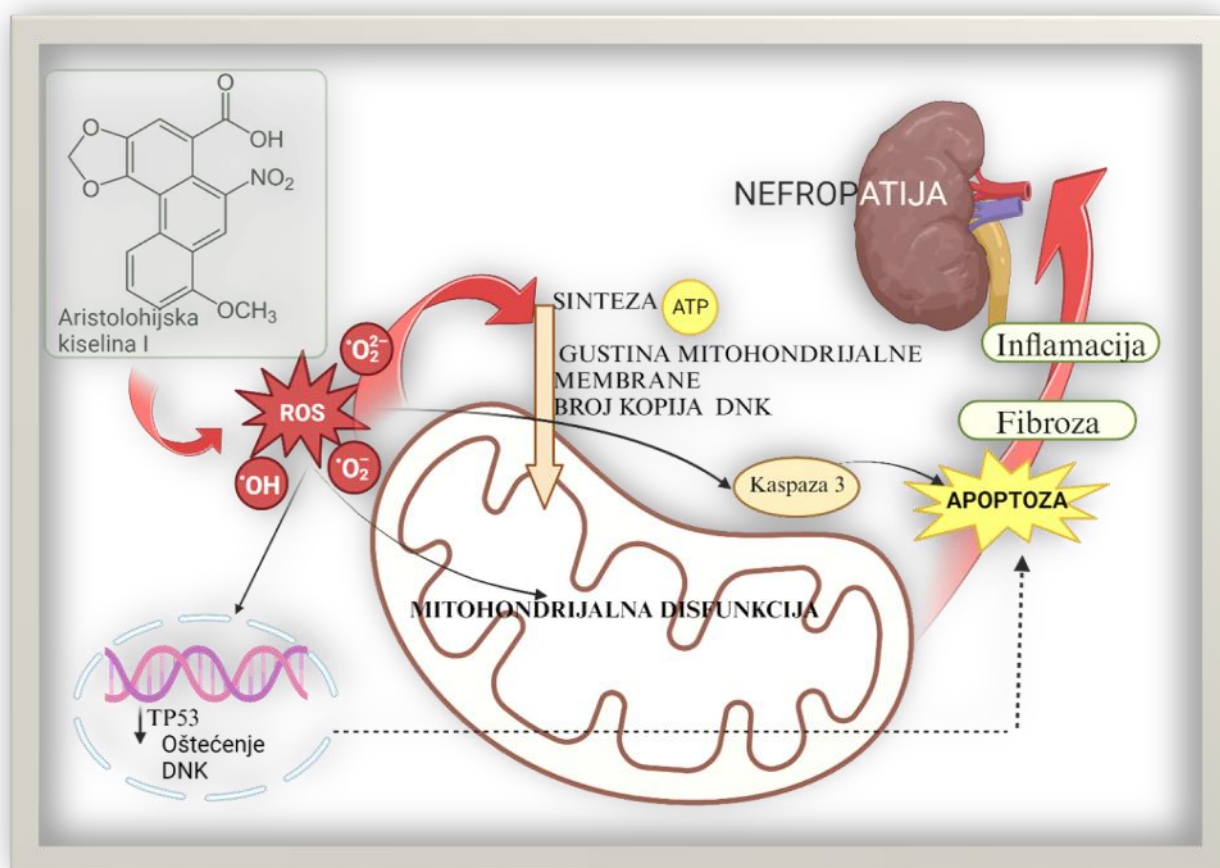
Originalni koncept oksidativnog stresa definisan je još 1985. godine kao poremećaj prooksidantno-antioksidativnog balansa u korist prvog [76]. Tokom proteklih nekoliko decenija otkrića u razumijevanju redoks regulacije i redoks signalizacije dovela su do novog koncepta oksidativnog stresa koji se može definisati kao neravnoteža između oksidanasa i antioksidanasa u korist oksidanasa, što dovodi do poremećaja redoks signalizacije i/ili molekularnih oštećenja [77]. Pojmovi oksidativni eustres i oksidativni distress proizašli iz ove definicije impliciraju da bi se oksidativni stres mogao klasifikovati prema intenzitetu [77].

Intenzitet može varirati od fiziološkog oksidativnog stresa (eustres) do toksičnog oksidativnog opterećenja (distres) koji oštećuje biomolekule. Niska izloženost reaktivnim kiseoničnim vrstama (*engl. Reactive oxygen species*, ROS) i reaktivnim vrstama azota (*engl. Reactive nitrogen species*, RNS) je korisna jer oni igraju važnu ulogu u prenosu redoks signala i aktivaciji odgovora na stres, dok visoka izloženost rezultuje poremećajem prenosa redoks signala, oksidativnim oštećenjima i disfunkcijom tkiva [78]. Prema tome, pojam redoks homeostaza označava mehanizme koji u organizmu omogućavaju održavanje suptilne ravnoteže između produkcije slobodnih radikala, koji su neophodni medijatori za različite fiziološke procese, i njihove redukcije, kojom se sprečava nastanak štetnih efekata slobodnih radikala na ćelijske makromolekule [78]. Poremećaj ove ravnoteže, koji nastaje bilo uslijed pojačane aktivnosti sistema za stvaranje slobodnih radikala ili zbog insuficijentne antioksidativne odbrane, prisutan je u brojnim hroničnim nezaraznim oboljenjima u kojima su slobodni radikali krajnji medijatori djelovanja različitih patoloških agenasa i ksenobiotika, među kojima je i AA [77,78]. Dosadašnji rezultati eksperimentalnih istraživanja idu u prilog važne uloge oksidativnog stresa u patogenezi BEN i udruženih tumora gornjeg urotelijuma. Stoga bi oksidativni stres mogao da predstavlja primarni pokretač citotoksičnosti izazvane AA, a mogao bi biti odgovoran za oštećenja DNK i naposljetku uključen u patoetiologiju endemske nefropatije.

#### 1.4.1 Oštećenje mitohondrija dejstvom aristolohijske kiseline

Dok je kancerogenost AA dobro istražena i dokumentovana, oskudno su opisani mehanizmi kojima AA ispoljava oksidativna oštećenja. S tim u vezi, nekoliko *in vitro* studija je opisalo da je izlaganje ćelija visokim dozama aristolohijske kiseline dovelo do stvaranja velikih količina ROS [39,62,79,80]. ROS se stvaraju u nekoliko ćelijskih sistema lokalizovanih na plazma membrani, membrani mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma, u citosolu i peroksizomima [81]. Među njima, mitohondrije su identifikovane kao glavni izvor ROS [82]. Disfunkcija mitohondrija koja vodi ka povećanoj produkciji ROS je prijavljena kao jedan od ključnih faktora u procesu oštećenja bubrega, kao i u progresiji raznih bubrežnih bolesti koje dovode do hemodijalize, uključujući i BEN (Slika 7) [62,82,83]. Poremećaj mitohondrijalnog sistema disanja i viši nivoi markera oksidativnog stresa uočeni su i u brojnim eksperimentalnim *in vivo* i *in vitro* studijama [62,83,84]. U vezi sa ovim, u studiji *Pozdzick* i sar. pokazano je da tubulotoksičnost AA ima za posljedicu poremećaj aktivacije antioksidativnih enzima i direktno oštećenje mitohondrija u modelu AAN kod pacova [85]. Nedavne studije su potvrdile da AA može da izazove ozbiljna oštećenja mitohondrija, uključujući smanjenu gustinu

mitohondrijalne membrane kroz povećanje nivoa superoksidnog anjona, jona gvožđa i ROS, te da dovodi do snižavanja potencijala mitohondrijalne membrane, smanjenja broja kopija mitohondrijalne DNK, smanjene proizvodnje adenozin trifosfata, kao i aktiviranje puta apoptoze u mitohondrijama bubrega (Slika 6) [62,86]. Mehanizmi koji vode ka nefrotoksičnosti uključuju povećanje nivoa oksidativnog stresa, pojavu uznapredovalih proizvoda glikozilacije, apoptozu, inflamaciju i intersticijalnu fibrozu bubrega [87,88]. Iz rezultata jedne studije u kojoj je, na modelu nefropatije kod miševa, pokazano da rapamicin preko (mTOR)-autofagije može da ukloni mitohondrije oštećene dejstvom AA proizilazi da bi proteini povezani sa mitohondrijama mogli igrati važnu ulogu u nastanku nefropatije uzrokovane ovom kiselinom [89]. Ipak, detaljan mehanizam koji bi objasnio kako AA izaziva oštećenje bubrega kod BEN još uvijek ostaje neistražen.



**Slika 6.** Pretpostavljeni mehanizam AA indukovane disfunkcije mitohondrija u etiologiji Balkanske endemske nefropatije. Pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

Tumorski protein P53 (Tp53); reaktivne vrste kiseonika (ROS); superoksid radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksi radikal ( $\cdot OH$ ), adenozin trifosfat (ATP).

#### 1.4.2 Smanjenje antioksidativnog kapaciteta u BEN

Osim promjena u funkciji mitohondrija, potvrđeno je da AA dovodi i do smanjenja antioksidativnog kapaciteta ćelija, na šta upućuju opsežni opisi AA-indukovanog oksidativnog stresa u *in vivo* studijama. U studiji Li i sar. je primijećena akumulaciju metilglioksala i Nε-(karboksimetil) lizina, vjerovatno kao rezultat oksidativnog oštećenja bubrega nastalog tokom aktivacije AA. Šta više, uz smanjenje antioksidativnog renalnog kapaciteta, zabilježeni su značajno smanjeni nivoi glutaciona, najmoćnijeg intracelularnog antioksidansa [62]. U narednim eksperimentalnim studijama pokazano je da AA dovodi do oksidativnog stresa i oštećenja DNK kroz aktivaciju JNK signalnog puta (*engl. c-Jun terminal kinase signaling*), što dovodi do oštećenja tubularnih ćelija [90]. Nedavno je objavljena studija u kojoj je potvrđeno da je kod miševa nakon intoksikacije AA došlo do povećane ekspresije *NOX2 mRNA* i koncentracije vodonik peroksida u plazmi i urinu, oba markera oksidativnog stresa. NOX2 je široko eksprimiran u bubrezima i predstavlja jedan od glavnih izvora ROS [91]. Dodatno, studija je pokazala da je oksidativni stres izazvan dejstvom AA-I kod miševa povezan sa povećanjem ekspresije gena *CYP2E1*, te smanjenjem aktivnosti antioksidantnih enzima među kojima i katalaze, superoksid dismutaze i glutation sintetaze, što sugerise da AA može stupati u interakciju sa ovim enzimima, čime dovodi do poremećaja redoks homeostaze [92]. Šta više, pokazano je da oralni tretman L-argininom poboljšava funkciju i strukturu bubrega *in vivo* [91]. Uloga oksidativnog stresa u citotoksičnost izazvanu ekpozicijom AA dokazana je u brojnim studijama, u kojima je tretman ćelija antioksidansima pokazao citoprotektivne efekte, smanjenje ROS i smanjenje genotoksičnosti, što potvrđuje da AA može izazvati oštećenje DNK [79,90,93]. U studiji koja je sprovedena na pacijentima sa BEN, koji su se liječili hemodijalizom, pokazano je da uzimanje vitamina C povećava antioksidativni kapacitet [94]. Svi ovi nalazi sugerisu da bi oksidativni stres mogao biti uključen u patogenezu BEN.

#### 1.5 REGULATORNI I KATALITIČKI ANTIOKSIDANTNI PROTEINI U BEN

Antioksidantni enzimi među kojima i glutation peroksidaza i glutation transferaza predstavljaju moćan sistem odbrane od slobodnih radikala. S tim u vezi, jedan od najvažnijih regulatornih antioksidantnih proteina je Nrf2 (*engl. Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2; Nrf2*), transkripcioni faktor koji reguliše bazalnu aktivnost i koordinisanu ekspresiju brojnih gena za antioksidantne proteine [95].

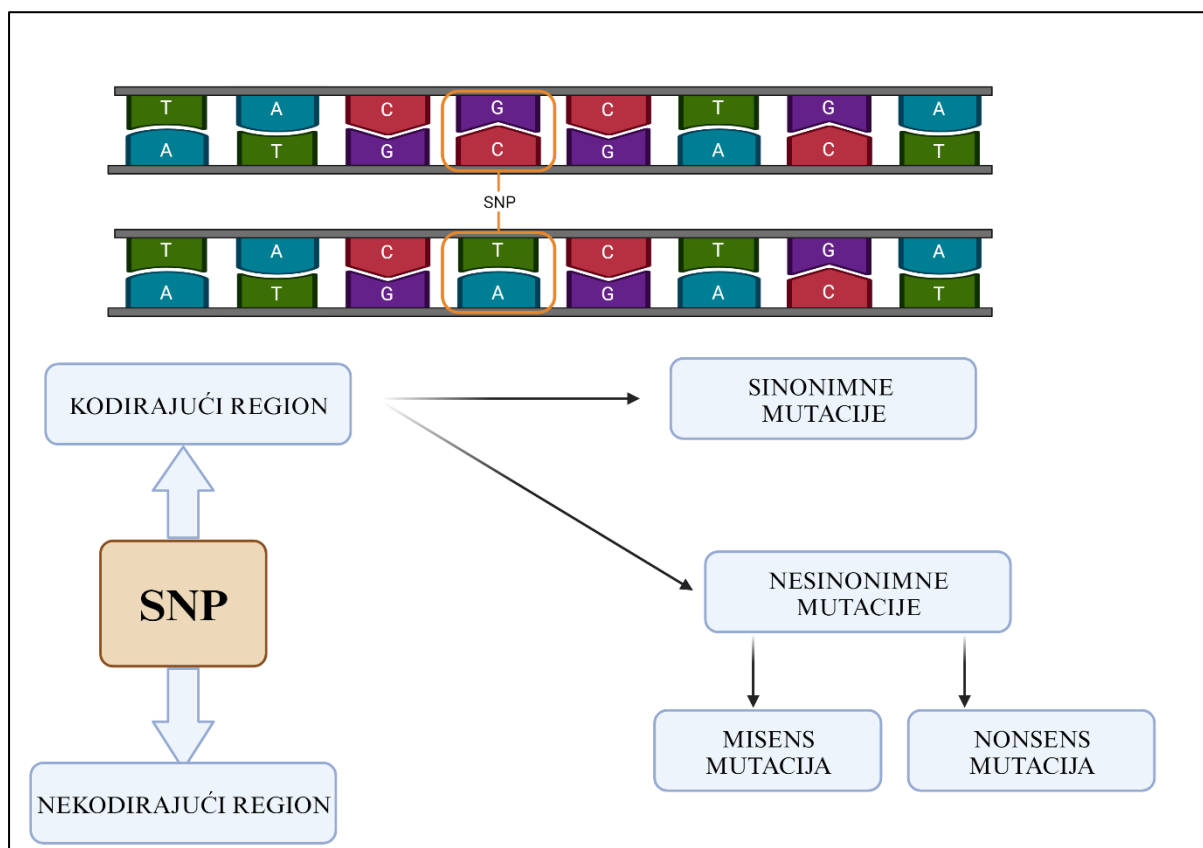


Prekomjerni oksidativni stres kod pacijenata sa BEN mogao bi biti povezan sa specifičnim antioksidantnim genetskim profilom. Interesantno je da je kod gena koji kodiraju regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine prisutan genski polimorfizam, kako delecioni tako i po tipu zamjene jednog nukleotida, koji za posljedicu ima izmijenjenu ekspresiju i/ili aktivnost ovih proteina. Shodno tome, možemo pretpostaviti da polimorfna ekspresija gena koji kodiraju regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine modifikuje inter-individualnu varijabilnost antioksidantnog sistema i prema tome, definiše jedinstveni genetski antioksidantni profil pojedinca.

#### 1.5.1. Polimorfizmi regulatornih i katalitičkih antioksidantnih proteina

Genetski polimorfizmi regulatornih i katalitičkih antioksidativnih proteina, kao što su *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1*, *GPX3*, kao i *MDR1*, dovode do promjene profila funkcije/aktivnosti njihovih proteina što utiče na antioksidativni kapacitet pojedinca. Prema tome, polimorfizmi ovih gena bi mogli da imaju funkcionalni značaj u pogledu težine oksidativnog stresa i posljedično rizika za pojavu BEN i udruženih tumora urotelijuma.

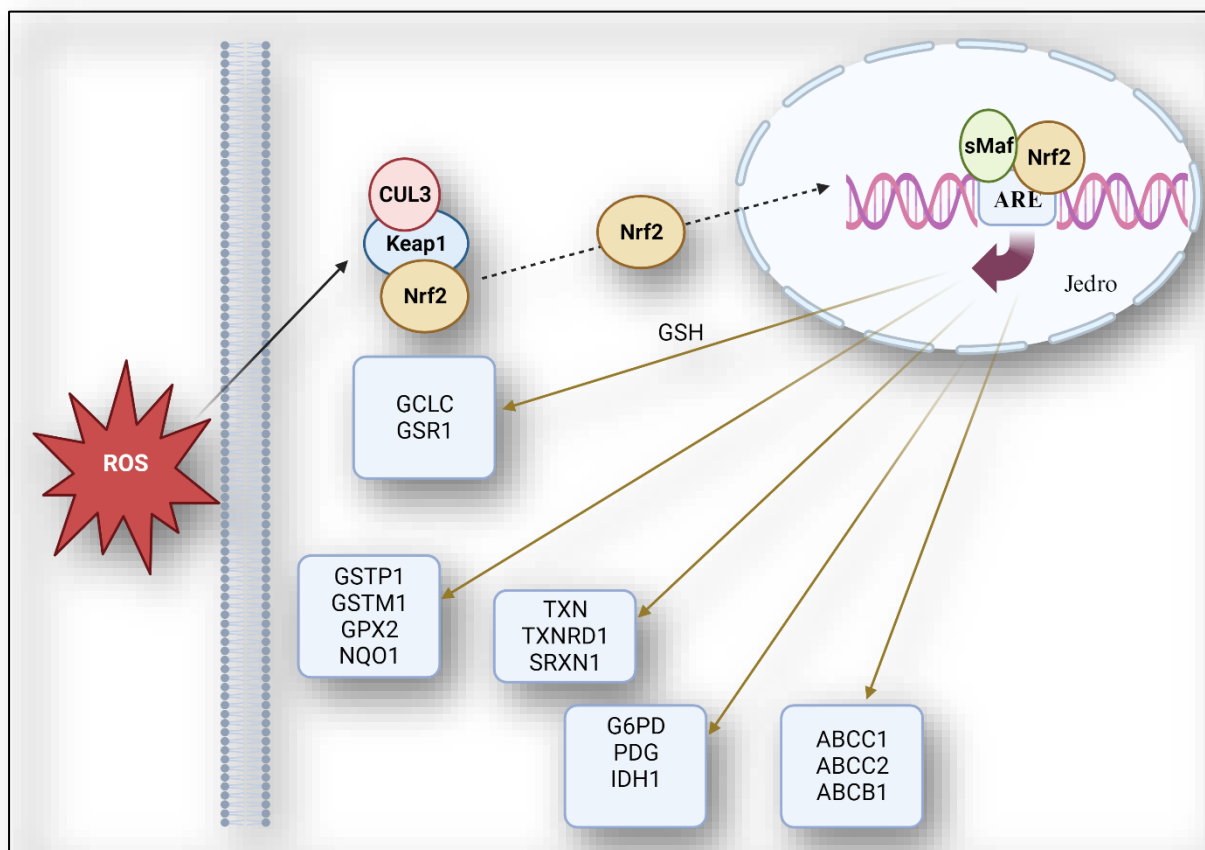
Varijacija u sekvenci DNK koja javlja se u populaciji sa učestalošću od najmanje 1 % definiše se kao polimorfizam [96]. U polimorfizme ubrajamo ponavljane sekvence, insercije, delecije, rekombinacije i polimorfizme pojedinačnih nukleotida ili SNP (*engl. single nucleotide polymorphism*). Upravo su SNP najčešći od njih, a procjenjuje se da ih u humanom genomu ima preko 10 miliona. Javljaju na svakih 1.000 baznih parova u ljudskom genomu i postoje unutar cijelog genoma, kako u kodirajućim tako i nekodirajućim dijelovima. SNP karakteriše jedna mutacije baze unutar DNK molekula [97,98]. Svaki SNP se nalazi na određenom mjestu (specifičnom lokusu) unutar jednog gena i u zavisnosti od toga može da utiče na ekspresiju gena i na sastav proteina [98,99]. SNP koji se nalazi u kodirajućem regionu za protein može da bude sinonimni ili nesinonimni, u zavisnosti od tog da li utiče na promjenu u sekvenci aminokiselina u genskom produktu (*Slika 4*). Ako promjena u SNP ne dovodi do izmjena u polipeptidnoj sekvenci, takav SNP se obilježava kao sinonimni (sSNP), koji ima veću učestalost. Ako SNP dovodi do promjena u strukturi proteina, tada ima veći potencijal da izazove bolest, i naziva se nesinonimni (nsSNP) [100].



Slika 7. Polimorfizam jednog nukleotida; Pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

### 1.5.2 Nrf2/Keap1 signalni put

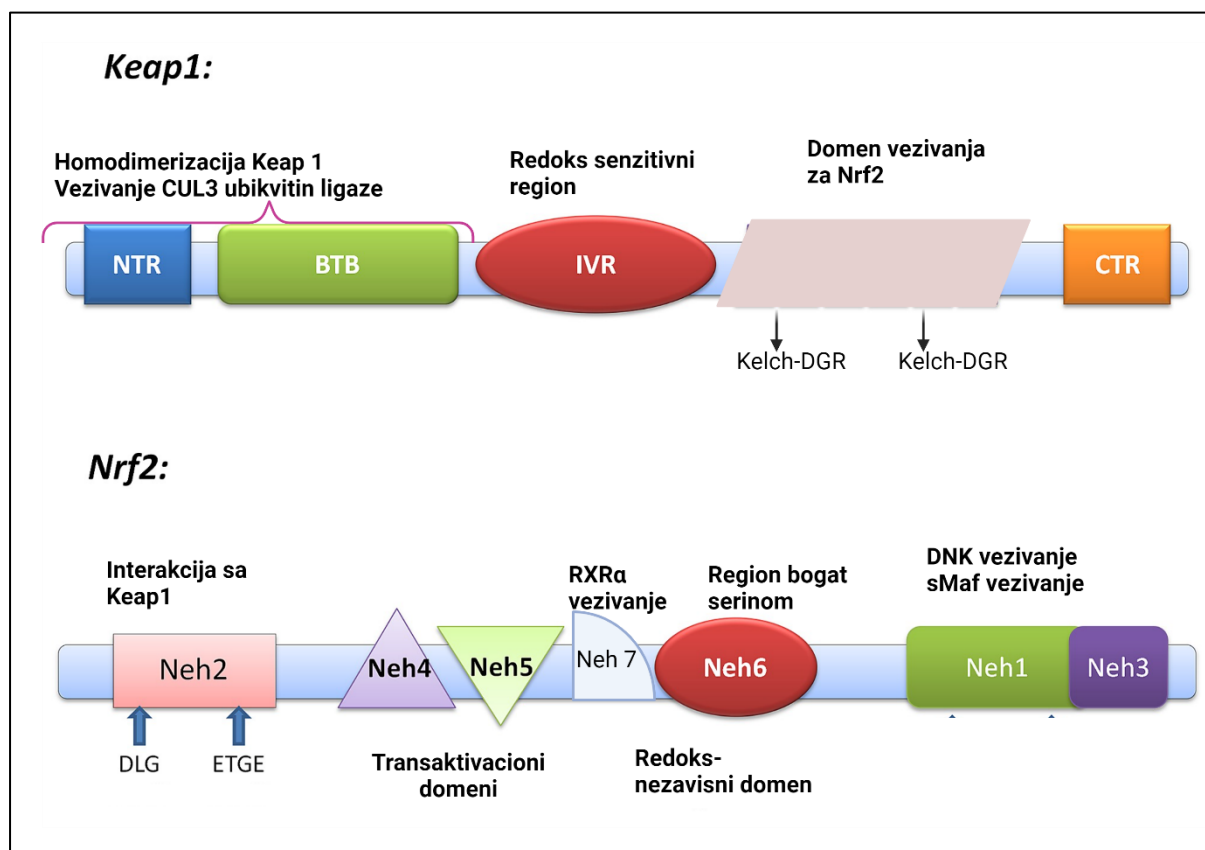
Nrf2/Keap1 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/Kelch-like ECH-associated protein 1*) signalni put jedan je od najvažnijih sistema za održavanje redoks homeostaze u ćeliji. Nrf2 je citoprotektivni transkripcijski faktor odgovoran za regulaciju bazalne aktivnosti, kao i koordinisanu ekspresiju gena koji kodiraju brojne antioksidantne proteine, među kojima i enzime II i III faze metabolizma (Slika 8) [95]. Kroz koordinisanu regulaciju proizvodnje, korištenja i regeneracije glutationa i tioredoksina, regeneracije NADPH, metabolizma hema i gvožđa, ROS i detoksikacije ksenobiotika, Nrf2 obezbeđuje glavni citoprotektivni odbrambeni sistem u ćeliji. Njegov negativni regulator predstavlja protein Keap1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) [101,102].



**Slika 8.** Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*) reguliše nekoliko puteva uključenih u antioksidativnu zaštitu. Pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

Reaktivne vrste kiseonika (ROS); kulin 3 protein (CUL3); elementi antioksidativnog odgovora (ARE); sMaf protein (engl. small maf); GSH-glutation; GCLC-glutamat-cistein ligaza; GSR1-glutation reduktaza, glutation transferaza P (GSTP1), glutation transferaza M (GSTM1); glutation peroksidaza 2 (GPX2); NADPH kinon oksidoreduktaza (NQO1); tioredoksin (TXN); tioredoksin reduktaza (TXNRD1); sulforedoksin 1 (SRXN1); glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD); 6-fosfoglukonat dehidrogenaza (PDG); izocitrat dehidrogenaza 1 (IDH1); ATP-vezujući kasetni transporter (ABCC1,ABCC2,ABCB1).

U citoplazmi se Nrf2 nalazi unutar neaktivnog kompleksa vezanog za Keap1 protein [103]. Nrf2 pripada CNC (engl. *cap ,n' collar*) podfamiliji regulatornih proteina sa motivom leucinskog "rajfešlusa" (engl. *Basic Leucine Zipper Domain*) (104). Sastoji se od sedam homolognih domena Nrf2-ECH (Neh1-7), od kojih svaki ima specifičnu funkciju (Slika 9) [95,102]. Kao posrednik u interakciji Nrf2 sa Keap1 proteinom najvažniji je Neh2 domen. [101,102,105].

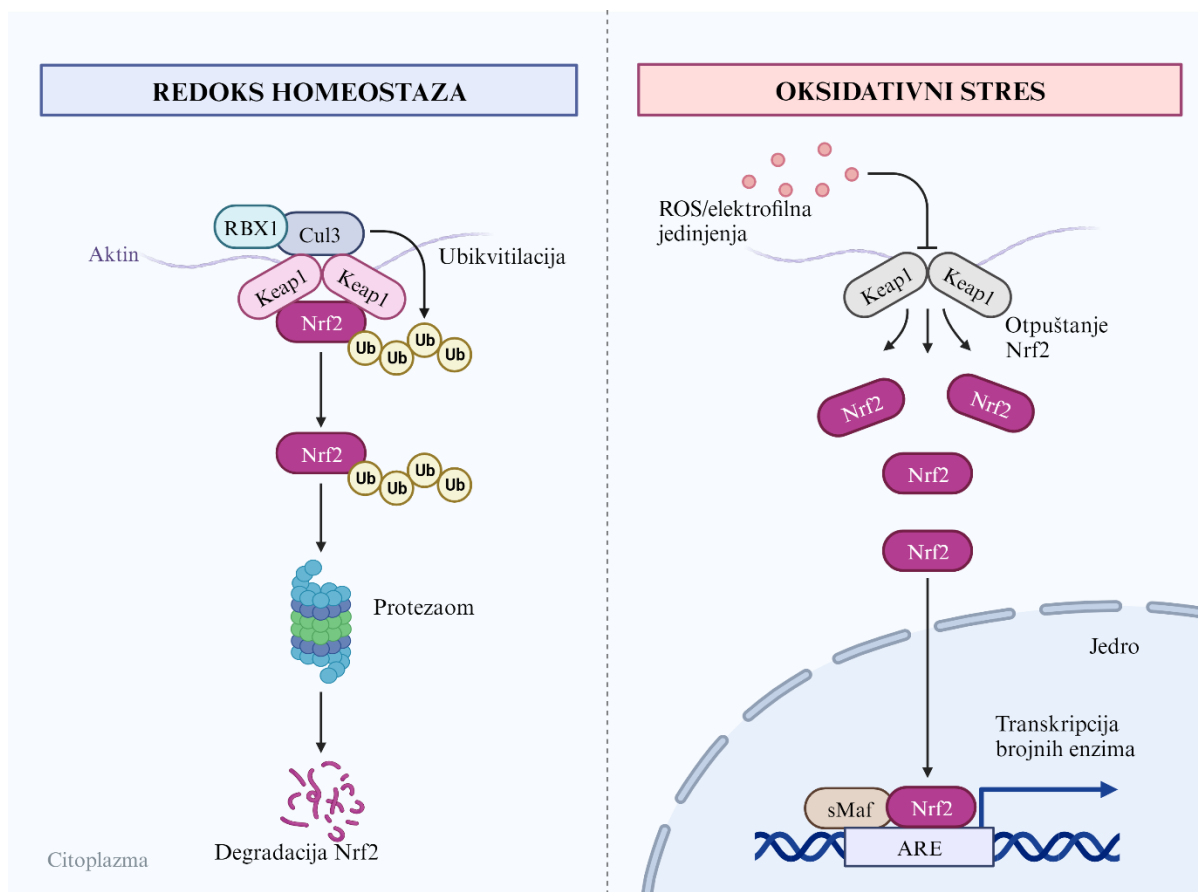


**Slika 9.** Keap1 i Nrf2 domeni. Pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

Kulin 3 protein (CUL3); N-terminalni domen (NTR); BTB domen dimerizacije (engl. *Broad complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac*); domen bogat cisteinom (engl. *intervening region (IVR)*); šest Kelch/DGR domena i C-terminalni region (CTR). Nrf2 domeni (Neh1-Neh7); Neh 1 je mjesto vezivanja za male Maf proteine i ARE. Neh 2 služi kao vezno mjesto za Keap1 interakcijom sa DLG niskog afiniteta i motivima visokog afiniteta ETGE. Neh 3-5 su transaktivacioni domeni za Nrf2. Neh 6 je domen bogat serinom koji negativno kontrolira stabilnost Nrf2. Neh 7 stupa u interakciju sa RXR $\alpha$  (engl. *Retinoid X Receptor Alpha*) nuklearnim receptorom odgovornim za supresiju Nrf2/ARE signalnog puta.

Mehanizam kojim Nrf2 dovodi do pojačane ekspresije antioksidantnih gena zavisi od redoks stanja u ćeliji. U homeostatskim uslovima, Keap1 funkcioniše kao adapterski protein za Cul3 E3 ubikvitin ligazu čime omogućava kontinuiranu ubikvitilaciju i degradaciju Nrf2 i sprečava nuklearnu translokaciju Nrf2 [103]. Naime, dvije molekule Keap1 vezane su za Neh2 domen Nrf2. Kako Neh2 domen sadrži ostatke lizina, koji su supstrati za ubikvitinaciju i učestvuju u Keap1 zavisnoj Nrf2 proteazomskoj degradaciji, Keap1 preko ETGE i DLG mjesta na molekuli Nrf2 vezuju se za ovaj regulatorni protein [103]. Nakon homodimerizacije, koja je važna za funkciju Keap1 proteina, Keap1 premošćuje Nrf2 do Cul3/RING-box proteinskog

kompleksa, koji ubikvitinira ostatke lizina unutar Nrf2. Na taj način, ubikvitinirani Nrf2 se ekstrahuje iz kompleksa sa Keap1-Cul3 pomoću proteina p97 [106] i dolazi do njegove proteazomske degradacije, dok se Keap1 regeneriše (Slika 10) [107]. Sa druge strane, u prisustvu ROS i elektrofilnih jedinjenja dolazi do modifikacije tiolnih ostataka Keap1 što dovodi do disocijacije Nrf2 od Keap1, nakon čega Nrf2 odlazi u jedro. U jedru dolazi do heterodimerizacije Nrf2 sa drugim faktorima transkripcije, kao što je mali Maf protein (engl. *small Maf*) i veže se za regulatorne sekvence, nazvane elementi antioksidativnog odgovora ili ARE (engl. *antioxidant response elements*), koja se nalazi u promotorskoj regiji ciljnih gena za enzime uključene u drugu fazu detoksikacije ksenobiotika, kao i na antioksidantne enzime poput glutathion reduktaze, glutathion peroksidaze, glutamatcistein ligaze, što vodi ka ponovnom uspostavljanju redoks homeostaze (Slika 10) [108,109]. Zanimljivo je da nakon ponovnog uspostavljanja redoks homeostaze, Keap1 može da priđe u jedro, veže se za Nrf2 preko svog ETGE domena i preuzima ga nazad u citoplazmu radi razgradnje [110].



Slika 10. Keap1-Nrf2 signalni put, pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

Kulin 3 protein (CUL3); Ring boks protein 1 (engl. RING-box protein 1, RBX1); ubikvitin (Ub); reaktivne vrste kiseonika (ROS); elementi antioksidativnog odgovora (ARE).

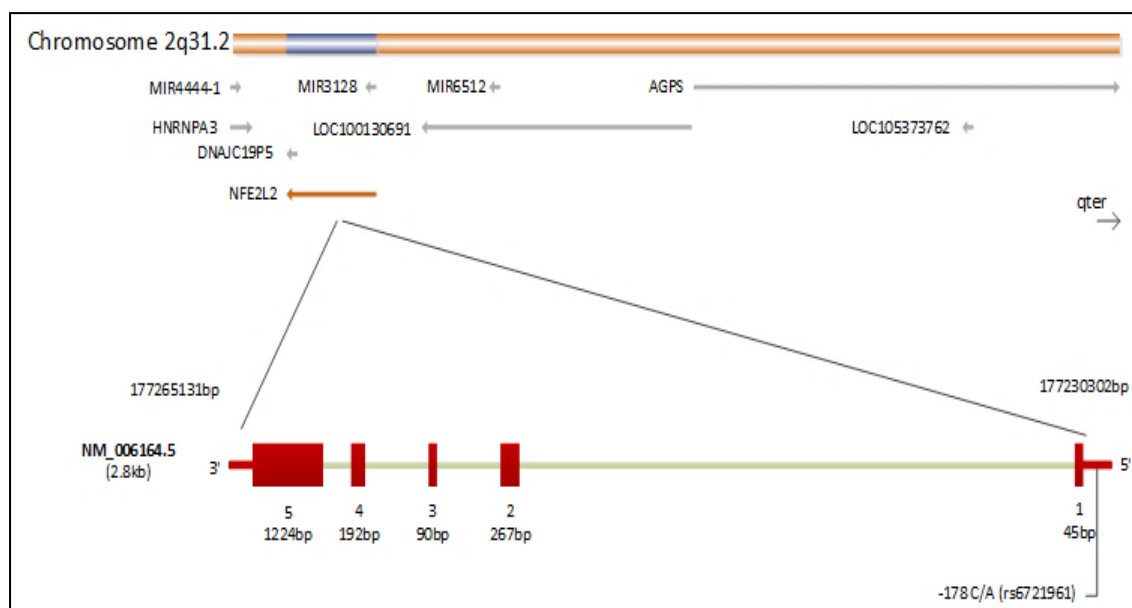
#### 1.5.2.1 Uloga Nrf2 regulatornog proteina u BEN

Iako zasnovani na eksperimentalnim studijama, postoje uvjerljivi dokazi koji naglašavaju da bi Nrf2 mogao da ima značajnu ulogu u razvoju nefropatije uzrokovane AA, a samim tim i BEN. Brojne studije pokazuju, na modelu bubrega, da Nrf2 ima renoprotektivni efekat, te da povećava antioksidativni kapacitet ćelija [111–114]. Pored toga, nedavno je pokazano da je bardoksolon metil, aktivator Nrf2, smanjio akutno oštećenje bubrega *in vivo* [115]. Sa druge strane, zabilježeno je da je nakon ekpozicije AA ekspresija proteina Nrf2 signalnog puta (Nrf2, HO-1, NQO1) značajno smanjena [86,116]. Upravo snižena ekspresija Nrf2, koja vodi ka smanjenoj ekspresiji antioksidativnih proteina čija je ekspresija regulisana Nrf2 regulatornim faktorom, kao i povećana produkcija ROS pogoduju nastanku oksidativnog stresa i dodatno pogoršavaju oštećenje bubrega [117]. Ovo potvrđuju i rezultati eksperimentalnih studija sa činjenicom da je povećana ekspresija *Nrf2* gena dovela do smanjenje proizvodnje ROS i ublažila apoptozu i nekrozu ćelija bubrega, izazvanu djelovanjem aristolohijske kiseline. Svi ovi rezultati ukazuju na ulogu Nrf2 u AA-indukovanu povreda bubrežnih tubularnih epitelnih ćelija [114]. Dodatno, u nekoliko studija pokazana je veza između polimorfne ekspresije *Nrf2* u hroničnim bolestima bubrega, kao i kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom bolesti [118,119]. Uzevši u obzir da su to glavne i neminovne komplikacije BEN, svakako je bilo značajno ispitati da li postoji veza između polimorfizma gena za *Nrf2* i rizika za razvoj BEN.

#### 1.5.2.2 Polimorfizam *Nrf2* gena

Do sada je identifikovano nekoliko *Nrf2* SNP-ova, međutim jedan od njih, *Nrf2 rs6721961 (-617C/A)* polimorfizam, koji se nalazi u promotorskom regionu preko koga *Nrf2* autoreguliše svoju transkripciju, u najvećoj mjeri je uticao na bazalnu ekspresiju i funkciju Nrf2 (Slika 11) [120,121]. Od tada, višestruke studije procjenjivale i otkrili značajnu povezanost ovog polimorfizma sa drugim bolestima uključuje maligne bolesti, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, kao i TBS [119,121–123]. Učestalosti genotipova *Nrf2 rs6721961* kod zdravih osoba u Poljskoj, koje mogu odražavati njihovu distribuciju u evropskoj populaciji, bile su: 78% C/C, 20% C/A i 2% A/A [124]. Humani *Nrf2* se nalazi na citogenetskoj traci 2k31.2 hromozoma 2 [121]. *Nrf2 rs6721961 (-617C/A)* SNP, koji karakteriše C>A zamjena, nalazi se u ARE regulatornoj sekvenci u promotorskom regionu gena za *Nrf2* [120]. S obzirom na svoju poziciju, ovaj SNP direktno utiče na bazalnu ekspresiju *Nrf2*. Ovo potvrđuje ranije studije

pokazujući da *Nrf2*\*A/A homozigoti pokazuju značajno smanjenu ekspresiju *Nrf2* gena [125]. Štaviše, ovaj *Nrf2* SNP utiče i na mjesta vezivanja za ARE, dovodeći do manje efikasnog vezivanja *Nrf2* za ARE. To je i potvrđeno u studiji u kojoj je pokazano da je formiranje Nrf2 protein-DNK kompleksa je značajno smanjeno kod *Nrf2*\*C/A i *Nrf2*\*A/A varijantnih genotipova u sekvenci sličnoj ARE [120]. Ukratko, smanjena bazalna ekspresija Nrf2, zajedno sa izmijenjenom sposobnošću Nrf2 da se efikasno vezuju za ARE, rezultira slabljenjem transkripcije posredovane ARE za antioksidativne i gene za detoksikaciju [125].



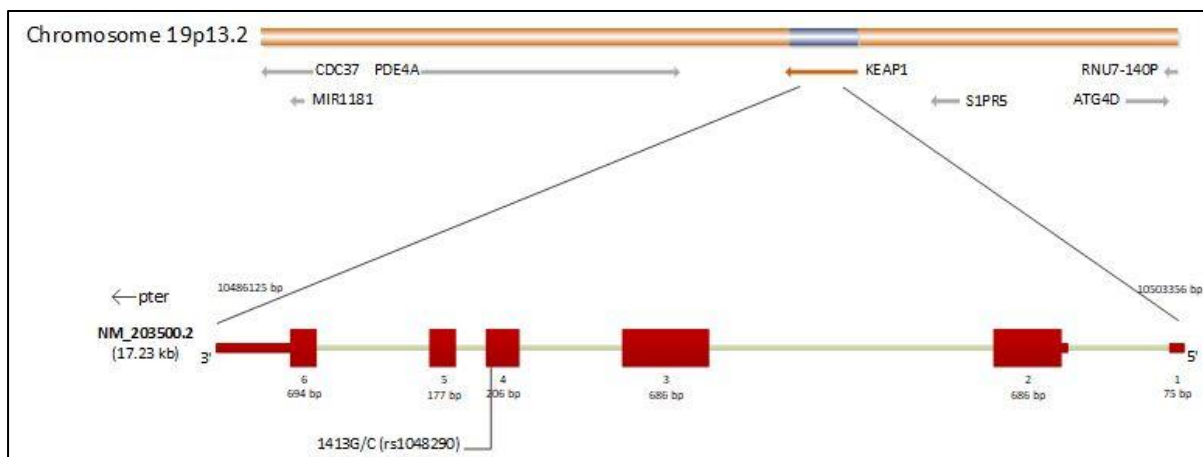
**Slika 11.** Lokacija gena za *Nrf2* na drugom hromozomu; prilagođeno po Jerotić et al., 2021 [119].

### 1.5.2.3 Polimorfizam *KEAP1* gena

Humani *KEAP1* gen je lociran na hromozomu 19 (citogenetska traka 19p13.2) (Slika 12). Iako je do sada identifikovano nekoliko polimorfizama za *KEAP1* gen, *KEAP1* rs1048290 (c. 1413C>G) SNP u studiji *Hartikainen* i saradnika je po prvi put identifikovan i opisan 2015. godine [126]. Ovaj SNP se nalazi u genomskoj regiji (egzon 4) koja kodira domen dvostrukog glicina ponavljanja (DGR domen) *KEAP1* gena [127]. Kako je ovaj domen je u direktnoj interakciji sa Nrf2 [110], ometajući tako vezu Nrf2-KEAP1, ovaj SNP utiče na citoplazmatske nivoe Keap1 i Nrf2 proteina [128]. Fizička lokacija ovog SNP na genu za *KEAP1* mogla bi objasniti uočenu korelaciju sa višim nivoom ekspresije proteina Keap1 i većom citoplazmatska ekspresijom Nrf2 u tkivima dojke [126,128]. Naime, kako se SNP rs1048290 nalazi u genomskom regionu koji kodira *DGR* domen, on direktno utiče na KEAP1-Nrf2 osu i može uticati na stepen antioksidativne odbrane. Zapravo, sprečavanjem translokacije Nrf2 iz

citoplazme u nukleus, spriječena je aktivacija transkripcije Nrf2 inducibilnih gena, iako je količina ovog transkripcionog faktora u citoplazmi povećana. Dodatno, ovaj SNP je pronađen u LD sa još jednim SNP rs9676881, koji se nalazi u regiji pojačivača, nekoliko baza nizvodno od 3'-netranslacionog region (3'-UTR) gena *KEAP1*, i 410 bp od miR-200a mjesto vezivanja. Posljedično, autori pretpostavljaju da LD može postojati i sa dodatnim neistraženim tihim varijacijama koje utiču na ovo specifično mesto vezivanja miRNA [127].

U pomenutoj studiji uočena je povezanost između *KEAP1* SNP rs1048290 i nastanka karcinoma dojke i prognoze u smislu preživljavanja bez progresije i ukupnog preživljavanje (15). Pored studije koja je započela istraživanja *KEAP1* rs 1048290 polimorfizma, ne mali broj studija je izučavao funkcionalni značaj ovog polimorfizma i povezoao sa hroničnim respiratornim bolestima, karcinomom endometrija i epilepsijom [129–132].



**Slika 12.** *KEAP1* gen sa polimorfizmom, pripremljeno u Visio Microsoft ([www.microsoft.com](http://www.microsoft.com)).

### 1.5.3 Glutation transferaze

Od velikog broja proteina čija ekspresija je regulisana Nrf2, posebno se izdvajaju pojedine citosolne glutation S-transferaze (*engl. glutathione S-transferase; GST*). GST (EC 2.5.1.18) su superfamilija enzima koji pripadaju enzimima II faze metabolizma i igraju važnu ulogu u reakcijama detoksikacije [133]. One katalizuju konjugaciju tri-peptida glutationa (GSH,  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) sa hidrofobnim kosupstratom koji posjeduje elektrofilni centar, pri čemu nastaje neaktivni hidrofilni konjugat koji se lako izlučuje iz tijela [134,135]. Ovi enzimi su podijeljene u tri familije: (i) citoplazmatske transferaze, (ii) mitohondrijske i (iii) mikrosomalne GST [133]. Familija citosolnih GST sastoji se od sedam glavnih klasa čija imena se označavaju grčkim slovima i skraćeno latinicom: alfa (GST A; pet članova), mu (GST



M; pet članova), pi (GST P; jedan član), theta (GST T; dva člana), zeta (GST Z; jedan član), omega (GST O; dva člana) i sigma (GST S; jedan član) [136]. Izraženo metabolički aktivna tkiva, poput jetre, pluća i bubrega imaju pojačanu ekspresiju citosolnih GST [137]. Pored toga, GST mogu imati i antioksidantnu aktivnost [138].

#### 1.5.3.1. Glutation transferaza P

Poslednjih godina posebnu pažnju istraživača privlači GSTP1 [139]. GSTP1 je deo ćelijske antioksidativne mreže, pošto pripada grupi enzima čija ekspresija je regulisana redoks senzitivnim *Nrf2* faktorom transkripcije [140]. Pored uloge GST u reakcijama biotransformacije štetnih elektrofilnih jedinjenja, postoje i podaci koji ukazuju na učešće GST u ćelijskom preživljavanju, proliferaciji i apoptozi posredstvom protein-proteinskih interakcija sa signalnim molekulima [141]. Naime, povećana ekspresija GSTP1 proteina pronađena je kod velikog broja tumora, uključujući karcinom bubrega i mokraćne bešike [142]. GSTP1 je bio i prvi protein za koji je otkriveno da inhibiše JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) kroz direktnu protein-proteinsku interakciju [143]. JNK je MAP kinaza (engl. *Mitogen-activated protein kinases*) uključena u važne ćelijske procese kao što su odgovor na ćelijski stres, apoptozu, inflamaciju, ćelijsku diferencijaciju i proliferaciju [144,145]. Smatra se da je i nefropatija uzrokovana AA povezana sa MAP kinaznim signalnim putevima, što bi moglo da se poveže sa patofiziološkim mehanizmima BEN [143]. Pored toga, AA može da aktivira i JNK signalni put dovodeći do prekomjerne ekspresije pojedinih faktora rasta, među kojima i TGF-1, za koji je potvrđeno da je značajan u patogenezi nefropatije uzrokovane AA [146].

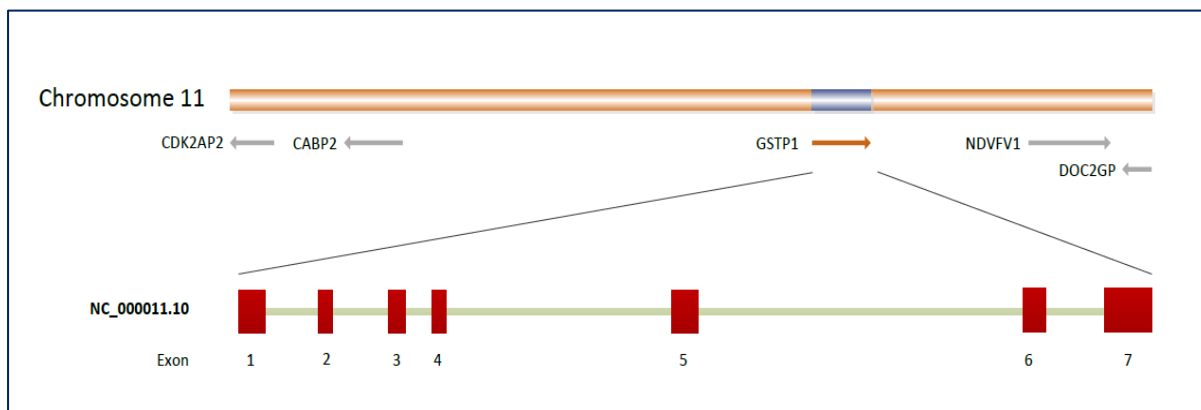
#### 3.5.3.2. Polimorfizam *GSTP1*

*GST* geni koji se nalaze na različitim hromozomima su opisani kao visoko polimorfni [147–149]. Zbog njihove dobro poznate aktivnosti u metabolizmu ksenobiotika, genetske varijacije u GST genima privlače veliku pažnju. Gen za *GSTP1* nalazi se na hromozomu 11q13 (*Slika 13*). Geni klase *Pi* su dugi oko 3 kb i sadrže sedam egzona [150]. Dva funkcionalno najvažnija SNP, sa kliničke tačke gledišta, opisana unutar *GSTP1* gena su: *GSTPIAB* rs 1695 (tranzicija iz Ile u Val na kodonu 105) i *GSTPICD* rs1138271 (prelaz Ala u Val na kodonu 114). Ovi SNP-ovi rezultiraju sa četiri polimorfna alela GSTP1\*A, GSTP1\*B, GSTP1\*C i GSTP1\*D. Alel divljeg tipa GSTP1\*A ima izoleucin (Ile) na kodonu 105 i alanin (Ala) na kodonu 114. GSTP1\*B alel ima jedna supstitucija aminokiselina (Val105/Ala114), GSTP1\*C ima dvije aminokiselinske supstitucije (Val105/Val114), dok GSTP1\*D ima Ile na poziciji 105 i Val na

114 (Ile105/Val114). U kombinaciji čine haloptip *GSTPIABCD*. [151,152]. U populaciji bijele rase, frekvencije genotipova za GSTP1 rs1695 polimorfizam je: \*Ile/\*Ile (AA) 51,5%, \*Ile/\*Val (AG) 39,4% i \*Val/\*Val (AG) je 9,1% [153,154]. Distribucija GSTP1 (rs1138272) genotipa u evropskoj populaciji je: \*Val/\*Val (CC) i \*Val/\*Ala (CT) su 92,1% odnosno 7,9% [155]. Ovi SNP se nalaze na aktivnom mjestu GSTP1-1 proteina i posljedično smanjuje katalitičku aktivnost enzima za oko 5 puta [149,156]. Međutim, ovaj polimorfizam ne mijenja GSH-vezujuće mjesto, već utiče na formiranje tioeterskih konjugata između GSH i nekih elektrofila malih molekula [149,157]. Iako su većina supstrata za GSTP1 različiti diol epoksidi, rezultati najnovijih istraživanja ukazuju da bi i aristolohijska kiselina mogla da posluži kao supstrat za GST [30,31,33,34].

Da izučavanje funkcionalnih polimorfizama različitih klasa *GST* ima značaj u aristolohijskoj nefropatiji i BEN pokazuju rezultati velikog broja studija. U nekoliko studija ispitan je značaj genetskih polimorfizama *GST* u procjeni rizika za nastanak endemske nefropatije. U jednoj od njih je pronađeno da je kod pacijenata sa BEN češći aktivni *GSTMI* genotip, u odnosu na kontrolnu grupu [30]. U, do sada, jedinom sprovedenom istraživanju koje je obuhvatalo pacijente iz Republike Srpske i Srbije ustanovljeno je da polimorfizam gena za *GSTAI-1* povećava rizik za nastanak BEN, te da osobe sa prisustvom varijantnog *GSTAI\*B* alela imaju povećan rizik za nastanak BEN u odnosu na osobe koje imaju *GSTAI\*A/A* genotip [33]. U studiji koja je uključivale pacijente sa aristolohičnom nefropatijom pokazano je da je značajno veća učestalost *GSTTI* genotipa u grupi oboljelih [158].

Kako je protein GSTP1 visoko eksprimiran u bubregu, pokazano je da su pacijenti nosioci varijantnog \*G alela, u slučaju *GSTPI* rs1695, bili u većem riziku od razvoja tumora mokraćne bešike [34]. Pomenuti polimorfizmi unutar *GSTPI* gena (rs1695 i rs1138271) se povezuje i sa velikim brojem tumora među kojima su i karcinom dojke, hepatocelulari karcinom i karcinoma kolona [159–161]. Međutim, studija sprovedena na populaciji BEN pokazala je da polimorfna ekspresija *GSTPIAB* rs1695 nije povezana sa nastankom tumora gornjeg urotelijuma kod BEN pacijenata. Ipak, polimorfizam *GSTPICD* rs1138271, kao ni haplotip *GSTPIABCD*, do sada nisu rađeni kod BEN pacijenata, stoga će ovo biti prva studija koja će se baviti uzročnom vezom između ovih polimorfizama i rizika za nastanak endemske nefropatije i udruženih tumora urotelijuma.



**Slika 13.** Lokacija gena za *GSTP1* na hromozomu 11. Preuzeto iz Suvakov i sar, 2016 [118].

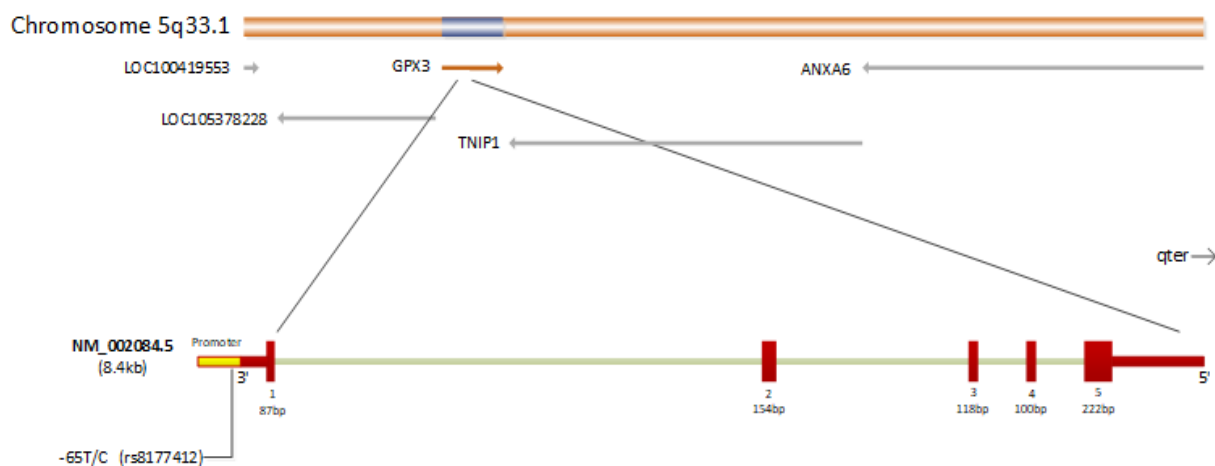
#### 1.5.4 Glutation peroksidaza 3

Glutation peroksidaza (GPX) je dio prve linije odbrane od slobodnih radikala i jedan je od ključnih enzima antioksidativnog sistema zadužena za dalju redukciju vodonik peroksida, kao i redukciju drugih organskih peroksida sa glutathionom [162]. Ovo je familija koju čini osam izoenzima, među kojima pet izoenzima (GPX1-4, GPX6). GPX izoenzimi se nalaze u različitim ćelijskim organelama, kao i intermembranskom prostoru u skoro svim ćelijama [163,164]. Do sada najbolje je opisano 5 izoenzima GPX, i to: citosolna (GPX1), gastrointestinalna (GPX2), plazma-ekstracelularna (GPX3), fosfolipidna (GPX4) i GPX5 u jedru spermatozoida. Ekstracelularna glutathion peroksidaza, GPX3, redukuje vodonik peroksid, rastvorljive niskomolekularne hidroperoksidge, lipidne hidroperoksidge (LOOH), fosfolipidne hidroperoksidge (PLOOH) i male sintetičke hidroperoksidge, koristeći glutathion kao kofaktor [165]. To je selenoprotein koji sadrži rijetku aminokiselinu selenocistein (Sec) u svom aktivnom mjestu [164]. GPX3 u plazmu predominantno sekretuju ćelije bazolateralne membrane proksimalnog tubula, pa je tako bubreg dominantno tkivo koje doprinosi aktivnosti GPX3 u plazmi gdje obezbeđuje zaštitu epitelnim ćelijama od oksidativnog oštećenja [166–168]. S obzirom na to da eritrocitna GPX1 i plazmatska GPX3 predstavljaju dvije GPX izoforme prisutne u krvi, studije koje istražuju odnos između ovih izoenzima i bolesti bubrega su se pojavili tokom proteklih godina. Naime, studije koje su ispitivale aktivnost GPX3 u bubrežnim bolestima pokazuju da je aktivnost ovog enzima značajno niža kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom bolesti u poređenju sa zdravim kontrolama [169,170]. Iako nema studija koje su se bavile GPX3 kod BEN pacijenata, zabilježeno je da se aktivnost ovog izoenzima smanjuje sa progresijom uremije, kao i da se značajno smanjuje kod pacijenata koji se liječe hemodijalizama i pacijenata sa sa hroničnim bolestima bubrega, neizostavnim

komplikacijama BEN [171–173]. Kako su bubrezi glavni izvor ove GPX izoforme, smanjenje aktivnosti GPX3 u plazmi može predstavljati ranu posljedicu aktivnog smanjenja mase nefrona. S druge strane, studija na HK-2 tubularnim epitelnim ćelijama je pokazala da AA može direktno da smanji ekspresiju GPX3 [90,174]. Pored reakcija značajnih za održavanje redoks homeostaze, ovaj enzim ima značajnu ulogu i u procesima inflamacije, apoptoze i progresije tumora [165]. Naime, kod pacijenata sa tumorima uočena niska aktivnost GPX3 u plazmi je bila povezana sa pojačanom peroksidacijom lipida, što sugerira da gubitak aktivnosti GPX3 doprinosi sistemskom oksidativnom stresu [93]. U brojnim studijama pokazana je smanjena ekspresija GPX3 u plazmi kod pacijenata sa tumorima, u poređenju sa zdravim kontrolama [175–178]. Pored toga, nivoi ekspresije GPX3 su povezani sa recidivom tumora i kraćim periodima preživljavanja poslije resekcije jetre [179]. Kada su u pitanju tumori kanalnog sistema, u urotelnom karcinomu bešike ekspresija *GPX3* je bila niža u višim stadijumima bolesti [180]. Pored glutationa i nedostatka selena, koji se navode kao faktori koji utiču na aktivnost ovog izoenzima, i polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) mogu dodatno uticati na aktivnost GPX3 [165].

Gen *GPX3* se nalazi na 5q32 hromozomu i ima pet egzona (*Slika 14*) [181]. Iako je do sada identifikovan veliki broj *GPX3* SNP, *GPX3 rs8177412 (-65T/C)* polimorfizam, koji se nalazi u promotorskom regionu, najviše obično proučavan zbog njegove učestalosti i rezultirajućih promjena u ekspresiji *GPX3*. Naime, ovaj SNP se nalazi u regiji promotora *GPX3* gena i dovodi do smanjenje transkripcije *GPX3* gena, što dovodi do smanjenja nivoi aktivnosti GPX3 u plazmi [182]. Dodatno, polimorfizam *T-65C (rs8177412)* čini haplotip još nekoliko polimorfizama prisutnih u nekodirajućem regionu *GPX3* gena, što dodatno utiče na ekspresiju ovog proteina i njegovu aktivnost [183]. Udruženost *GPX3 rs8177412* polimorfizma sa intracelularnom ekspresijom *GPX3* gena takođe su procjenjivana u nekoliko studija na ljudskim kohortama. Naime, u studiji sprovedenoj na mladim osobama u prijavljeno je da *GPX3\*C/C* varijantni genotip ima najnižu ekspresiju *GPX3* (181,183). Ipak, povezanost između polimorfizama gena za *GPX3* sa *GPX3* ekspresijom nije jednostavna, zbog nutritivnih, sredinskih i drugih faktora koji takođe može uticati na ekspresiju i aktivnost ovog antioksidativnog enzima. Prema tome, nivoi glutationa, deficijencija selena kao i polimorfizmi mogu dodatno uticati na aktivnost ovog izoenzima [185]. Kako je veća ekspresija ovog izoenzima utvrđena intracelularno, u citosolu i na plazma membrani ćelija bubrega, a glutation prisutan u ćeliji u značajno većim koncentracijama nego u cirkulaciji, dovodi se u pitanje raspoloživost ovog kofaktora neophodnog za aktivnost GPX3 u plazmi [186]. Dodatno, efekat

genotipa na aktivnost GPX3 može zavisiti od nivoa selen, a posebno kod pacijenata koji su na hemodijalizi, obzirom da oni imaju značajno niže nivoe selen [165]. Veliki broj studija izučavajući *GPX3* rs8177412 doprinio je rasvjetljavanju uloge ovog polimorfizma u patofiziologiji različitih bolesti, uključujući karcinom, dijabetes, endotelnu disfunkciju, aterogenezu i srčanu disfunkciju [182,184]. Studije su pokazale da je prisustvo *GPX3*\*C varijantnog alela sa smanjenom intracelularnom ekspresijom ovog enzima udruženo sa povećanim rizikom za nastanak kardiovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, te oštećenjem bubrega kod pacijenata sa dijabetesom [183,187]. Dodatno, ovaj polimorfizam se povezuje sa rizikom za nastanak tumora mokraćne bešike, karcinoma testisa i tireoidne žlijezde [175,188,189].

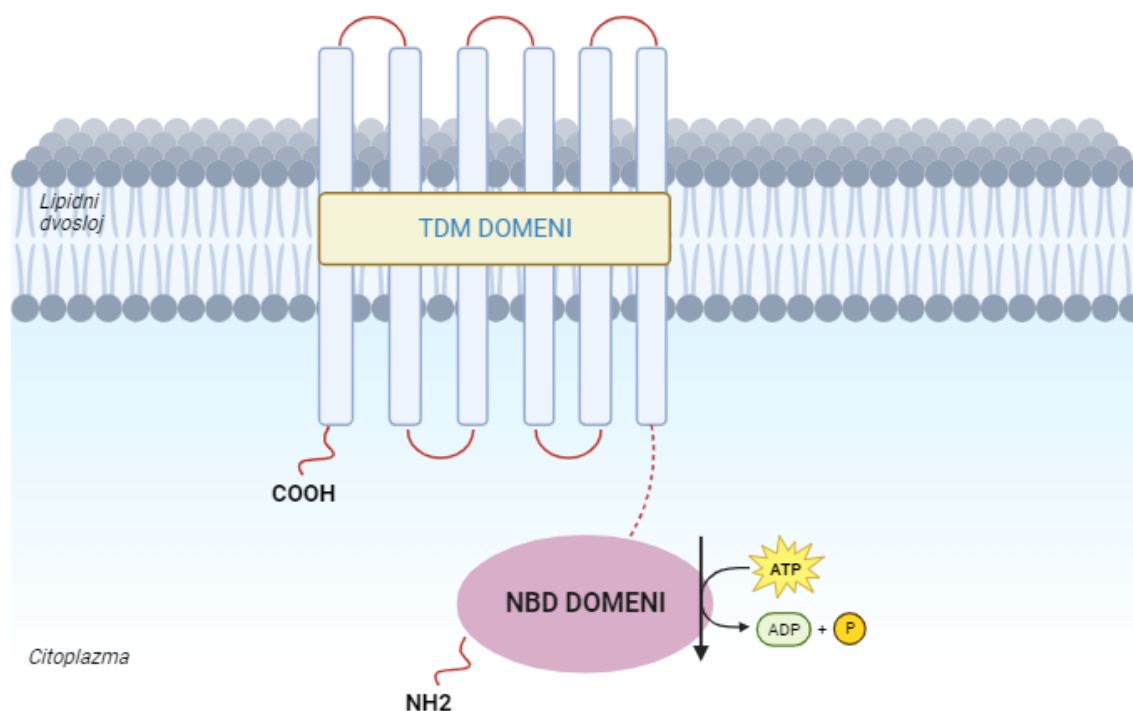


**Slika 14.** *GPX3* gen sa polimorfizmom, preuzeto iz Coric i sar, 2021.

### 1.5.5 MDR1 (P-glikoprotein)

MDR1 (*engl. Multidrug resistance 1*) je član ATP-vezujuće kasete (*engl. ATP-binding cassette*) superfamilije transportnih proteina [190,191]. *MDR1*, koji se naziva još i *ABCB1* gen (*engl. ATP-binding cassette, subfamily B 1 gene*) kodira transmembranski protein nazvan P-glikoprotein (P-gp) [192,193]. To je polispecifičan transporter za više od 500, do sada identifikovanih, supstrata [193–195]. Strukturno-funkcionalne analize su pokazale da se P-gp sastoji od dve homologe polovine, od kojih svaka sadrži šest transmembranskih domena i domen koji se vezuje za ATP (*Slika 15*) [196]. P-gp zapravo predstavlja ATP-zavisnu transportnu (efluksnu) pumpu i svoju ulogu ostvaruje kroz ograničavanje bioraspodivnosti i ćelijske toksičnosti velikog broja lijekova, ksenobiotika i jedinjenja različitih struktura. P-gp se konstitutivno eksprimira u nekoliko organa uključenih u

apsorpciju i eliminaciju ksenobiotika, kao što su crijeva, jetra, bubrezi i mozak [197]. U bubrezima, P-gp je lociran na luminalnoj membrani proksimalnih tubula, a ekspresija P-gp je takođe otkrivena u mezangijumu, debelom uzlaznom kraku Henleove petlje i sabirnom kanalu [198]. U istraživanjima na ćelijama koje su prekomjerno ekspimirale P-gp, kao što su Caco-2 ćelije pokazano je da oralna apsorpcija i penetracija P-gp supstrata mogu biti značajno poboljšani istovremenom primjenom P-gp modulatora [199,200]. Takođe, studije na HK-2 tubularnim epitelnim ćelijama su pokazale da je klirens P-gp supstrata značajno smanjen u prisustvu P-gp inhibitora [201]. *In vitro* studije na Caco-2 ćelijama u pokazale da se ekspresija P-gp povećava sa povećanom produkcijom ROS. Prema tome, P-gp učestvuje i u antioksidativnoj zaštiti u brojnim tkivima ograničavajući apsorpciju i distribuciju štetnih ksenobiotika [202,203].

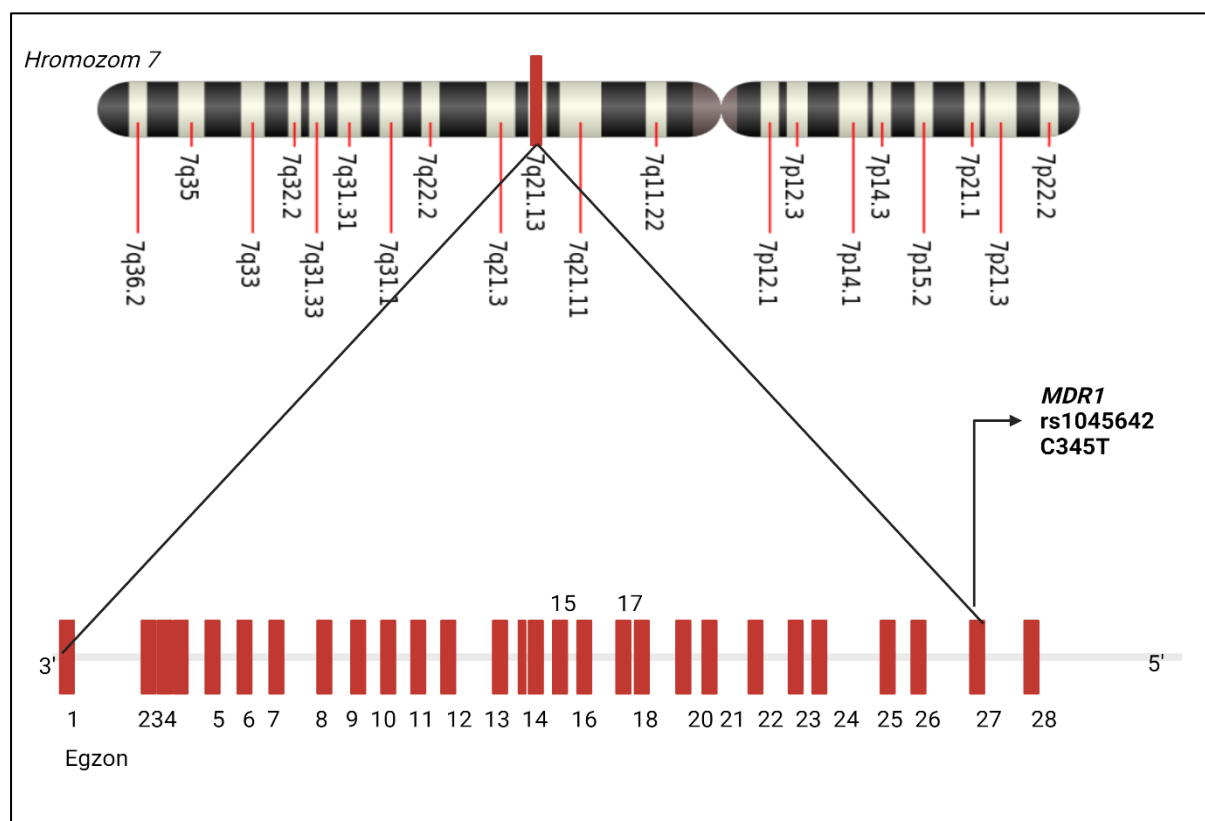


**Slika 15.** Šema strukture ABC transportera.

adenozin difosfat (ADP); adenzin trifosfat (ATP); ATP-vezujući domen (engl. *Nucleotide-binding domain*, NBD); fosfat (P); transmembranski domen (TMD), karboksilna grupa (COOH); amino grupa (NH<sub>2</sub>).

Geni za ABC transportere, najveću porodicu transmembranskih proteina, su izrazito polimorfni [195,204]. Kod ljudi je identifikovano preko 40 ABC transportera i oni su kategorisani u sedam različitih podfamilija na osnovu njihove sekvence i organizacije domena koji se vezuju za ATP, takođe poznati kao nabori koji se vezuju za nukleotide [205]. *MDR1*

(*ABCB1*) gen se prostire na više od 100 kb na dugom kraku hromozoma 7 (7q21.13) a sastoji se od promotorskog regiona i 28 egzona [195]. Jedan od najopsežnije proučavanih polimorfizama *MDR1* rs1045642, SNP, smješten u sredini egzona 27 (Slika 16), čija je posljedica zamjena nukleotida citozina i timina (C3435T) [206]. Važno je naglasiti da se varijantni alel \*T ovog polimorfizma javlja sa visokom prevalencijom u populaciji bijelaca (oko 50%), i rezultuje smanjenom ekspresijom i smanjenom aktivnosti P-gp [207]. Ova egzonska varijanta (C3435T) je dobila značajnu pažnju kada su u pitanju funkcionalni efekti ovog polimorfizma [208]. *Fellay* i saradnici su pokazali da je genotip *MDR1*\*T/T povezan sa niskom ekspresijom *MDR1* transkripta i ekspresijom P-glikoproteina u mononuklearnim ćelijama periferne krvi[209]. *Hitzl* i saradnici su pokazali da je u CD56+ ćelijama genotip *MDR1*\*T/T sa smanjenom funkcijom i ekspresijom P-glikoproteina u poređenju sa *MDR1*\*C/C genotipom [210]. U studiji koje su uključivale bolest bubrega, istraživao je efekat mutacije C3435T na nivo ekspresije *MDR1* mRNA, i otkriveni su značajno povišene nivoe transkripta kod pacijenata sa *MDR1*\*C/C u poređenju sa *MDR1*\*T/T genotipom [211].



Slika 16. Polimorfizam *MDR1* gena, pripremljeno u [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

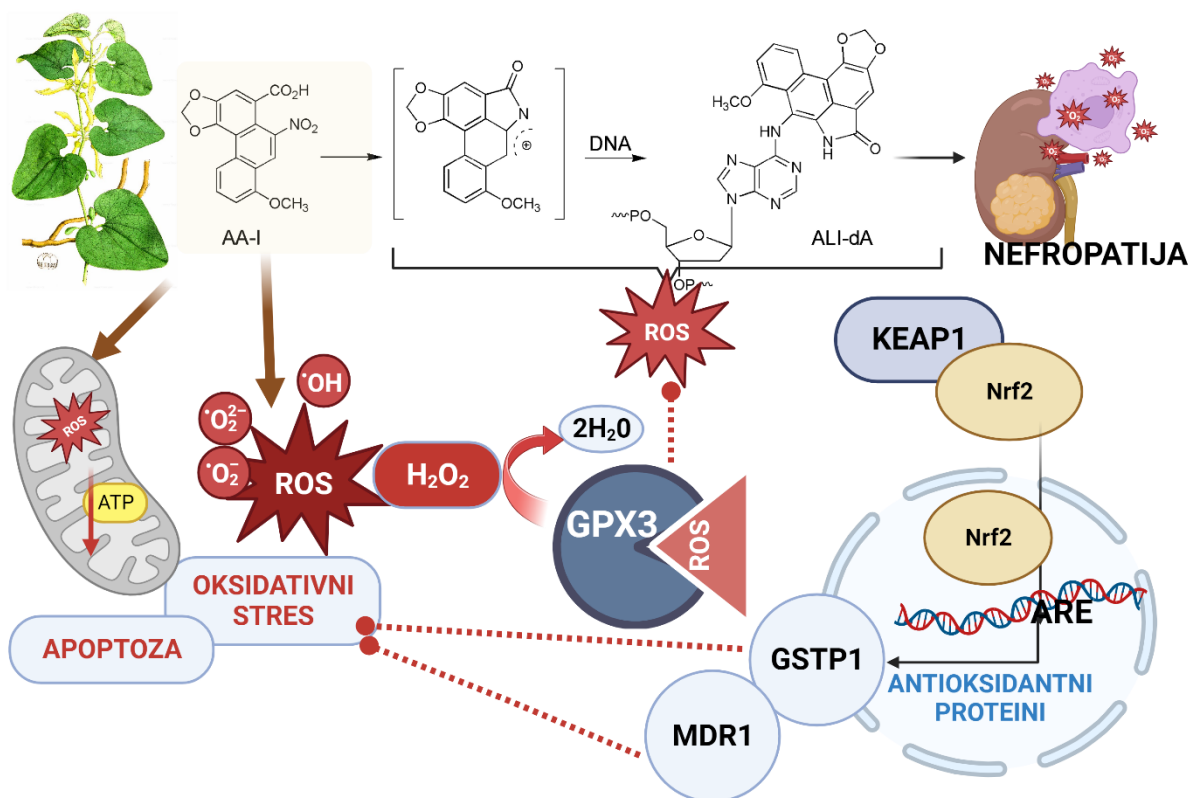
### 1.5.6 Značaj ispitivanja polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u BEN

U svjetlu činjenice da je Republika Srpska endemsko područje za Balkansku endemsku nefropatiju, kao i da oksidativni stres može da ima važnu ulogu u njenom nastanku i progresiji, od velikog je značaja ispitati povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za BEN (*Slika 17*). Dostupni literarni podaci o njihovoj potencijalnoj ulozi u razvoju BEN su relativno oskudni. Šta više, posljednjih godina sve više se javlja težnja ka personalizovanom pristupa etiološki kompleksnim bolestima, među kojima je i BEN, što bi moglo da doprinese blagovremenoj dijagnostici, prognozi i praćenju oboljelih od BEN i BEN-udruženih tumora. Prema tome, ispitivanje polimorfizama gena koji učestvuju u odbrani od oksidativnog stresa moglo bi da doprinese definisanju potencijalnih biomarkera koji bi mogli da pomognu u procjeni inter-individualnih razlika, kao i rizika obolijevanja od BEN i tumora gornjeg urotelijuma.

Na osnovu eksperimentalnih podataka o ulozi oksidativnog stresa u metabolizmu aristolohijske kiseline, kao uzročnika BEN, kao i podataka da su polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine povezani sa komplikacijama ove bolesti, može se pretpostaviti da su ovi genetski polimorfizmi takođe značajni u patogenezi samog BEN i BEN-udruženih tumora. Da bi se procijenila njihova uloga od velikog je značaja sprovesti sveobuhvatnu genetsku studiju koja bi uporedo analizirala distribuciju ovih polimorfizama kod pacijenata sa endemskog područja, i zdravih osoba iz endemskih regiona Republike Srpske. Od posebnog je interesa ispitivanje polimorfizama u genima koji kodiraju regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (*KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1*, *GPX3* i *MDR1*), uzevši u obzir kompleksnu bioaktivaciju aristolohijske kiseline, koja dovodi do oksidativnog stresa u BEN. Obzirom da genetski polimorfizmi, osim *GSTP1*, nisu do sada analizirani kod pacijenata sa BEN, postojala je potreba za studijom kojom bi ispitala povezanost polimorfizama određenih antioksidantnih gena u BEN. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, među njima se posebno ističu polimorfizmi u genima za *GSTP1*, te polimorfizmi u genu *Nrf2* koji kodira regulatorni protein Nrf2, dio veoma moćnog antioksidativnog Nrf2-Keap1 signalnog puta. Takođe, i polimorfizmi u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein su povezani sa razvojem BEN, a nisu ispitivani kod pacijenata sa BEN u Republici Srpskoj. Stoga je potrebno u jednoj sveobuhvatnoj studiji, po prvi put, odrediti distribucija genskih alela navedenih polimorfizama. Sve ovo bi moglo da doprinese i upotpuni dosadašnja saznanja o značaju oksidativnog stresa u nastanku BEN i tumora urotelijuma. Uzevši u obzir i pojavu slične bolesti



na drugim kontinentima, kao što je AAN u Kini, naše istraživanje moglo bi da doprinese utvrđivanju postojanja određenih genetskih specifičnosti naše populacije u genima koji kodiraju *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1*, *GPX3* i *MDR1* u odnosu na druge populacije u Evropi i svijetu.



**Slika 17.** Uloga antioksidatnih proteina u odbrani od oksidativnog stresa i apoptoze nastale djelovanjem aristolohijske kiseline u BEN.

Aristolohijska kiselina I (AA-I); 7- (deoksiadenozin-N6-il) aristolaktam I (ALI-dA); adenzin trifosfat (ATP); Nrf2 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) KEAP1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*); reaktivne vrste kiseline (ROS); vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); ajnon radikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), singlet kiseonik (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hidroksi radikal (·OH), perhidroksiradikal (HO<sub>2</sub>·); glutation peroksidaza 3 (GPX3); glutation transferaza P (GSTP1); MDR1 (engl. *Multidrug resistance 1*); elementi antioksidativnog odgovora (ARE).

## 2. CILJEVI

1. Odrediti distribuciju polimorfizama gena za *KEAP1* (rs1048290), *Nrf2* (rs6721961), *GSTP1AB* (rs1695), *GSTPA1CD* (rs1138272), *GPX3* (rs8177412) i *MDR1* (rs1045642) gena kod bolesnika sa BEN i pripadnika kontrolne grupe, kao i bolesnika koji su razvili tumor gornjeg urotelijuma
2. Ispitati povezanost pojedinačnih polimorfizama *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* sa rizikom za nastanak BEN i tumora gornjeg urotelijuma
3. Ispitati povezanost *GSTP1ABCD* haplotipova sa rizikom za nastanak BEN
4. Ispitati da li postoji kumulativni efekat ispitivanih genotipova na rizik za nastanak BEN

### 3. MATERIJAL I METODE

Za procjenu uloge polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u nastanku BEN, izvedena je studija *slučajeva i kontrola*, dok je za analizu polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine u nastanku tumora gornjeg urotelijuma na terenu BEN izvedena *studija slučajeva*.

#### 3.1 SELEKCIJA ISPITANIKA

U cilju određivanja polimorfizama *Nrf2* (rs6721961), *KEAP1* (rs1048290), *GSTP1AB* (rs1695), *GSTPA1CD* (rs1138272), *GPX3* (rs8177412) i *MDR1* (rs1045642) gena u studiju je uključeno 349 ispitanika koji su podijeljeni u dvije grupe, grupu oboljelih i kontrolnu grupu.

Gruppu oboljelih činilo je 209 pacijenata, sa područja Bijeljine i Šamca, čiji su DNK uzorci dio biobanke ispitanika sa dijagnozom BEN formirane na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, prikupljeni u periodu od januara do decembra 2012. godine, u okviru ranijih istraživanja.

Kriterijumi za uključivanje u ispitivanje bili su:

- punoljetni stanovnici endemskih područja Republike Srpske (Bijeljina i Šamac) kod kojih je epidemiološki, klinički i ehosonografski potvrđena dijagnoza BEN
- potpisan informisani pristanak

Kontrolnu grupu činilo je 140 ispitanika, stanovnika endemskih područja Bijeljine, bez dijagnoze BEN. Upareni po uzrastu i polu ispitanici kontrolne grupe su uključeni u studiju u toku redovnih sistematskih pregleda odraslih stanovnika endemskih regiona.

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u kontrolnu grupu bili su:

- punoljetni stanovnici endemskih područja,
- laboratorijski, klinički i ehosonografski potvrđeno odsustvo BEN
- klinički i laboratorijski potvrđeno odsustvo drugih bubrežnih bolesti (vrijednosti uree i kreatinina u krvi u referentnim granicama)
- potvrđeno odsustvo dijabetesa i malignih bolesti
- potpisan informisani pristanak

Uslov za neuključivanje u studiju bio je stav ispitanika da ne želi da učestvuje u istraživanju, kao i dokaz o postojanju malignog oboljenja i dijabetesa u istoriji bolesti.

Za prikupljanje demografskih podataka ispitanika kontrolne grupe korišten je strukturisani epidemiološki upitnik. Upitnik je sadržavao pitanja o starosti, polu, mjestu rođenja i stanovanja, antropometrijskim parametrima, zanimanju, pušenju, te dužini pušačkog staža.

Svi ispitanici koji su ispunjavali kriterije za uključivanje u ispitivanje su informisani o svrsi ispitivanja, korištenju podataka iz medicinske dokumentacije, kliničkom pregledu i uzorkovanju krvi za planirano istraživanje, nakon čega su dobrovoljno potpisali informisani pristanak.

Studija je izvedena u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci (broj etičke dozvole 18/4.8/23 od 16. 01. 2023. godine), Etičkog komiteta JZU „Sveti Vračevi“ Bijeljina (broj etičke dozvole 4315-3-2/21 od 24. 12. 2021. godine), kao i sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema poslednjoj revidiranoj verziji). Svi ispitanici od kojih je uzet biološki materijal korišten u studiji, kao i lični podaci, potpisali su pristanak za učešće u studiji. Ispitanici su obaviješteni o ciljevima i očekivanim ishodima studije. Obzirom da su uzorci DNK grupe oboljelih dio biobanke ispitanika formirane na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu studija je odobrena i od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 1322/VII-13 (od 07.07.2022. godine).

### 3.2 METODE ZA ODREĐIVANJE REGULATORNIH I KATALITIČKIH ANTIOKSIDANTNIH PROTEINA

Za analizu polimorfizama od svih ispitanika je uzeto po 2 mL pune krvi u vakutajnere, sa etilen diamin tetra sirćetna kiselina (EDTA) kao antikoagulansom, te su uzorci krvi zamrzavani i čuvani na -20°C do trenutka izolacije DNK.

#### 3.2.1 Izolacija DNK

Izolacija DNK iz 200µL venepunktirane krvi rađena je korištenjem komercijalnog kita PureLink™ Genomic DNA Mini Kit-a (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Kat. br. K182001*), prema uputstvu proizvođača. Izolacija DNK se odvijala kroz nekoliko koraka. Prvi korak predstavlja liziranje membrane limfocita, dok su se u narednom koraku proteini vezani za DNK uklanjali proteinazom K, a ostaci RNK uz pomoć RNA-aze A. Nakon toga, dobijeni lizat se prenosi u mini spin kolone sa silikonskom membranom koja selektivno vezuje DNK. Ostatak lizata ispira se serijom pufera koji u svom sastavu imaju soli i etanol što omogućava da se proteini i drugi kontaminanti, koji bi mogli da inhibiraju reakciju lančanog umnožavanja,

odstrane. Kao krajnji korak, DNK je ispirana sa mini spin kolone, alikvotirana i čuvana na -20°C do izvođenja PCR.

Izolacija DNK ispitanika kontrolne grupe je vršena u Centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci, prema opisanom protokolu korištenjem prethodno navedenog komercijalnog kita.

Izolacija DNK grupe oboljelih je vršena, prema istom protokolu, na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Određivanje polimorfizama gena za *Nrf2*, *KEAP 1*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* za sve ispitanike uključene u istraživanje (i grupu oboljelih i kontrolnu grupu) je urađeno u Centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci.

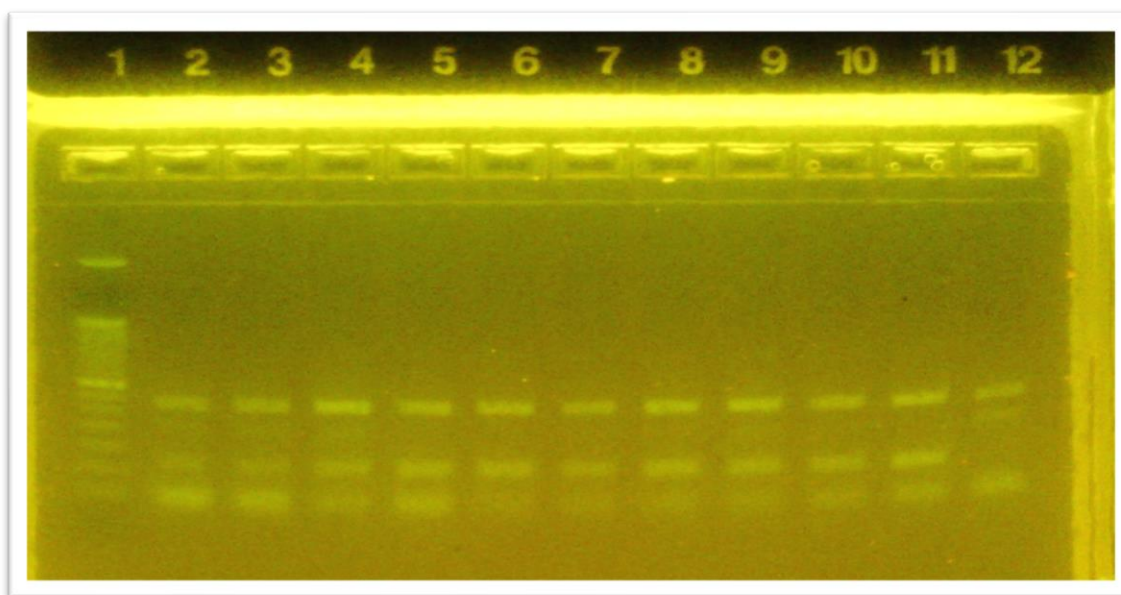
### 3.2.2 Određivanje *Nrf2* polimorfizma (rs6721961)

Inverzioni polimorfizam rs6721961 *Nrf2* gena je određen PCR-CTTP metodom (engl. *Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers*) prema modifikovanoj metodi autora Shimoyama Y. i sar. Reakciona mješavina se sastojala od nekoliko komponenti, koje su uključivale vodu, odgovarajući Master Mix i prajmere. Detaljan sastav reakcione smješe dat je u *Tabela 1*. Nakon pripreme smješe, PCR tubice su stavljene u PCR aparat (*ProFlex 3 x 32-well PCR System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Reakcija amplifikacije se odvijala kroz 6 koraka. Korak broj 1 činila je inkubacija od 10 minuta na 95°C, nakon čega su uslijedila 33 ciklusa koja su obuhvatila korak broj 2 od 1 minuta na 95°C, korak broj 3 od 1 minut na 64°C, korak broj 4 od 1 minut na 72°C. Korak broj 5 je činila inkubacija na 72°C od 5 minuta, dok je finalni korak obuhvatao hlađenje i održavanje reakcione smješe na 4°.

**Tabela 1.** Sastav reakcione mješavine za određivanje *Nrf2* polimorfizma (rs6721961)

<b>Komponenta</b>	<b>Količine po uzorku</b>
Voda	4.6 µL
PCR MasterMix ( <i>Thermo Scientific. Waltham. MA</i> )	10 µL
<i>Nrf2</i> prajmer 1 (10 µM. <i>Invitrogen. Waltham. MA</i> ) CCCTGATTTGGAGGTGCAGAACC	0.85 µL
<i>Nrf2</i> prajmer 2 (10 µM. <i>Invitrogen. Waltham. MA</i> ) GGGGAGATGTGGACAGCG	0.85 µL
<i>Nrf2</i> prajmer 3 (10 µM. <i>Invitrogen. Waltham. MA</i> ) GCCAACACGAGCTGCCGGA	0.85 µL
<i>Nrf2</i> prajmer 4 (10 µM. <i>Invitrogen. Waltham. MA</i> ) CTCCGTTTGCCTTTGACGAC	0.85 µL
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>18 µL</b>

Nakon dodatnog hlađenja smjese u trajanju od 20 min, produkti amplifikacije razdvajani su elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Po 20  $\mu$ l smješe je nanošeno u bunariće komercijalnog gela za elektroforezu (*Agarose Gel with SYBR, 2%, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Osim uzoraka, u cilju preciznijeg određivanja položaja proteinskih traka na svaki gel je nanošen i proteinski marker (*E-Gel 50 bp DNA Ladder, Invitrogen*). Ovako pripremljeni gelovi su priključeni na aparat za elektroforezu (*E-Gel Power Electrophoresis, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), na kojem je izvršena i vizualizacija PCR proizvoda (*Slika 18*). Potom je urađena interpretacija rezultata, pri čemu je prisustvo dvije trake veličine 282 i 113 bp označavalo je prisustvo *Nrf2*\*C/C genotipa (referentni homozigot), prisustvo dvije trake veličine 282 i 205bp označavalo prisustvo *Nrf2*\*A/A genotipa (varijantni homozigot), dok je prisustvo sve tri trake veličine 282, 205 i 113bp predstavljalo je *Nrf2*\*C/A genotipa (heterozigot). Kako bi se potvrdila ispravnost PCR reakcije i isključila mogućnost kontaminacije opreme i uređaja, u svaku analizu je uključena i negativna kontrola koju su činile sve komponente PCR smješe osim ispitivanog uzorka.



**Slika 18.** Elektroforeza na 2% agaroznom gelu: PCR produkti *Nrf2* gena.

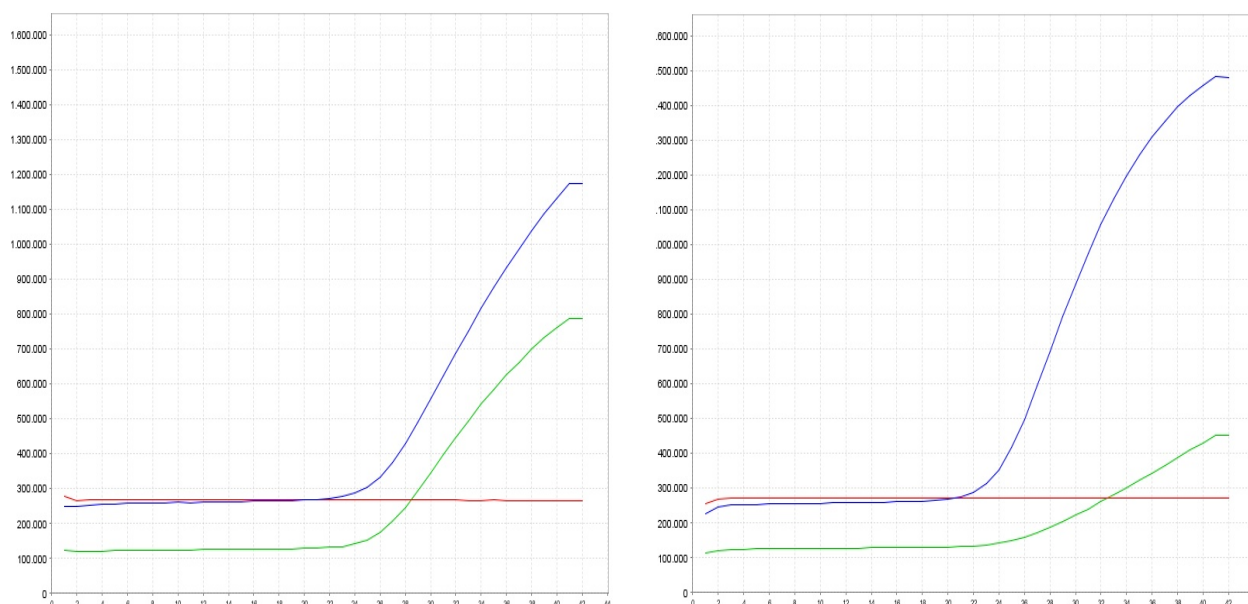
Traka 1 marker; Trake 2,3,4 i 5 predstavljaju \*C/A genotip (282 bp, 213 bp, 205 bp); trake 6,7,8,9,10 i 11 su \*C/C genotip; Traka 12 predstavlja \*A/A genotype (282 bp, 213 bp).

### 3.2.3 Određivanje polimorfizama gena za antioksidantne proteine metodom RT-PCR

Polimorfizam gena *KEAP1* (rs1048290), *GSTPIAB* (rs1695), *GSTPA1CD* (rs1138272), *GPX3* (rs8177412) i *MDR1* (rs1045642) su određivani metodom RT-PCR (engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*).

Princip RT-PCR lančane reakcije polimeraze zasniva se na tome da se, u *in vitro* uslovima, relativno kratak fragment DNK umnožava u veliki broj identičnih kopija. Ova reakcija se odvija kroz više ciklusa koji se ponavljaju, pri čemu svaki ciklus uključuje tri osnovna koraka. Prvi od njih predstavlja denaturaciju koja se odvija se na temperaturi od 95°C, pri čemu dolazi do gubitka dvolančane strukture DNK matrice. Drugi korak je hibridizacija DNK matrice sa probom i specifičnim prajmerima (oligonukleotidima). SNP testovi sadrže VIC sondu obilježenu bojom, FAM sondu obilježenu bojom i dva prajmera specifična za ciljani polimorfizam. Nakon toga slijedi poslednji korak koji predstavlja ekstenziju prajmera, reakciju katalizovanu Taq DNK polimerazom.

Reakciona mješavina za RT-PCR pripremana je neposredno prije reakcije lančanog umnožavanja, prema preporučenom protokolu proizvođača (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Postupak je uključivao nanošenje po 1μL uzorka DNK na ploču sa 96 bunarčića (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, The Applied Biosystems*), a zatim je na ploču nanošeno 12 μL smješe koja je sadržavala odgovarajuću *Taqman* probu i *Genotyping PCR Master Mix* (*Thermo Scientific, Waltham, MA*). Za svaki od ispitivanih gena, na ploču su nanošene i negativne kontrole, u programu obilježene kao NTC. Negativna kontrola sadrže sve sastojke za PCR smješu osim DNK ispitivanog uzorka, a njena uloga je identifikacija eventualne kontaminacije reagenasa i opreme. U poslednjim koraku, prije same RT-PCR reakcije, ploča se zatvara specijalnim optičkim filmom (*MicroAmp Optical Adhesive Film The Applied Biosystems*) i stavlja se u aparat za RT-PCR (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR*). Termalni protokol za RT-PCR, za sve ispitivane polimorfizme, sastojao se od inicijalne denaturacije u trajanju od 10 minuta, nakon čega je uslijedilo više ponavljanih ciklusa 95°C 15s i 60°C 90 sekundi (broj ciklusa zavisi od ispitivanog gena) i ekstenzija na 60 °C u trajanju od 90 sekundi. Rezultati su očitavani u odgovarajućem programu koji prati *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR* aparat. Program detektuje odgovarajuću fluorescentnu boju čiji je emitovani signal direktno proporcionalan količini PCR proizvoda. Prisustvo jednog od signala iznad bazalnog nivoa fluorescencije predstavlja homozigot za navedeni alel, dok prisustvo oba signala predstavlja heterozigot (*Slika 19*).



Slika 19. Amplifikaciona kriva RT-PCR.

Crvena boja, ROX kriva; plava boja-fluorescentna boja FAM, zelena boja-fluorescentna boja VIC. Slika A-heterozigot ; Slika B-homozigot.

### 3.2.3.1 Određivanje polimorfizma *KEAP1* gena (rs1048290)

Polimorfizam gena *KEAP1* (rs1048290) određen je metodom RT-PCR, uz korištenje komercijalnog esaja identifikacionog broja: C\_\_9323035\_1\_ (*Applied Biosystem Taqman Drug Metabolism Genotyping*). Termalni protokol za *KEAP1* rs1048290, sastojao se od inicijalne denaturacije u trajanju od 4 minuta, nakon čega je uslijedilo 40 ponavljanih ciklusa (95°C 15s i 60°C 90 sekundi) i ekstenzija na 60 °C u trajanju od 90 sekundi. U slučaju *KEAP1* polimorfizma fluorescentna boja VIC označava prisustvo referentnog alela C, dok fluorescentna boja FAM označava prisustvo varijantnog alela G.

### 3.2.3.2 Određivanje polimorfizama *GSTP1* gena (rs1695, rs1138272)

Polimorfizmi unutar *GSTP1* gena, *GSTPIAB* (rs1695) i *GSTPAICD* (rs1138272) također su određivani metodom RT-PCR, uz korištenje komercijalnih esaja *Applied Biosystem Taqman Drug Metabolism Genotyping* sljedećih identifikacionih brojeva: C\_\_3237198\_20 za ispitivanje polimorfizma gena za *GSTPIAB* (rs1695) i C\_\_1049615\_20 za ispitivanje polimorfizma gena za *GSTPAICD* (rs1138272). Termalni protokol za RT-PCR, za oba polimorfizma, sastojao se od inicijalne denaturacije u trajanju od 10 minuta, 40 ponavljanih



ciklusa (95°C 15s i 60°C 90 sekundi) i ekstenzija na 60 °C u trajanju od 60 sekundi. Kada je riječ o polimorfizmima *GSTP1* gena, u slučaju *GSTP1AB* polimorfizma fluorescentna boja VIC predstavlja prisustvo alela A, a FAM prisustvo alela G. Kod *GSTP1CD* polimorfizma fluorescentna boja VIC predstavlja prisustvo alela C, dok FAM označava prisustvo alela T.

### 3.2.3.3 Određivanje polimorfizma *GPX3* gena (rs8177412)

Za određivanje polimorfizma *GPX3* (rs8177412) takođe je korišten komercijalni esej identifikacionog broja: C\_25964717\_20 (*Applied Biosystem Taqman Drug Metabolism Genotyping*). RT-PCR protokol za ovaj polimorfizam bio je sljedeći: inicijalna denaturacija u trajanju od 4 minuta, 38 ponavljanih ciklusa (95°C 15s i 60°C 90 sekundi) i ekstenzija na 60 °C u trajanju od 90 sekundi. U slučaju *GPX3* polimorfizma fluorescentna boja VIC označava prisustvo alela C, a fluorescentna boja FAM označava prisustvo alela T.

### 3.2.3.4 Određivanje polimorfizma *MDR1* gena (rs1045642)

U ispitivanim uzorcima *MDR1* (rs1045642) određen je uz upotrebu odgovarajućeg *TaqMan* eseja identifikacionog broja: C\_7586657\_20 (*Applied Biosystem Taqman Drug Metabolism Genotyping*). RT-PCR protokol za ovaj polimorfizam bio je sljedeći: inicijalna denaturacija u trajanju od 10 minuta, 50 ponavljanih ciklusa (95°C 15s i 60°C 90 sekundi) i ekstenzija na 60 °C u trajanju od 90 sekundi. U slučaju *MDR1* polimorfizma fluorescentna boja VIC označava prisustvo alela C, a fluorescentna boja FAM označava prisustvo alela T.

## 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Računskim metodama (koeficijent varijacije, vrijednosti skewness i kurtosis, statistički test Šapiro-Wilk) kao i grafičkim metodama za provjeru normalnosti (histogram, normalni Q–Q grafikon, detrendovan normalni Q–Q grafikon, grafikon kutije (*engl. boxplot*)) provjerena je normalnost raspodjele podataka. Kontinuirane varijable su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) ili medijana (minimum–maksimum), u zavisnosti od distribucije podataka. Kategoričke varijable su predstavljene kao učestalost (n, %). Poređenje kategoričkih varijabli izvršeno je pomoću  $\chi^2$  testa.  $\chi^2$  test je takođe korišćen za ispitivanje odstupanja distribucije genotipa od *Hardy–Weinberg* ravnoteže za svaki polimorfizam, kod pacijenata i kontrola pojedinačno. Značajnost razlike u učestalosti prisustva neke varijable, odnosno njenog

nivoa, u studijskoj i kontrolnoj grupi procjenjivala se univarijantnom logističkom regresionom analizom, na osnovu veličine i značajnosti odnosa šansi (*engl. odds ratio; OR*) sa intervalom povjerenja od 95% (95% IP) kroz četiri statistička modela. OR je prilagođen prema uzrastu i polu. Određivanje neravnoteže veze (*engl. Linkage disequilibrium; LD*) između SNP, kao i analize haplotipa izvršena je se u programima *Haploview* i *SNPStats* [212,213]. LD je izražena kao  $D'$ .  $p$  vrijednost  $\leq 0,05$  se smatrala statistički značajnom. Za procjenu prognoze boelsti korištena je *Kaplan–Meir-ova* neparametarska metoda koja se koristi za analizu preživljavanja. Kalkulator vjerovatnoće preživljavanja generiše *Kaplan-Meier-ovu* krivu sa intervalom povjerenja i izračunava *Log-Rank* test. Statistička analiza dobijenih rezultata je izvedena korištenjem SPSS 17.0 (*SPSSInc., Chicago, IL, USA*).

## 4. REZULTATI

Polimorfizmi gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine *KEAP1* (rs1048290), *Nrf2* (rs6721961), *GSTP1AB* (rs1695), *GSTPA1CD* (rs1138272), *GPX3* (rs8177412) i *MDR1* (rs1045642) određivani su kod 209 pacijenata sa Balkanskom endemskom nefropatijom i 140 ispitanika kontrolne grupe.

### 4.1 DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika obje grupe prikazani su u *Tabeli 2*. Kao što se može vidjeti nije bilo statistički značajne razlike između grupa u pogledu polne i starosne distribucije ( $p > 0,05$ ). Prosječna starost u grupi oboljelih, koju je činilo 177 muškaraca i 92 žene, bila je  $71,67 \pm 6,54$  godine, dok je u kontrolnoj grupi, koja se sastojala od 71 muškarca i 69 žena, prosječna starost bila  $70,29 \pm 6,94$  godine. Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u pogledu pušenja između grupe oboljelih i kontrolne grupe ( $p > 0,05$ ). Ipak, zastupljenost pušača u grupi BEN je bila nešto veća (33%), dok je u kontrolnoj grupi bilo 27% pušača. Kada su u pitanju maligni tumori gornjih urinarnih puteva, u grupi BEN 32 pacijenta su razvili tumor.

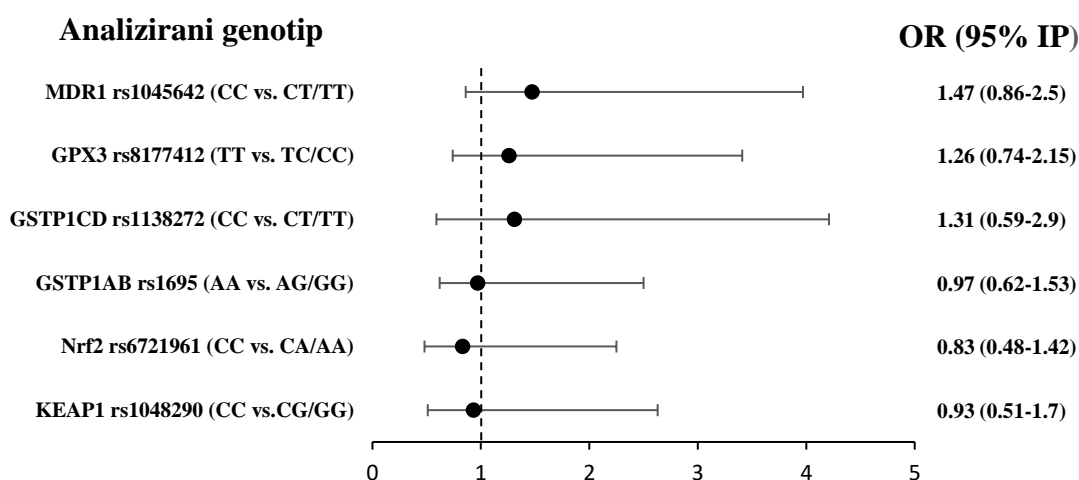
**Tabela 2.** Demografske i kliničke karakteristike BEN pacijenata i pripadnika kontrolne grupe

Demografske karakteristike	BEN, n=209	Kontrole, n=140	<i>p</i>
Pol			
Muški <i>n</i> (%)	117 (56)	71 (51)	0.146
Ženski <i>n</i> (%)	92 (44)	69 (49)	
Starost (srednje vrijednost $\pm$ SD)*	71.67 $\pm$ 6.54	70.29 $\pm$ 6.94	0.153
Pušenje, <i>n</i> (%)**			
Da	69 (33)	37 (27)	0.236
Ne	137 (67)	98 (73)	
Tumori gornjeg urotelijuma, <i>n</i> (%)**			
Da	32 (15)	//	-
Ne	177 (85)	//	

n-broj učesnika, \*standardna devijacija  $\pm$  SD; \*\*zasnovano na dostupnim podacima, // ne može se primijentiti

## 4.2 POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE SA RIZIKOM ZA NASTANAK BEN

Distribucije polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine kod pacijenata sa BEN i ispitanika kontrolne grupe prikazani su u *Tabeli 3*. Svi genotipovi ispitanika kontrolne grupe su bili u skladu sa *Hardy-Weinbergovim* ekvilibrijumom, odnosno njihova distribucija se nije značajno razlikovala od očekivane distribucije (za *KEAP1*:  $X^2=0,695$   $p=0,512$ ; za *Nrf2*  $X^2=0,009$   $p=0,921$ ; za *GSTPAB*  $X^2=0,432$   $p=0,118$ ; za *GSTPCD*  $X^2=0,234$   $p=0,628$ ; za *GPX3*  $X^2=0,120$   $p=0,728$ ; za *MDR1*  $X^2=0,028$   $p=0,866$ ). Povezanost pojedinačnih polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak BEN analizirana je kroz četiri modela (*Tabela 3*). Model 1: neprilagođeni OR; model 2: OR prilagođen prema drugim genotipovima; model 3: OR prilagođen prema uzrastu i polu; i model 4 gdje je OR prilagođen sa svim prethodno kombinovanim faktorima. Pored tabelarnog prikaza, u modelu 4, dat je i grafički prikaz povezanosti polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa BEN (*Slika 20*).



*Slika 20. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (KEAP1, Nrf2, GSTP1AB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1) sa rizikom za nastanak BEN; forest plot za model 4 sa pripadajućim 95% intervalima povjerenja.*

Na osnovu prikazanih rezultata u *Tabeli 3* može se vidjeti da u distribuciji *KEAP1* rs1048290 referentnog *KEAP1*\*C alela i varijantnog *KEAP1*\*G alela između bolesnika sa BEN i kontrolne grupe nema statistički značajne razlike ( $p>0,05$ ). Naime, distribucija *KEAP1* genotipova sa najmanje jednim varijantnim *KEAP1*\*G alelom (*KEAP1*\*C/G\*G/G genotip) je

iznosila 84% kod BEN pacijenata. Ista distribucija *KEAP1* genotipova bila je i kod ispitanika kontrolne grupe. Osobe nosici *KEAP1*\*C/G\*G/G genotipa nisu u većem riziku za nastanak BEN od nosioca *KEAP1*\*C/C genotipa (OR1: p=0,798; OR2: p=0,688; OR3: p=0,853; OR4: p=0,834).

Iz prikazanih rezultata koji se odnose na frekvenciju *Nrf2* genotipa može se uočiti da između kontrolne grupe i bolesnika sa BEN-om ne postoji razlika u pogledu distribucije *Nrf2* genotipova (p>0,05). Naime, u kontrolnoj grupi 74% ispitanika je sa \*C/C genotipom, 24% sa \*C/A i 2% sa \*A/A *Nrf2* genotipom, dok u studijskoj grupi 76% bolesnika ima \*C/C genotip, 21% \*C/A i 3% \*A/A *Nrf2* genotip. Dobijena distribucija odgovara očekivanoj distribuciji učestalosti *Nrf2* genotipova u populaciji bijele rase. Dodatno, za nosioce \*C/A i \*A/A *Nrf2* genotipova povezanih sa nižom *Nrf2* transkripcionom aktivnosti, nije utvrđen rizik za razvoj BEN u svim ispitivanim modelima (OR1 = 0,88, 95% IP = 0,55-1,46, p = 0,669; OR2 = 0,91, 95% IP = 0,55-1,50, p = 0,723; OR3 = 0,89, 95% IP = 0,54-1,46, p = 0,648; OR4 = 0,83, 95% IP = 0,48-1,42 p = 0,608).

Kada se osvrnemo na distribuciji dva analizirana polimorfizma unutar *GSTP1* gena, *GSTPIAB* rs1695 i *GSTP1CD* rs1138272, nije uočena statistički značajna razlika između bolesnika sa BEN i kontrolne grupe. Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da je najzastupljeni genotip u slučaju *GSTPIAB* bio heterozigotni *GSTP1*\*A/G u obje grupe (48% u kontrolnoj vs. 46% u BEN grupi), dok je u slučaju *GSTP1CD* najzastupljeniji bio referentni homozigotni *GSTP1*\*C/C genotip, kako u kontrolnoj tako i u grupi oboljelih (92% vs. 89%).

Na osnovu rezultata naše studije, u slučaju *GSTPIAB* polimorfizma, utvrđeno je da osobe nosioci barem jednog *varijantnog* \*G alela (*GSTPAB*\*A/G\*G/G genotipovi) ne pokazuju povećan rizik za razvoj BEN. Naime, iako je učestalost *GSTPIAB*\*G/G genotipa u bolesnika sa BEN veća nego u ispitanika kontrolne grupe (9% vs. 6%), efekat prisustva *GSTP1*\*G/G genotipa u odnosu na *GSTP1*\*A/A genotip nema statistički značajan uticaj na povećanje rizika za nastanak endemske nefropatije, u sva četiri ispitivana modela (p>0,05).

U slučaju *GSTP1CD* rs1138272 ispitivanog polimorfizma, naši rezultati su pokazali da osobe koje imaju *GSTP1*\*C/T ili T/T genotip nemaju veći rizik za razvoj endemske nefropatije u odnosu na osobe koje imaju *GSTP1*\*C/C genotip. Iako je učestalost *varijantnog* *GSTP1*\*T alela nešto veća u BEN nego u kontrolnoj grupi (11% vs. 8%), statistička značajnost je izostala (p>0,05).

Sagledavši distribuciju preostala dva ispitivana polimorfizma (*GPX3* rs8177412 i *MDR1* rs1045642) može se uočiti da je, u slučaju *GPX3* gena, *varijantni* *GPX3*\*C alel brojniji u BEN, nego u kontrolnoj grupi (24% vs. 20%). Iako rezultat koji govori u prilog razlici u distribuciji

genotipova, nije bio i statistički značajan ( $p > 0,05$ ). Ipak, kada je u pitanju polimorfizam *GPX3* gena, primijetili smo da su nosioci najmanje jednog *varijantnog GPX3\*C* alela (*GPX3\*T/C\*C/C* genotipovi) umjereno podložni razvoju BEN. Naime, osobe nosioci *GPX3\*T/C* ili *GPX3\*C/C* genotipa imaju 1,2 puta veći rizik za razvoj ove bolesti. Međutim, statistički značajna razlika je izostala u sva četiri ispitivana modela (OR1 = 1,25, 95%IP = 0,74 – 2,12,  $p = 0,389$ ; OR2 = 1,24, 95%IP = 0,72-2,11,  $p = 0,415$ ; OR3 = 1,26 95%IP = 0,75-2,14,  $p = 0,374$ ; OR4 = 1,26, 95%IP = 0,74-2,15,  $p = 0,392$ ).

U pogledu distribucije *MDRI* polimorfizma naši rezultati ukazuju na veću učestalost *varijantnih* genotipova (*MDRI\*C/T\*T/T*) u odnos na referentni *MDRI\*C/C* genotip, u grupi oboljelih nego u kontrolnoj grupi (31% vs 25%). Dodatno, na osnovu regresione analize utvrđeno je da su osobe nosioci *varijantnog MDRI\*T/T* genotipa u skoro 2 puta većem riziku za nastanak BEN, ali je rezultat bio samo blizu granice za statističku značajnost (prilagođeni OR3 = 1,82, 95%IP = 0,87-3,40,  $p = 0,059$ ).

**Tabela 3. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (KEAP1, Nrf2, GSTPIAB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1) sa rizikom za nastanak BEN**

Genotip	BEN, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>	OR 3 (95% IP)	<i>p</i>	OR 4 (95% IP)	<i>p</i>
<b>KEAP1 rs1048290</b>										
*C/C <sup>c</sup>	35 (16)	22 (16)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
*C/G	87 (42)	61 (43)	0.89 (0.48-1.67)	0.732	0.86 (0.45-1.63)	0.861	0.91 (0.48-1.72)	0.791	0.90 (0.46-1.74)	0.759
*G/G	87 (42)	57 (41)	0.95 (0.51-1.8)	0.897	0.90 (0.54-2.08)	0.763	0.97 (0.51-1.84)	0.940	0.96 (0.49-1.87)	0.920
*C/G*G/G	174 (84)	118 (84)	0.92 (0.51-1.65)	0.798	0.88 (0.49-1.6)	0.688	0.94 (0.52-1.70)	0.853	0.93 (0.51-1.70)	0.834
<b>Nrf2 rs6721961</b>										
*C/C <sup>c</sup>	158 (76)	103 (74)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
*C/A	45 (21)	34 (24)	0.86 (0.52-1.44)	0.571	0.88 (0.53-1.48)	0.648	0.86 (0.51-1.45)	0.587	0.89 (0.52-1.51)	0.671
*A/A	6 (3)	3 (2)	1.30 (0.32-0.33)	0.712	0.90 (0.19-4.17)	0.901	1.15 (0.27-4.75)	0.847	0.67 (0.14-3.21)	0.625
*C/A*A/A	51(24)	37(26)	0.88 (0.55-1.46)	0.669	0.91 (0.55-1.50)	0.723	0.89 (0.54-1.46)	0.648	0.83 (0.48-1.42)	0.608
<b>GSTPIAB rs1695</b>										
*A/A <sup>c</sup>	96 (45)	64 (46)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
*A/G	95 (46)	67 (48)	0.94 (0.60-1.47)	0.804	0.92 (0.58-1.46)	0.737	0.91 (0.58-1.44)	0.710	0.98 (0.61-1.56)	0.930
*G/G	18 (9)	9 (6)	1.33 (0.56-3.15)	0.512	1.04 (0.42-2.57)	0.931	1.34 (0.56-3.21)	0.501	0.93 (0.36-2.24)	0.894
*A/G*G/G	113 (55)	76 (54)	0.99 (0.64-1.52)	0.968	0.94 (0.60-1.47)	0.814	0.96 (0.62-1.49)	0.887	0.97 (0.62-1.53)	0.913
<b>GSTP1CD rs1138272</b>										
*C/C <sup>c</sup>	187 (89)	129(92)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
*C/T	17 (8)	11(8)	1.06 (0.48-2.35)	0.874	1.07 (0.47-2.41)	0.864	1.01 (0.45-2.26)	0.967	0.96 (0.61-1.56)	0.926
*T/T	5 (3)	0(0)	-	-	-	-	-	-	-	-
*C/T*T/T	22(11)	11 (8)	1.38 (0.64-2.94)	0.405	1.40 (0.64-3.04)	0.396	1.35 (0.63-2.90)	0.438	1.31 (0.59-2.90)	0.505
<b>GPX3 rs8177412</b>										
*T/T <sup>c</sup>	159(76)	112 (80)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
*T/C	49 (23)	26 (19)	1.32 (0.77-2.26)	0.298	1.30 (0.75-2.25)	0.124	1.33 (0.77-2.78)	0.294	1.30 (0.74-2.25)	0.351
*C/C	1 (1)	2 (1)	0.35 (0.03-3.93)	0.397	0.37 (0.32-4.34)	0.429	0.40 (0.03-4.50)	0.459	0.45 (0.03-5.23)	0.526
*T/C*C/C	50 (24)	28 (20)	1.25 (0.74-2.12)	0.389	1.24 (0.73-2.11)	0.415	1.26 (0.75-2.14)	0.374	1.26 (0.74-2.15)	0.392

**Tabela 3, nastavak. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (KEAP1, Nrf2, GSTP1AB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1) sa rizikom za nastanak BEN**

Genotip	BEN, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>	OR 3 (95% IP)	<i>p</i>	OR 4 (95% IP)	<i>p</i>
<b>MDR1 rs1045642</b>										
*C/C <sup>c</sup>	39 (20)	36 (26)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
*C/T	100 (49)	69 (49)	1.33 (0.77-2.31)	0.297	1.31 (0.75-2.29)	0.341	1.37 (0.78-2.38)	0.263	1.35 (0.77-2.39)	0.290
*T/T	43 (31)	35 (25)	1.66 (0.90-3.06)	0.105	1.55 (0.83-2.90)	0.164	1.82 (0.97-3.40)	0.059	1.70 (0.99-3.22)	0.099
*C/T*T/T	143 (80)	104 (74)	1.44 (0.86-2.42)	0.160	1.45 (0.86-2.44)	0.159	1.51 (0.90-2.56)	0.117	1.47 (0.86-2.50)	0.149

\*OR 1-odnos šansi; OR 2-prilagođen prema drugim genotipovima; OR 3- prilagođen prema uzrastu i polu; OR 4-prilagođen prema prethodno kombinovanim faktorima;

<sup>b</sup>95%IP- 95% interval povjerenja; *p* < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup> Referentna grupa



#### 4.3 POVEZANOST POJEDINAČNIH POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE SA RIZIKOM ZA NASTANAK BEN U ODNOSU NA POL

U sljedećem koraku izvršili smo podjelu grupe oboljelih na muškarce i žene, te se unutar grupa fokusirali na procjenu potencijalnog individualnog efekta polimorfizama gena *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTPAB*, *GSTPCD*, *GPX3* i *MDR1* na rizik za nastanak BEN, u odnosu na pol.

Iz prikazanih rezultata u *Tabeli 4.* se može vidjeti da, kao i kada je posmatrana ukupna kohorta, ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova analiziranih polimorfizama i riziku za nastanak BEN u ženskoj populaciji u odnosu na pripadnice kontrolne grupe ( $p>0,05$ ). Ipak, posmatrajući *MDR1* rs1045642 polimorfizam može se uočiti da žene nosioci *MDR1*\**C/T* ili *MDR1*\**T/T* genotipa imaju više od 1,5 puta veću podložnost za razvoj BEN (OR1 = 1,69, 95%IP = 0,79-3,13,  $p = 0,172$ ; OR2 = 1,51 95%IP = 0,69-3,29,  $p = 0,296$ ; OR3 = 1,91, 95%IP = 0,89-4,32,  $p = 0,090$ ; OR4 = 1,75, 95%IP = 0,78-3,93,  $p = 0,169$ ). Ipak, rezultat nije bio statistički značajan ( $p>0,05$ ). Dodatno, žene nosioci *GPX3*\**T/C* ili *T/T* genotipa su bili pod oko 2 puta većim rizikom da obole od endemske nefropatije u odnosu na žene nosioce *GPX3*\**T/T* genotipa. Međutim, rezultati ove analize se nisu pokazali i statistički značajnim ( $p>0,05$ ). Logističkom regresijom nije pokazano da su preostali ispitivani polimorfizmi (*KEAP1*, *Nrf2*, *GSTPIAB*, *GSTP1CD*, *MDR1*) individualno povećavaju rizik za razvoj BEN kod žena. *Slika 21* prikazuje analizu distribucije polimorfizama u populaciji žena sa BEN, prilagođenu prema drugim analiziranim genotipovima i godinama (starosti).

Distribucija polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine kod muških pacijenata sa BEN i rizik za nastanak ove bolesti, prikazani su u *Tabeli 5.* Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji analiziranih genotipova među pacijentima i pripadnicima kontrolne grupe ( $p>0,05$ ). Za razliku od ženske populacije, kod muškaraca najveći rizik za razvoj BEN imali su osobe nosioci *GSTPCD*\**C/T*\**T/T* genotipova. Naime, muškarci nosioci *GSTPCD*\**C/T* ili *GSTPCD*\**T/T* genotipa su skoro 2 puta podložniji za razvoj BEN (OR1 = 1,54, 95%IP = 0,56-1,48,  $p = 0,393$ ; OR2 = 1,66 95%IP = 0,58-4,81,  $p = 0,342$ ; OR3 = 1,56, 95%IP = 0,57-4,26,  $p = 0,377$ ; OR4 = 1,67, 95%IP = 0,58-4,81,  $p = 0,340$ ), iako rezultat nije bio statistički značajan ( $p>0,05$ ). Iz prikazanih rezultata, može se zaključiti da se preostali analizirani polimorfizmi *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTPIAB*, *GSTP1CD*, *GPX3* u populaciji muškaraca nisu pokazali značajnim za nastanak endemske nefropatije. Dodatno, na *Slici 22* pokazana je distribucija polimorfizama u populaciji muškaraca sa BEN, prilagođena prema drugim analiziranim genotipovima i godinama ispitanika.

**Tabela 4.** Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (*KEAP1*, *Nrf2*, *GSTPIAB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1*) sa rizikom za nastanak BEN kod žena

Genotip	Pacijenti, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 <sup>a</sup> (95% IP)	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>	OR 3 (95% IP)	<i>p</i>	OR 4 (95% IP)	<i>p</i>
<b><i>KEAP1</i> rs1048290</b>										
*C/C <sup>c</sup>	11 (12)	11 (15)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/G*G/G	81 (88)	60 (85)	1.35 (0.54-3.32)	0.513	1.49 (0.58-3.78)	0.399	1.32 (0.53-3.28)	0.549	1.43 (0.55-3.71)	0.453
<b><i>Nrf2</i> rs6721961</b>										
*C/C <sup>c</sup>	67 (73)	57 (80)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/A*A/A	25 (27)	14 (20)	1.51 (0.72-3.19)	0.270	1.47 (0.68-3.18)	0.323	1.46 (0.68-3.10)	0.323	1.39 (0.63-3.05)	0.406
<b><i>GSTPIAB</i> rs1695</b>										
*A/A <sup>c</sup>	41 (45)	35 (49)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*A/G*G/G	51 (55)	36 (51)	1.20 (0.65-2.25)	0.548	1.27 (0.66-2.45)	0.461	1.09 (0.57-2.06)	0.781	1.15 (0.59-2.25)	0.667
<b><i>GSTP1CD</i> rs1138272</b>										
*C/C <sup>c</sup>	85 (92)	66 (93)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/T*T/T	7 (8)	5 (7)	1.08 (0.33-3.58)	0.891	0.96 (0.27-3.36)	0.961	1.02 (0.30-3.45)	0.970	1.27 (0.55-2.93)	0.931
<b><i>GPX3</i> rs8177412</b>										
*T/T <sup>c</sup>	66 (72)	60 (85)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*T/C*C/C	26 (28)	11 (15)	2.14 (0.97-4.72)	0.057	2.15 (0.96-4.81)	0.062	2.09 (0.94-4.64)	0.068	2.09 (0.92-4.72)	0.075
<b><i>MDR1</i> rs1045642</b>										
*C/C <sup>c</sup>	16 (18)	19 (27)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/T*T/T	74 (82)	52 (73)	1.69 (0.79-3.13)	0.172	1.51 (0.69-3.29)	0.296	1.97 (0.89-4.32)	0.090	1.75 (0.78-3.93)	0.169

\*OR 1-odnos šansi; OR 2-prilagođen prema drugim genotipovima; OR 3- prilagođen prema starosti; OR 4-prilagođen prema prethodno kombinovanim faktorima; <sup>b</sup>95%IP-

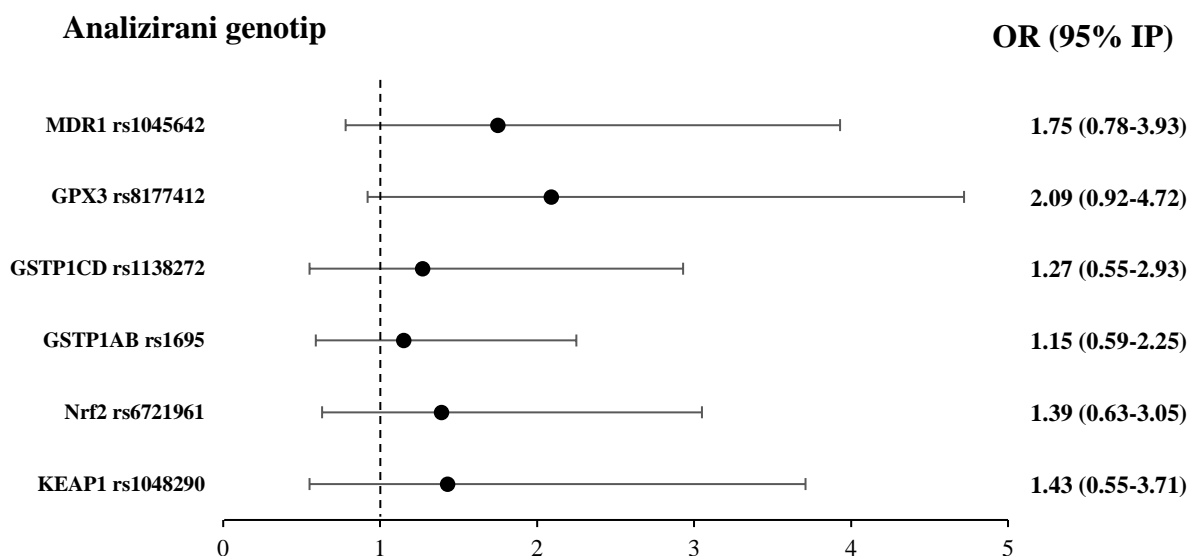
95% interval povjerenja; *p* < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup> Referentna grupa

**Tabela 5. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (KEAP1, Nrf2, GSTPIAB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1) sa rizikom za nastanak BEN kod muškaraca**

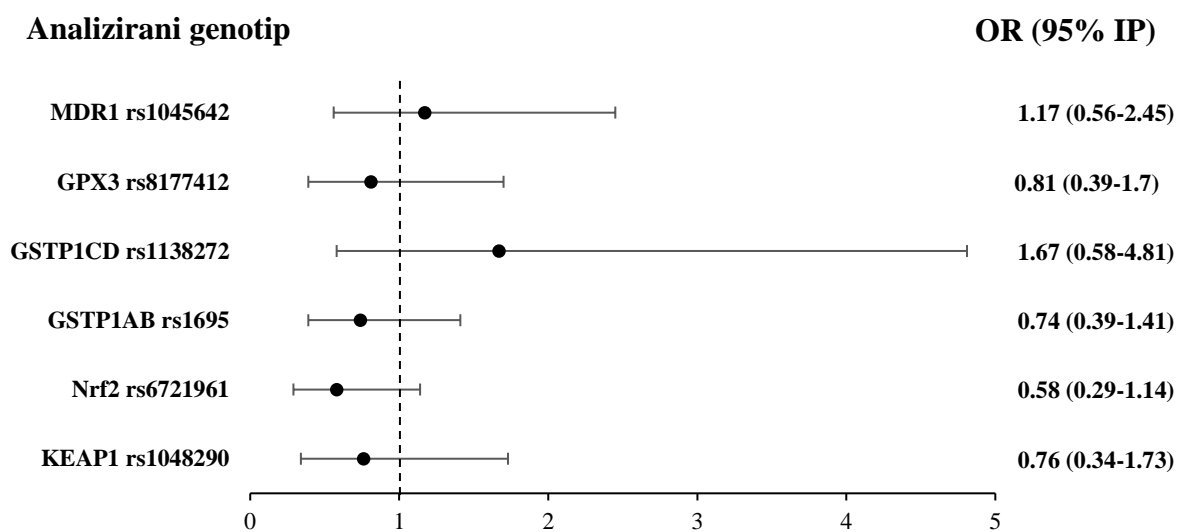
Genotip	Pacijenti, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 <sup>a</sup> (95% IP)	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>	OR 3 (95% IP)	<i>p</i>	OR 4 (95% IP)	<i>p</i>
<b>KEAP1 rs1048290</b>										
*C/C <sup>c</sup>	24 (20)	11 (16)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/G*G/G	93 (80)	58 (84)	0.73 (0.33-1.61)	0.442	0.77 (0.34-1.74)	0.531	0.73 (0.33-1.61)	0.444	0.76 (0.34-1.73)	0.528
<b>Nrf2 rs6721961</b>										
*C/C <sup>c</sup>	91 (78)	46 (67)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/A*A/A	26 (22)	23 (33)	0.57 (0.29-1.10)	0.098	0.57 (0.29-1.13)	0.110	1.01 (0.96-1.05)	0.175	0.58 (0.29-1.14)	0.118
<b>GSTPIAB rs1695</b>										
*A/A <sup>c</sup>	55 (47)	29 (42)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*A/G*G/G	62 (53)	40 (58)	0.81 (0.44-1.49)	0.510	0.73 (0.38-1.39)	0.348	0.82 (0.45-1.50)	0.531	0.74 (0.39-1.41)	0.370
<b>GSTP1CD rs1138272</b>										
*C/C <sup>c</sup>	102 (87)	63 (92)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/T*T/T	15 (13)	6 (8)	1.54 (0.56-4.18)	0.393	1.66 (0.58-4.81)	0.342	1.56 (0.57-4.26)	0.377	1.67 (0.58-4.81)	0.340
<b>GPX3 rs8177412</b>										
*T/T <sup>c</sup>	93 (80)	52 (75)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*T/C*C/C	24 (20)	17 (25)	0.78 (0.38-1.60)	0.513	0.80 (0.38-1.66)	0.554	0.79 (0.39-1.62)	0.536	0.81 (0.39-1.70)	0.587
<b>MDR1 rs1045642</b>										
*C/C <sup>c</sup>	23 (20)	17 (25)	1.0	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-
*C/T*T/T	89 (80)	52 (75)	1.26 (0.61-2.58)	0.519	1.16 (0.55-2.44)	0.679	1.27 (0.62-2.60)	0.509	1.17 (0.56-2.45)	0.670

\*OR 1-odnos šansi; OR 2-prilagođen prema drugim genotipovima; OR 3- prilagođen prema starosti; OR 4-prilagođen prema prethodno kombinovanim faktorima; <sup>b</sup>95%IP-

95% interval povjerenja; *p* < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup> Referentna grupa



*Slika 21. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (KEAP1, Nrf2, GSTP1AB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1) sa rizikom za nastanak BEN u populaciji žena; forest plot za model 4 sa pripadajućim 95% intervalima povjerenja*



*Slika 22. Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (KEAP1, Nrf2, GSTP1AB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1) sa rizikom za nastanak BEN u populaciji muškaraca; forest plot za model 4 sa pripadajućim 95% intervalima povjerenja*

#### 4.4 KOMBINOVANI EFEKAT POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE NA RIZIK ZA NASTANAK BEN

Osim pojedinačnog uticaja polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine, u našem istraživanju su ispitivani i efekti pomenutih polimorfizama u kombinaciji, na podložnost za nastanak BEN. Povezanost kombinovanih polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine sa rizikom za nastanak BEN analizirana je kroz dva modela: OR1 (neprilagođeni model) i OR2 (model prilagođen u odnosu na starost i pol).

Iz prikazanih rezultata u *Tabeli 6* može se uočiti da najveći rizik za nastanak endemske nefropatije, imaju osobe sa bar jednim prisutnim *varijantnim GPX3\*C* alelom koji su nosioci i bar jednog *MDR1\*T* *varijantnog* alela. U ovih ispitanika, rizik za nastanak BEN je oko 2 puta veći u odnosu na osobe sa *GPX3\*T/T +MDR1\*C/C* genotipom (OR1 = 1.75, 95% CI = 0.86 – 3.55, p = 0.117; OR2 = 1.86, 95%CI = 0.91 – 3.80, p = 0.087). Ipak, rezultat nije dostigao statističku značajnost (p>0,05). Na osnovu ove analize utvrđeno je i da uticaj kombinacije genetskih polimorfizama *KEAP1* i *Nrf2*, doprinosi većem riziku za pojavu BEN. Naime, osobe koji su nosioci *Nrf2\*C/C +KEAP1\*C/G* ili *G/G* genotipa su skoro 2 puta podložniji nastanku endemske nefropatije, u poređenju sa osoba koje imaju *Nrf2\*C/C+KEAP1\*C/C* genotip. Međutim, u ovom slučaju, rizik za nastanak endemske nefropatije nije dostigao i statističku značajnosti (prilagođeni OR2 = 1,91; 95%IP = 0.5–7,41; p = 0,335). Efekat kombinovanih genetskih polimorfizama *Nrf2* i *GSTP1* gena nije uticao na rizik za nastanak BEN među ispitanicima naše studije. Neznatno niži rizik za nastanak endemske nefropatije imaju bolesnici nosioci *GSTPIAB\*A/A* genotipa i bar jednog *varijantnog \*A* alela *Nrf2* gena u odnosu na ispitanike sa *Nrf2\*C/C+GSTPAB\*A/A* genotipom (prilagođeni OR2 = 0,74; 95%IP = 0,37–1,48; p = 0,399). Uticaj kombinacije genetskih polimorfizama *Nrf2* i *GSTP1CD* u nastanku endemske nefropatije je doveo do smanjenja rizika u ispitanika koji osim *GSTP1CD\*C/C* genotipa imaju prisutan ili *Nrf2\*C/A* ili *Nrf2\*A/A* *varijantni* genotip umjesto *Nrf2\*C/C* referentnog genotipa. Međutim, taj rezultat nije dostigao i statističku značajnosti (prilagođeni OR2 = 0,89; CI = 0,53–1,50; p = 0,675). Iz prikazanih rezultata koji se odnose na kombinovani efekat *Nrf2* i *MDR1* genotipova, može se uočiti da najveći rizik za nastanak endemske nefropatije imaju osobe koje su nosioci *Nrf2\*C/C+MDR1\*C/T* ili *MDR1\*T/T* genotipa. Međutim, rizik za nastanak BEN u ovih ispitanika nije i statistički značajno veći (prilagođeni OR2 = 1,52; CI = 0,83–2,75; p = 0,167).

**Tabela 6. Kombinovani polimorfizam KEAP1, Nrf2, GSTP1AB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1 gena i rizik za nastanak BEN**

Genotip	BEN, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>
<b>GPX3 rs8177412+ MDR1 rs1045642</b>						
GPX3* <i>TT</i> /MDR1* <i>CC</i> <sup>c</sup>	33 (16)	31 (22)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
GPX3* <i>TT</i> /MDR1* <i>CT</i> * <i>TT</i>	120 (60)	81 (58)	1.39 (0.79-2.45)	0.252	1.46 (0.82-2.60)	0.193
GPX3* <i>CC</i> * <i>TC</i> /MDR1* <i>CC</i>	6 (3)	5 (4)	1.12 (0.31-4.07)	0.855	1.16 (0.31-4.22)	0.820
GPX3* <i>CC</i> * <i>TC</i> /MDR1* <i>CT</i> * <i>TT</i>	43 (21)	23 (16)	1.75 (0.86-3.55)	0.117	1.86 (0.91-3.80)	0.087
<b>Nrf2 rs6721961+ KEAP1 rs1048290</b>						
Nrf2* <i>CC</i> /KEAP1* <i>CC</i> <sup>c</sup>	25 (12)	18 (13)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
Nrf2* <i>CC</i> /KEAP1* <i>CG</i> * <i>GG</i>	10 (5)	4 (3)	1.80 (0.48-6.62)	0.379	1.91 (0.51-7.14)	0.335
Nrf2* <i>CA</i> * <i>AA</i> /KEAP1* <i>CC</i>	133 (63)	85 (61)	1.12 (0.58-2.18)	0.725	1.17 (0.60-2.30)	0.634
Nrf2* <i>CA</i> * <i>AA</i> /KEAP1* <i>CG</i> * <i>GG</i>	41 (20)	33 (23)	0.89 (0.41-1.91)	0.774	0.91 (0.42-1.96)	0.818
<b>Nrf2 rs6721961+ MDR1 rs1045642</b>						
Nrf2* <i>CC</i> /MDR1* <i>CC</i> <sup>c</sup>	31 (15)	28 (20)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
Nrf2* <i>CC</i> /MDR1* <i>CT</i> * <i>TT</i>	121 (60)	75 (53)	1.45 (0.81-2.62)	0.208	1.52 (0.83-2.75)	0.167
Nrf2* <i>CA</i> * <i>AA</i> /MDR1* <i>CC</i>	8 (4)	8 (6)	0.90 (0.29-2.72)	0.857	0.87 (0.28-2.68)	0.811
Nrf2* <i>CA</i> * <i>AA</i> /MDR1* <i>CT</i> * <i>TT</i>	42 (21)	29 (21)	1.30 (0.65-2.62)	0.450	1.35 (0.67-2.74)	0.396
<b>Nrf2 rs6721961+ GSTP1AB rs1695</b>						
Nrf2* <i>CC</i> /GSTP1AB* <i>AA</i> <sup>c</sup>	70 (34)	43 (31)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
Nrf2* <i>CC</i> /GSTP1AB* <i>AG</i> * <i>GG</i>	88 (42)	60 (43)	0.90 (0.54-1.48)	0.684	0.87 (0.52-1.44)	0.599
Nrf2* <i>CA</i> * <i>AA</i> /GSTP1AB* <i>AA</i>	26 (12)	21 (15)	0.76 (0.38-1.51)	0.436	0.74 (0.37-1.48)	0.399
Nrf2* <i>CA</i> * <i>AA</i> /GSTP1AB* <i>AG</i> * <i>GG</i>	25 (12)	16 (11)	0.96 (0.46-1.99)	0.913	0.93 (0.44-1.95)	0.856

**Tabela 6, nastavak.** Kombinovani polimorfizam *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* gena i rizik za nastanak BEN

Genotip	BEN, <i>n</i> (%)	Kontrole, <i>n</i> (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> rs6721961+ <i>GSTP1CD</i> rs1138272</b>						
<i>Nrf2</i> * <i>CC</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CC</i> <sup>c</sup>	141 (68)	95 (68)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
<i>Nrf2</i> * <i>CC</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CT</i> * <i>TT</i>	17 (8)	8 (6)	1.43 (0.59-3.45)	0.424	1.36 (0.56-3.31)	0.494
<i>Nrf2</i> * <i>CA</i> * <i>AA</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CC</i>	46 (22)	34 (24)	0.91 (0.54-1.52)	0.724	0.89 (0.53-1.50)	0.675
<i>Nrf2</i> * <i>CA</i> * <i>AA</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CT</i> * <i>TT</i>	5 (2)	3 (2)	1.12 (0.26-4.81)	0.876	1.18 (0.27-5.14)	0.825

OR1-odnos šansi; OR2- prilagođen prema starosti i polu; 95%IP – 95 interval povjerenja; *p* < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup>-Referentna grupa

#### 4.5 POVEZANOST KOMBINOVANIH POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE RIZIKOM ZA NASTANAK BEN U ODNOSU NA POL

Obzirom na polnu stratifikaciju u kojoj je pokazano da pojedinačni polimorfizami gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine nisu ispoljili statistički značajne efekte na podložnost za nastanak BEN, analizirali smo i kombinovane efekte ovih polimorfizama na rizik za pojavu ove bolesti, u grupi muškaraca i u grupi žena. Iako u ukupnoj analizi, kombinovani polimorfizmi *GPX3* i *MDR1* gena nisu pokazali statistički značajnu povezanost sa rizikom od razvoja BEN, ova kombinacija je pokazala veliki uticaj na razvoj BEN u ženskoj populaciji. Naime, pacijentice koje su nosioci *GPX3* i *MDR1* varijantnih genotipova (*GPX3*\**T/C*\**C/C* genotip i *MDR1*\**C/T*\**T/T* genotip) bile su pod više od 3 puta većim rizikom od razvoja BEN (OR1 = 3,34, 95%IP = 1,16-9,60, p = 0,025), što je potvrđeno u prilagođenom modelu (OR2 = 3,79, 95%IP = 1,27-11,24, p = 0,016 ) (Tabela 7). Dakle, varijacije u genima koji kodiraju antioksidantne i transportne proteine u kombinaciji povećavaju šansu za BEN. Prisustvo varijantnih *GPX3*\**T* i *MDR1*\**C* alela u populaciji žena povećava više od 3 puta šansu za BEN (OR1), a ovaj efekat se dodatno pojačava nakon prilagođavanja (OR2) što je prezentovano na Slici 23.

Zanimljivo je da nismo uočili statistički značajnu povezanost ove kombinacije sa rizikom od razvoja BEN kod muškaraca (Tabela 8).

Ostale analizirane kombinacije, kao ni u prethodnoj analizi (Tabela 6), nisu pokazala značajnost (p>0,05). Ni u jednoj polno specifičnoj grupi logistička regresija nije pokazala rizik kada se gen za Nrf2 transkripcioni faktor kombinuje sa genom za regulatorni protein KEAP1, ili sa drugim genima (*GSTP1AB*, *GSTP1CD* i *MDR1*) čiju ekspresiju reguliše (Tabela, 7, Tabela 8).



**Tabela 7. Kombinovani polimorfizam KEAP1, Nrf2, GSTP1AB, GSTP1CD, GPX3 i MDR1 gena i rizik za nastanak BEN kod žena**

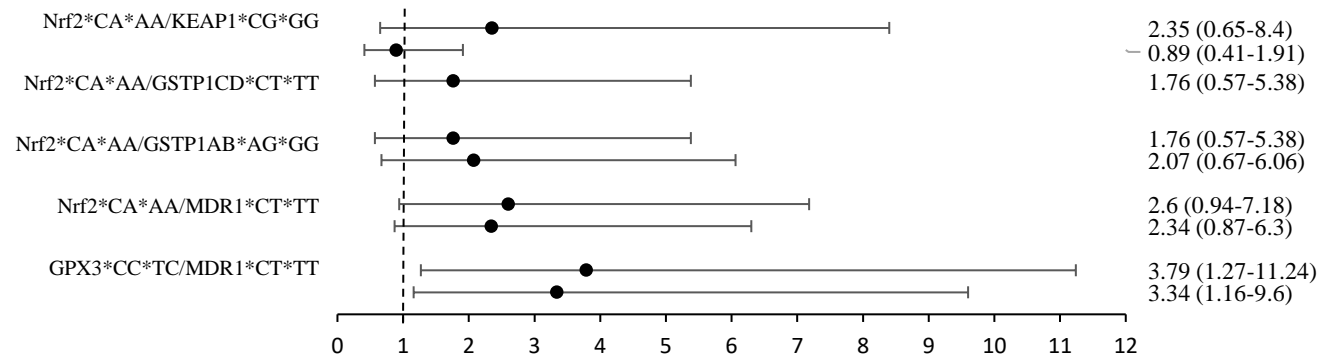
Genotip	BEN, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>
<b>GPX3 rs8177412+</b>						
<b>MDR1 rs1045642</b>						
GPX3* <i>TT</i> /MDR1* <i>CC</i>	13 (14)	17 (24)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
GPX3* <i>TT</i> /MDR1* <i>CT*TT</i>	51 (57)	43 (60)	1.55 (0.67-3.55)	0.299	1.85 (0.78-4.40)	0.163
GPX3* <i>CC*TC</i> /MDR1* <i>CC</i>	3 (3)	2 (3)	1.96 (0.28-13.50)	0.494	2.11 (0.30-14.74)	0.451
GPX3* <i>CC*TC</i> /MDR1* <i>CT*TT</i>	23 (26)	9 (13)	3.34 (1.16-9.60)	0.025*	3.79 (1.27-11.24)	0.016*
<b>Nrf2 rs6721961+</b>						
<b>KEAP1 rs1048290</b>						
Nrf2* <i>CC</i> /KEAP1* <i>CC</i>	6 (7)	9 (13)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
Nrf2* <i>CC</i> /KEAP1* <i>CG*GG</i>	61 (66)	48 (68)	1.80 (0.48-6.62)	0.379	1.87 (0.61-5.71)	0.269
Nrf2* <i>CA*AA</i> /KEAP1* <i>CC</i>	5 (5)	2 (2)	1.12 (0.58-2.18)	0.725	3.65 (0.51-25.73)	0.194
Nrf2* <i>CA*AA</i> /KEAP1* <i>CG*GG</i>	20(22)	12 (17)	0.89 (0.41-1.91)	0.774	2.35 (0.65-8.40)	0.187
<b>Nrf2 rs6721961+</b>						
<b>MDR1 rs1045642</b>						
Nrf2* <i>CC</i> /MDR1* <i>CC</i>	13 (15)	18 (25)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
Nrf2* <i>CC</i> /MDR1* <i>CT*TT</i>	52 (57)	39 (55)	1.84 (0.80-4.21)	0.145	2.19 (0.92-5.18)	0.074
Nrf2* <i>CA*AA</i> /MDR1* <i>CC</i>	3 (3)	1 (1)	4.15 (0.38-44.50)	0.240	4.07 (0.36-44.97)	0.252
Nrf2* <i>CA*AA</i> /MDR1* <i>CT*TT</i>	22 (25)	13 (19)	2.34 (0.87-6.30)	0.092	2.60 (0.94-7.18)	0.065
<b>Nrf2 rs6721961+</b>						
<b>GSTP1AB rs1695</b>						
Nrf2* <i>CC</i> /GSTP1AB* <i>AA</i>	29 (32)	27 (38)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
Nrf2* <i>CC</i> /GSTP1AB* <i>AG*GG</i>	38 (41)	30 (42)	1.17 (0.58-2.39)	0.649	1.05 (0.50-2.18)	0.886
Nrf2* <i>CA*AA</i> /GSTP1AB* <i>AA</i>	12 (13)	8 (11)	1.39 (0.49-3.93)	0.528	1.30 (0.45-3.73)	0.620
Nrf2* <i>CA*AA</i> /GSTP1AB* <i>AG*GG</i>	13 (14)	6 (9)	2.07 (0.67-6.06)	0.211	1.76 (0.57-5.38)	0.319

**Tabela 7, nastavak.** Kombinovani polimorfizam *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* gena i rizik za nastanak BEN kod žena

Genotip	BEN, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> rs6721961+ <i>GSTP1CD</i> rs1138272</b>						
<i>Nrf2</i> * <i>CC</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CC</i>	63 (69)	53 (75)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
<i>Nrf2</i> * <i>CC</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CT</i> * <i>TT</i>	4 (4)	4 (6)	1.05 (0.50-2.18)	0.886	0.70 (0.16-3.09)	0.648
<i>Nrf2</i> * <i>CA</i> * <i>AA</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CC</i>	22 (24)	13 (18)	1.30 (0.45-3.73)	0.620	1.33 (0.60-2.92)	0.477
<i>Nrf2</i> * <i>CA</i> * <i>AA</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CT</i> * <i>TT</i>	3 (3)	1 (1)	1.76 (0.57-5.38)	0.319	2.75 (0.27-27.82)	0.389

OR1-odnos šansi; OR2- prilagođen prema starosti; 95%IP – 95 interval povjerenja; *p* < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup>-Referentna grupa

**Analizirani genotip**



**Slika 23.** Kombinovani polimorfizam *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* gena i rizik za nastanak BEN kod žena, forest plot za OR1 i OR2, sa pripadajućim 95% intervalima povjerenja

**Tabela 8.** Kombinovani polimorfizam *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* gena i rizik za nastanak BEN kod muškaraca

Genotip	BEN, n (%)	Kontrole, n (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>
<b><i>GPX3</i> rs8177412+</b>						
<b><i>MDR1</i> rs1045642</b>						
<i>GPX3*TT/MDR1*CC</i>	20 (18)	14 (20)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
<i>GPX3*TT/MDR1*CT*TT</i>	69(61)	38 (55)	1.27 (0.57-2.79)	0.552	1.27 (0.57-2.81)	0.547
<i>GPX3*CC*TC/MDR1*CC</i>	3 (3)	3 (4)	0.70 (0.12-3.98)	0.688	0.70 (0.12-4.05)	0.699
<i>GPX3*CC*TC/MDR1*CT*TT</i>	20 (18)	14 (21)	1.00 (0.38-2.67)	1.000	1.02 (0.38-2.691)	0.996
<b><i>Nrf2</i> rs6721961+</b>						
<b><i>KEAP1</i> rs1048290</b>						
<i>Nrf2*CC/KEAP1*CC</i>	19 (16)	9 (13)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
<i>Nrf2*CC/KEAP1*CG*GG</i>	72 (62)	37 (54)	0.85 (0.38-2.23)	0.857	0.92 (0.38-2.24)	0.861
<i>Nrf2*CA*AA/KEAP1*CC</i>	5 (4)	2 (3)	1.18 (0.19-7.32)	0.856	1.20 (0.19-7.45)	0.842
<i>Nrf2*CA*AA/KEAP1*CG*GG</i>	21(18)	21 (30)	0.47 (0.17-1.28)	0.142	0.47 (0.17-1.30)	0.148
<b><i>Nrf2</i> rs6721961+</b>						
<b><i>MDR1</i> rs1045642</b>						
<i>Nrf2*CC/MDR1*CC</i>	18 (16)	10 (15)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
<i>Nrf2*CC/MDR1*CT*TT</i>	69 (62)	36 (52)	1.06 (0.44-2.54)	0.888	1.07 (0.44-2.57)	0.872
<i>Nrf2*CA*AA/MDR1*CC</i>	5 (4)	7 (10)	0.39 (0.09-1.58)	0.190	0.40 (0.10-1.61)	0.199
<i>Nrf2*CA*AA/MDR1*CT*TT</i>	20 (18)	16 (23)	0.69 (0.25-1.91)	0.481	0.70 (0.25-1.95)	0.501
<b><i>Nrf2</i> rs6721961+</b>						
<b><i>GSTP1AB</i> rs1695</b>						
<i>Nrf2*CC/GSTP1AB*AA</i>	41 (35)	16 (23)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
<i>Nrf2*CC/GSTP1AB*AG*GG</i>	50 (43)	30 (43)	0.65 (0.32-1.35)	0.251	0.65 (0.31-1.37)	0.264
<i>Nrf2*CA*AA/GSTP1AB*AA</i>	14 (12)	13 (19)	0.42 (0.16-1.08)	0.074	0.42 (0.16-1.10)	0.079
<i>Nrf2*CA*AA/GSTP1AB*AG*GG</i>	12 (10)	10 (15)	0.46 (0.16-1.29)	0.144	0.47 (0.17-1.32)	0.155

**Tabela 8, nastavak.** Kombinovani polimorfizam *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* gena i rizik za nastanak BEN kod muškaraca

Genotip	BEN, <i>n</i> (%)	Kontrole, <i>n</i> (%)	OR 1 (95% IP) <sup>b</sup>	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>
<b><i>Nrf2</i> rs6721961+ <i>GSTP1CD</i> rs1138272</b>						
<i>Nrf2</i> * <i>CC</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CC</i>	78 (67)	42 (61)	1.0 <sup>c</sup>	-	1.0 <sup>c</sup>	-
<i>Nrf2</i> * <i>CC</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CT</i> * <i>TT</i>	13 (11)	4 (6)	1.75 (0.53-5.75)	0.353	1.78 (0.54-5.82)	0.339
<i>Nrf2</i> * <i>CA</i> * <i>AA</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CC</i>	24 (21)	21 (30)	0.61 (0.30-1.23)	0.171	0.62 (0.31-1.25)	0.184
<i>Nrf2</i> * <i>CA</i> * <i>AA</i> / <i>GSTP1CD</i> * <i>CT</i> * <i>TT</i>	2 (1)	2 (3)	0.53 (0.07-3.96)	0.543	0.54 (0.07-4.03)	0.553

OR1-odnos šansi; OR2- prilagođen prema starosti; 95%IP – 95 interval povjerenja; *p* < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup>-Referentna grupa

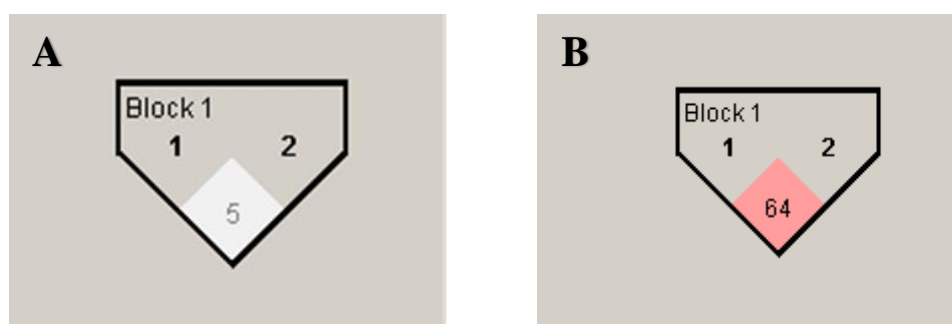
#### 4.6 ANALIZA POVEZANOSTI HAPLOTIPA GENA ZA GSTP1 SA RIZIKOM ZA NASTANAK BEN

Uzevši u obzir da se polimorfizmi *GSTPIAB* i *GSTP1CD* nalaze na istom hromozomu, naredni korak istraživanja je bio usmjeren na analizu efekata polimorfizama *GSTP1* rs1695 i rs1138272 na rizik za nastanak BEN, koji je urađen analizom haplotipa i predstavljen u *Tabeli 9*. Procijenili smo neravnotežu veze (*engl. Linkage disequilibrium; LD*) i izrazili je kao normalizovan koeficijent između *GSTP1* polimorfizama. Pored toga, odredili smo  $D'$  vrijednosti koja može da se kreće od 0 do 1,0. S tim u vezi vrijednost 1,0 ukazuje da su dva polimorfizma maksimalno povezana, dok 0 označava da su nasumično povezani [214]. Kao što se može vidjeti iz prikazanih rezultata, pronašli smo da je vrijednost  $D'= 0,647$  između *GSTPIAB* rs1695 i *GSTP1CD* rs1138272, što potvrđujući visoku LD između ovih SNP-ova (*Slika 24*).

**Tabela 9.** Efekti *GSTP1* rs1695 i rs1138272 polimorfizama

L1	L2	D'	LOD	r <sup>2</sup>	95% IP
<i>GSTPIAB</i> rs1695	<i>GSTP1CD</i> rs1138272	0.647	4.63	0.051	0.41-0.80

$D'$ - vrijednost D između dva lokusa; LOD- odnos vjerovatnoće, mjera povjerenja u  $D'$ ;  $r^2$ - koeficijent korelacije između dva lokusa; 95% IP- 95% interval povjerenja;



**Slika 24.** LD:  $D'/LOD$  odnos (A);  $r^2$ — koeficijent korelacije između dva lokusa (B) za *GSTPIAB* (rs4925) i *GSTP1CD* (rs1138272) polimorfizme

$D'$ - vrijednost D između dva lokusa; LOD- odnos vjerovatnoće, mjera povjerenja u  $D'$ ;  $r^2$ - koeficijent korelacije između dva lokusa; 95% IP- 95% interval povjerenja.

Zatim smo procjenjivali frekvenciju haplotipova *GSTPIABCD* u grupi oboljelih, i kontrolnoj grupi. Kao što je prikazano u *Tabeli 10*, najzastupljeniji haplotip među pacijentima sa BEN (68%) i kontrolama (70%) je GSTP1A, koji se sastoji od \*A i \*C referentnih alela.

Haplotip GSTP1\*C koji se sastoji od *varijantnih* alela (\*G i \*T) oba polimorfizma imao je najnižu učestalost i kod pacijenata, ali i kod kontrolne grupe. Što se tiče uticaja haplotipova *GSTPIABCD* na podložnost za nastanak BEN, haplotip koji se sastoji od *varijantnih* alela \*G i \*T bio je povezan sa 1,6 puta višim rizikom, iako se rezultat nije pokazao statistički značajnim (OR = 1,64; 95%IP = 0,75–3,58; p = 0,210).

**Tabela 10.** Distribucija i procjena uticaja haplotipa *GSTP1* rs1695 i rs1138272 na rizik za nastanak BEN

	Genotip		Frekvencija haloptipa		OR (95% IP) <sup>a</sup>	p
	rs1695	rs1138272	BEN, %	Kontrole, %		
<i>GSTPIA</i> <sup>d</sup>	*A	*C	68	70	1.00 <sup>c</sup>	
<i>GSTPIB</i> <sup>e</sup>	*G	*C	26	27	1.01 (0.70–1.45)	0.970
<i>GSTPIC</i> <sup>f</sup>	*G	*T	5	3	1.64 (0.75–3.58)	0.210
<i>GSTPID</i> <sup>g</sup>	*A	*T	1	0	// <sup>b</sup>	//

<sup>a</sup>OR: odnos šansi, prilagođen prema polu i starosti; 95% IP- 95% interval povjerenja;

<sup>c</sup> referentna grupa; <sup>b</sup>//- ne može se primijeniti; d-GSTPIA genotip koji se sastoji od Ile105 i Ala114; e-GSTPIB genotip koji čine Val105 i Ala114; f-GSTPIC genotip koji čine Val105 i Val114; g-GSTPID genotip sadržan od Ile105 i Val114;

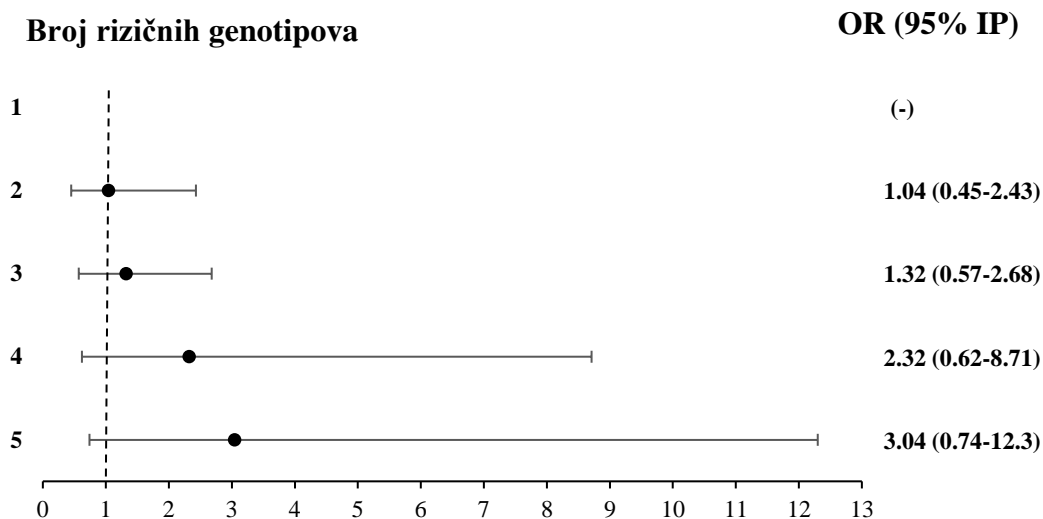
#### 4.7 KUMULATIVNI EFEKAT POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTIOKSIDANTNE PROTEINE NA RIZIK ZA NASTANAK BEN

U sljedećem koraku ovog istraživanja analiziran je kumulativni efekat ovih rizičnih genotipova na podložnost za nastanak BEN. Naime, ispitali smo da li je kumulativni broj rizičnih genotipova povezan sa razvojem BEN (*Tabela 11*). Prema identifikovanim genotipovima povezanim sa modifikacionom ulogom u smislu BEN rizika (*Tabela 3*), sabrali smo ih i uočili da kumulativni efekat kombinacije polimorfizama koji kodiraju gene za regulatorne i katalitičke antioksidativne proteine doprinosi sukcesivnom povećanju rizika od endemske nefropatije sa rastom kumulativnog odnosa šansi, iako nije postignuta statistički značajna razlika rasta. Pokazano je da su nosioci samo jednog genotipa, za koji je prethodnom analizom pokazano da je udružen sa povećanim rizikom za nastanak BEN, manje podložni obolijevanju od nefropatije (OR=1.65, 95%IP: 0.46-5.82, p=0.436) u odnosu na nosioce bilo koja dva, odnosno tri, četiri ili pet rizičnih genotipova. Dodatno je dat i grafički prikaz rezultata u vidu *forest plot* grafikona (*Slika 25*).

**Tabela 11.** Kumulativni efekat ispitivanih genotipova na rizika za nastanak BEN

Genotip	BEN, n(%)	Kontrole, n(%)	OR1 <sup>a</sup> (95% IP) <sup>b</sup>	p
1 <sup>c</sup>	20 (10)	16 (11)	1.00 <sup>c</sup>	
2	65 (32)	45 (32)	1.32 (0.57-2.68)	0.591
3	71 (35)	48 (34)	1.04 (0.45-2.43)	0.916
4	33 (16)	26 (18)	2.32 (0.62-8.71)	0.210
5	12 (6)	4 (3)	3.04 (0.74-12.3)	0.120

OR- odnos šansi; <sup>b</sup> 95%CI: 95% interval povjerenja; p < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup> referentna grupa. 1,2,3,4,5: Broj rizičnih genotipova. Nije bilo slučajeva ili kontrola koje nose svih šest referentnih genotipova (*KEAP1\*CC, Nrf2\*CC, GSTPAB\*AA, GSTPCD\*CC, GPX3\*TT, MDR1\*CC*) ili svih šest rizičnih genotipova (*KEAP1\*GG, Nrf2\*AA, GSTPAB\*GG, GSTPCD\*TT, GPX3\*CC, MDR1\*TT*);



**Slika 25.** Kumulativni efekat ispitivanih genotipova na rizika za nastanak BEN, forest plot sa pripadajućim 95% intervalima povjerenja opisuje sukcesivni rast šansi za nastanak BEN-a u slučaju povećanja broja rizičnih genotipova (1,2,3,4,5);

#### 4.8 UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZA REGULATORNE I KATALITIČKE ANTI-OKSIDANTNE PROTEINA NA POJAVU TUMORA GORNJEG UROTELIJUMA U BALKANSKOJ ENDEMSKOJ NEFROPATIJI

U svjetlu činjenice da je incidencija tumora gornjeg urinarnog trakta kod pacijenata sa BEN mnogo veća nego u opštoj populaciji, da bi procijenili uticaj polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine na pojavu tumora urotelijuma na terenu BEN, sprovedena je studija slučajeva. Naime, ispitanici studijske grupe su razvrstani na osnovu prisustva tumora mokraćnih puteva na bolesnike sa i bez tumora urotelijuma (*Tabela 12*).

**Tabela 12.** Demografske i kliničke karakteristike BEN pacijenata sa i bez tumora gornjeg urotelijuma

Demografske karakteristike	BEN sa tumorom, n=32	BEN bez tumora, n=140	<i>p</i>
Pol			
Muški n(%)	17 (52)	100 (51)	0.546
Ženski n(%)	15 (48)	77 (49)	
Starost (srednja vrijednost ± SD )*	74.23±4.55	69.39±6.98	0.001*
Trajanje bolesti od dijagnoze do uključivanja u studiju (srednja vrijednost ± SD )*	22.3±14.54	11.3±9.04	0.001*
Trajanje bolesti od dijagnoze do početka liječenja hemodijalizom (srednja vrijednost ± SD )*	6.1±8.36	14.5±13.56	0.001*
Trajanje liječenja hemodijalizom (srednja vrijednost ± SD )*	7.4±7.78	5.1±4.01	0.145

n-broj učesnika, \*standarnda devijacija ± SD; BMI-indeks tjelesne težine; \*\*zasnovano na dostupnim podacima

U našoj studiji, 32 BEN pacijenta (15%) razvili su tumor gornjeg urotelijuma. Iz demografskih podataka prikazanih u Tabeli 12, može se uočiti da u studijskoj grupi nije bilo razlike u pogledu polne distribucije ( $p > 0,05$ ). Iako je liječenje hemodijalizom trajalo duže kod bolesnika sa tumorima urotelijuma nego u grupi oboljelih bez tumora (7,4 godina vs. 5,1 godina), razlika nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Ipak, pacijenti sa BEN koji su razvili i tumor, bili su znatno stariji od BEN pacijenata bez tumora ( 74,23 godina vs. 69,39 godina,  $p < 0,001$ ), njihova bolest je duže trajala (22,3 godine vs. 11,3 godina;  $p < 0,001$ ), a vremenski



period od postavljanja dijagnoze do početka liječenja hemodijalizama je bio značajno kraći (6,1 vs. 14, 5;  $p < 0,001$ ).

Vodeći se većom učestalosti ovih tumora u populaciji BEN-a, dodatno smo analizirali efekte polimorfizama gena *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTPIAB*, *GSTP1CD*, i *GPX3* u smislu procjene rizika za razvoj tumora urotelijuma kod takve populacije. Distribucije polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine kod BEN pacijenata sa urotelnim tumorima sumirane su u *Tabeli 13*. Povezanost pojedinačnih polimorfizama sa rizikom za nastanak tumora urotelijuma analizirana je kroz dva modela: neprilagođeni OR1 i OR2, prilagođen prema starosti i polu. U našoj studiji utvrđeno je da su u oba modela nosioci *GPX3\*T/C\*C/C* genotipa imali 8 puta veći rizik za nastanak tumora urotelijuma u odnosu na nosioce *GPX3\*T/T* genotipa (OR = 8,16, 95%IP = 3,60–18,40,  $p = 0,001$ ), što je takođe potvrđeno nakon prilagođavanja (OR = 8,48, 95%IP = 3,60–19,30,  $p = 0,001$ ). U distribuciji ostalih analiziranih genotipova nije bilo statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ). Ipak BEN pacijenti nosioci *GSTP1CD* genotipa koji se sastoji od najmanje jednog *varijantnog GSTP1CD\*T* alela (*GSTPCD\*C/T\*T/T*), u slučaju rs1138272 polimorfizma, su bili podložniji razvoju urotelnog karcinoma u poređenju sa nosiocima *GSTP1CD\*C/C* genotipa (OR1 = 1,71, 95% IP = 0,59-5,11),  $p = 0,312$ ; OR2 = 1,84, 95%IP = 0,61-5-53,  $p = 0,275$ ). Iz rezultata koji se odnose na distribuciju frekvencije *KEAP1* rs1048290 genotipova, može se uočiti da je u grupi bolesnika bez tumora 82% bolesnika sa *KEAP1\*C/G* ili *G/G* genotipom. U grupi bolesnika sa tumorom, učestalost *KEAP1\*C/G\*G/G* genotipova je veća nego u grupi bolesnika bez tumora (88%), iako prisutna, razlika u distribuciji frekvencija *KEAP1* genotipa između ove dvije grupe bolesnika nije i statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Dodatno, osobe nosioci *KEAP1\*C/G\*G/G* genotipova nisu u većem riziku za nastanak tumora (OR1 = 1,48, 95% IP = 0,48-4,52;  $p = 0,487$ ; OR2 = 0,84, 95%IP = 0,34-2,02,  $p = 0,718$ ). Iz prikazanih rezultata frekvencije *Nrf2* genotipa, može se primijetiti da u obje ispitivane grupe bolesnika više od polovine ispitanika ima bar jedan *referentni* alel *Nrf2\*C*. U grupi bolesnika sa tumorima urotelijuma, učestalost *Nrf2\*C/A\*A/A* genotipova je nešto manja nego u grupi bolesnika bez tumora (25% vs. 22%), ali bez statističke značajnosti ( $p = 0,693$ ). Posmatrajući distribuciju *GSTPIAB* genotipa, može se uočiti da su 47% bolesnika bez tumora urotelijuma nosioci *GSTPIAB\*A/A referentnog* genotipa. Zastupljenost *GSTP1\*A/G\*G/G* genotipa u bolesnika sa tumorom je veća nego u grupi bolesnika bez tumora urotelijuma (62% vs 53%), ipak ta razlika nije i statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Dodatno, BEN nosioci *GSTP1\*A/G\*G/G* nisu u većem riziku za razvoj tumora (OR1 = 1.30, 95% IP = 0.69-3.26,  $p = 0,500$ ; OR2 = 1,41, 95%IP = 0,64-3,10,  $p = 0,382$ ).

**Tabela 13.** Povezanost polimorfizama gena za regulatorne i katalitičke antioksidantne proteine (*KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1*) sa rizikom za nastanak tumora gornjeg urotelijuma (kod pacijenata sa BEN)

Genotip	BEN sa tumorom <i>n</i> (%)	BEN bez tm. <i>n</i> (%)	OR 1 (95% IP)	<i>p</i>	OR 2 (95% IP)	<i>p</i>
<b><i>KEAP1</i> 1048290</b>						
*C/C <sup>C</sup>	4 (12)	31 (18)	1.0	-	1.0	-
*C/G*G/G	28 (88)	146 (82)	1.48 (0.48-4.52)	0.487	0.84 (0.34-2.02)	0.718
<b><i>Nrf2</i> rs6721961</b>						
*C/C <sup>C</sup>	25 (78)	133 (75)	1.0	-	1.0	-
*C/A*A/A	7 (22)	44 (25)	0.84 (0.34-2.09)	0.718	0.83 (0.33-2.07)	0.693
<b><i>GSTPAB</i> rs1695</b>						
*A/A <sup>C</sup>	12 (38)	84 (47)	1.0	-	1.0	-
*A/G*G/G	20 (62)	93 (53)	1.30 (0.69-3.26)	0.500	1.41 (0.64-3.10)	0.382
<b><i>GSTP1CD</i> rs1138272</b>						
*C/C <sup>C</sup>	27 (84)	160 (90)	1.0	-	1.0	-
*C/T*T/T	5 (16)	17 (10)	1.71 (0.59-5.11)	0.312	1.84 (0.61-5.53)	0.275
<b><i>GPX3</i> rs8177412</b>						
*T/T <sup>C</sup>	12 (38)	147 (83)	1.0	-	1.0	-
*T/C*C/C	20 (62)	30 (17)	8.16 (3.6-18.40)	0.001*	8.48 (3.60-19.30)	0.001*

OR1-odnos šansi; OR2- prilagođen prema starosti i polu; 95%IP - 95% interval povjerenja; *p* < 0.05 statistički značajan rezultat; <sup>c</sup>-referentna grupa

## 5. DISKUSIJA

Ova doktorska disertacija predstavlja sveobuhvatnu analizu značaja polimorfizama regulatornih i antioksidantnih gena (*Nrf2*, *KEAP1*, *GSTP1AB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1*) u nastanku Balkanske endemske nefropatije, i udruženih tumora gornjeg urotelijuma.

Upravo se poslednjih nekoliko godina mnogo pažnje posvećuje istraživanjima polimorfizama gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam aristolohijske kiseline i antioksidantnu zaštitu [30,33,34,36,38]. Uzimajući u obzir teoriju o molekularnoj etiopatologiji BEN koja uključuje genetsku predispoziciju pojedinaca, procjena međuindividualnih varijacija u enzimima uključenim u aktivaciju i detoksikaciju AA i zaštitu od ROS, uključujući njihove genetske polimorfizme, ostaje jedan od izazova za dešifrovanje individualne osjetljivosti na BEN i njegove snažne veze s urotelnim karcinomom. Poznato je da antioksidantni enzimi, enzimi koji učestvuju u metabolizmu ksenobiotika, kao i regulatorni antioksidantni proteini igraju jednu od ključnih uloga u zaštiti od ROS, aktivaciji mutagena i karcinogena iz okruženja. I pored toga što rezultati eksperimentalnih istraživanja idu u prilog važne uloge oksidativnog stresa u patogenezi BEN i tumora kanalnog sistema na terenu BEN, ovaj značajan patofiziološki mehanizam nije dovoljno ispitan kod ovih pacijenata [118,119].

Prema tome, cilj ovog istraživanja je bio da se ispita da li prisustvo genetskih varijanti regulatornih, ali i katalitičkih antioksidantnih proteina poput polimorfizama *Nrf2*, *KEAP1*, *GSTP1*, *GPX3* i *MDR1* gena koji funkcionalno za posljedicu imaju izmijenjenu enzimsku aktivnost, doprinosi individualnoj osjetljivosti za nastanak BEN i tumora gornjeg urotrakta.

U ovom istraživanju analizirano je postojanje povezanosti BEN, kao i tumora gornjeg urinarnog trakta kod pacijenata sa BEN sa nekim od šest polimorfizama, i to rs6721961 (C-617A) u promotorskom ARE regionu *Nrf2* gena, rs1048290 u genomskom regionu *KEAP1* gena koji karakteriše C<G supstitucija, dva polimorfizma unutar *GSTP1* gena, i to *GSTP1* rs1695 (tranzicija Ile105Val) i *GSTP1* rs1138271 (Ala114Val), rs817741 (-T65C) u promotorskom regionu *GPX3* gena i rs1045642 (C3435T) polimorfizma u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein. Osim toga, izvršena je i analiza haplotipa *GSTP1ABCD*, kao i kumulativni efekat ovih polimorfizama na rizik za nastanak BEN. Rezultati naše studije su pokazali da među analiziranim polimorfizmima, nije bilo pojedinačno statistički značajnog uticaja na podložnost za razvoj BEN. Kada se posmatra kombinovani efekat, rezultati su pokazali da pacijentice koje su nosioci varijantnih oblika *GPX3* rs8177412 i *MDR1* rs1045642 gena u kombinaciji pokazuju značajan rizik od BEN-a. Dodatno, analiza haplotipa, iako nije dostigla statističku značajnost, pokazala je da je haplotip koji se sastoji od oba *varijantna* alela

bio povezan sa 1,6 puta većim rizikom za nastanak ove bolesti. Prilikom procjene kumulativnog efekta posmatrajući pet različitih genotipova povezanih sa rizikom, uočen je uzlazni trend rizika za BEN. Sljedeći korak u našoj analizi uključivao je ispitivanje povezanosti ovih polimorfizama sa rizikom od urotelnog karcinoma na terenu BEN. U ovom radu je po prvi put pokazano da je varijantni *GPX3*\*T/C+C/C genotip povezan sa rizikom od karcinoma gornjeg urotelijuma. Naime, naši rezultati su pokazali da osobe nosioci varijantnog *GPX3*\*T/C+C/C genotipa, koje karakteriše smanjena ekspresija *GPX3*, pokazuju čak 8 puta veći rizik za nastanak tumora gornjeg urinarnog trakta.

Balkanska endemska nefropatija je porodično oboljenje bubrega, oblik tubulointersticijskog nefitisa, od koga obolijeva seosko stanovništvo ograničenih regiona Jugoistočne Evrope. Prvi put su je, krajem pedesetih godina 20. vijeka, opisali *Tanchev* i saradnici u Bugarskoj i *Danilović* i saradnici u Srbiji [1,2]. To je podstaklo intenzivna istraživanja BEN u svim njenim žarištima, a najveći broj tih istraživanja je sproveden sedamdesetih i osamdesetih godina prošog vijeka [12,21,25,26]. Danas se interesovanje za ovu bolest ponovo budi, pored starih dilema i neriješenih pitanja, pojavila su se i nova pitanja koja čekaju odgovor. Razvoj savremenih metoda pružio je mogućnost da se istraživanjima ove bolesti pristupi na potpuno novi način, nedostupan ranijim istraživačima.

Uslijed višedecenijskog traganja za uzrokom, etiologiji BEN posvećena su brojna istraživanja [3,4,8,17,72]. Nedugo nakon prvih saznanja o endemskoj nefropatiji prije otprilike pola vijeka, započela je i potraga za razlogom nastanka ove bolesti. Još su prva istraživanja o BEN istakla da je to porodična bolest koja se javlja samo u endemskim žarištima, što je potvrđeno i mnogim narednim terenskim i kliničkim istraživanjima. Shodno tome, danas se smatra da u nastanku ove bolesti učestvuju genetski činioci, zajedno sa činiocima spoljašnje sredine [25]. Nakon dugogodišnjih istraživanja i brojnih predloženih hipoteza o etiologiji ove bolesti, današnja saznanja jasno idu u prilog činjenice da je aristolohijska kiselina, široko rasprostranjeni prirodni ekstrakt biljaka iz roda *Aristolochiaceae* glavni “krivac” za nastanak BEN [5,17,72]. Studije provedene na području Balkana zabilježile su da je *Aristolochiaceae clematis*, poznatija kao Vučja šapa, široko rasprostranjena u zemljištu endemskih područja, te da je pronađena u kukuruzu i zrnu pšenice iz endemskih sela [5,74]. Pretpostavlja se da je jedan od glavnih puteva intoksikacije AA ingestija hrane pripremljene od kontaminiranih usjeva [72,215].

Kao što je prethodno opisano, u toku metaboličke biotransformacije AA, *in vivo* i *in vitro* studije su pokazale prekomjerne nivoe oksidativnog stresa uz stvaranje velikih količina ROS [39,80,87–91]. Pored pojačane produkcije slobodnih radikala, u uslovima *in vitro* je pokazano

da AA dovodi i do smanjenja antioksidativnog kapaciteta ćelija. Naime, *in vitro* studije na humanim renalnim tubularnim ćelijama (HK-2) su zabilježile povećane nivoe ROS i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, smanjene nivoe glutaciona uz smanjenu aktivnost antioksidantnih enzima, što sugerira da bi oksidativni stres mogao bi da bude primarni pokretač AA-citotoksičnosti [174,216]. Slični rezultati dobijeni *in vivo*, na animalnim modelima AAN, potvrdili su da AA, osim što pogoršava oksidativni stres, smanjuje intrarenalni antioksidativni kapacitet, i dovodi do mitohondrijalne disfunkcije [83,85,217]. Šta više, ove nalaze potkrijepljuje i nekoliko studija koje su naglasile da je tretman ćelija antioksidansima pokazao citoprotektivne efekte, ublažavanje AA-indukovane proizvodnje ROS i genotoksičnosti [93,114,116]. Na suprot tome, novije studije sugeriraju da su značajni nivoi oksidativnog stresa, zajedno sa evidentnim oštećenjima epitelnih ćelija proksimalnih tubula bili evidentni kod miševa nakon ekspozicije ovoj nefrotoksičnoj kiselini [218,219]. Moguće da je upravo tubulotoksičnost zabilježena kod BEN posljedica izrazito smanjenih kapaciteta antioksidantne odbrane, nastale vjerovatno izlaganjem stanovnika endemskih područja ovom toksinu. Dalje, ovakav poremećaj redoks homeostaze neminovno dovodi do oštećenja vitalnih bioloških makromolekula, među kojima i DNK. Ne treba zanemariti činjenicu da DNK može biti i direktno oštećena pod uticajem N-hidroksiaristolaktama I, proizvoda biotransformacije AA, koji potom formira genotoksične adukte što produbljuje teorije o udruženosti BEN sa visokom incidencijom tumora gornjeg urinarnog trakta [90,90,174,220]. Zapravo, zajednička molekularna veza između BEN i AA bila je otkrivanje ovih specifičnih adukta koji, osim što su biomarkeri prethodne izloženosti AA, dokazano učestvuju u nastanku urotelnog maligniteta [66,73]. U prilog hipotezi da je AA uzročnik BEN i tumora urotelijuma na terenu BEN idu i, poslednjih godina, priloženi dokazi o povezanosti ekspozicije AA i pojave BEN. Naime, adukti DNK sa AA i karakteristične A→T transverzije otkriveni su u uzorcima maligno izmijenjenog tkiva bubrega pacijenata sa BEN [70,73,221].

Mehanizmi koji u organizmu omogućavaju održavanje tanane ravnoteže između, sa jedne strane produkcije slobodnih radikala i njihove neutralizacije sa druge strane, označavaju pojam redoks homeostaze. Neravnoteža između proizvodnje ROS i antioksidativnog sistema odbrane predstavlja poremećaj redoks homeostaze [76,78]. S tim u vezi, u slučaju povećanog nivoa ROS i/ili elektofilnih jedinjenja u ćeliji, nekoliko odbrambenih mehanizama omogućava održavanje redoks homeostaze, a jedan od najznačajnijih je aktivacija specifično adaptivnog citoprotektivnog odgovora, uključujući signalni put posredovan Keap1/Nrf2 [102].

Nrf2/Keap1 signalni put jedan je od najvažnijih sistema redoks homeostaze u ćeliji, dok Nrf2 predstavlja jedan od najvažnijih regulatornih antioksidantnih proteina [101]. Poznato je

da u stanjima oksidativnog distresa, dolazi do specifičnih alosternih modifikacija u okviru konformacije Keap1 proteina pri čemu Nrf2 postaje rezistentan na proteozomalnu degradaciju. Nakon toga, on ulazi u jedro, vezuje se za ARE na molekuli DNK, te pri tome dolazi do pojačane transkripcije velikog broja enzima, uključujući antioksidantne enzime, kao i one koji katališu reakcije detoksikacije (98,103). Iako molekularni mehanizmi kojima AA dovodi do nastanka oksidativnog stresa nisu dovoljno jasni, pokazano je da bi nefrotoksičnost izazvana djelovanjem AA, između ostalog, mogla biti posljedica promjene nivoa regulatornih proteina uključenih u antioksidativnu zaštitu, kao što su Nrf2 i Keap1 protein [112]. Naime, AA povećava nivo ekspresije Keap1 i smanjuje bazalnu ekspresiju Nrf2 proteina što dovodi do izmijenjene ekspresije širokog spektra zaštitnih, antioksidantnih i proteina uključenih u sistem detoksikacije [93,114,222]. To bi mogao biti i jedan od uzroka smanjenog kapaciteta detoksikacije i antioksidativne zaštite tubularnih ćelija bubrega kod BEN. Svi ovi nalazi sugerišu da bi oksidativni stres nastao kao rezultat izloženosti AA, kao i individualna osetljivost pojedinca na AA, mogli biti dijelovi slagalice koji nedostaju kompleksnoj BEN etiologiji.

Imajući u vidu uvjerljive podatke o funkcionalnoj relevantnosti polimorfizma *Nrf2* -617C/A (rs672196) na druge bolesti uzrokovane oksidativnim stresom, u ovom istraživanju ispitivan je značaj polimorfizma *Nrf2* -617C/A (rs672196) na rizik za nastanak BEN, kao i na rizik za nastanak tumora urotelijuma. Položaj ovog polimorfizma u sredini ARE utiče na njegovo vezivanje za ovu regulatornu sekvencu, stoga nosioci genotipa *Nrf2*\*A/A imaju smanjen nivo ekspresije mRNA za brojne antioksidantne enzime [120,121]. Iako dosadašnja istraživanja nisu dala jasnu sliku o ulozi ovog regulatornog proteina u endemskoj nefropatiji, kada su u pitanju bolesti bubrega, u nekoliko studija pokazana je veza između polimorfne ekspresije *Nrf2* u hroničnoj bubrežnoj slabosti, kao i kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom slabosti [119,223,224], glavnim i neminovnim komplikacijama BEN. Uprkos nedavnom napretku u rasvjetljavanju uloge *Nrf2* polimorfizama u nastanku i progresiji gore navedenih bolesti, ovaj polimorfizam nije ispitivan u populaciji pacijenata sa BEN, tako da je ovo prva studija koja se bavi uticajem *Nrf2* rs6721961 polimorfizma u ovoj populaciji. Iako istraživanja na životinjskim modelima svjedoče o ulozi Nrf2 signalizacije u zaštiti bubrega od oksidativnog oštećenja, rezultati naše studije nisu pokazali da je *Nrf2* rs6721961 polimorfizam udružen sa pogoršanjem oksidativnog distresa kod pacijenata sa BEN. U našoj studiji osobe nosioci najmanje jednog varijantnog \*C alela (*Nrf2*\*A/A+C/A genotip) povezanog sa nižom transkripcionom aktivnosti Nrf2, nisu imali veću šansu za razvoj BEN. U svjetlu činjenice prethodno izloženih dokaza o visokoj prevalenciji tumora gornjeg urinarnog trakta kod BEN, u ovom istraživanju su bili

uključeni i pacijenti oboljeli od BEN koji su razvili tumor. Kada su u pitanju ovi tumori, samo jedna studija je sprovedena sa ciljem da se istraži povezanost *Nrf2* rs6721961 polimorfizma sa rizikom i mortalitetom kod pacijenata sa tumorima donjeg urotelijuma, odnosno tumorom mokraćne bešike [124]. U toj studiji, *Reszka* i saradnici nisu utvrdili povezanost ovog SNP sa rizikom za nastanak tumora mokraćne bešike. Slično, ni rezultati naše studije nisu pokazali da ovaj polimorfizam doprinosi povećanom riziku za nastanak tumora urotela. Budući da je to jedini do sada objavljen podatak u vezi sa povezanosti polimorfizma *Nrf2* rs6721961 sa tumorima urotelijuma, ovo polje i dalje ostaje neistraženo.

Koliko je nama poznato, ovo je i prva studija koja je procijenila uticaj *KEAP1* rs1048290 polimorfizama na rizik od razvoja BEN i urotelnog karcinoma. *KEAP1* rs1048290 polimorfizam se nalazi u genomskom regionu (egzon 4) i kodira *DGR* domen koji je u direktnoj interakciji sa *Nrf2*. Funkcionalno, ovaj SNP negativno utiče na vezivanje *Nrf2* i *Keap1* proteina čime se remeti koordinisana regulacija ARE-kontrolisanih gena i onemogućava održavanje bazalnog nivoa citoprotektivnih enzima [127]. U literaturi u samo nekoliko studija ispitivan je ovaj polimorfizam, te je utvrđeno da se *varijantni KEAP1\*G* alel u vezi sa karcinomom dojke, hroničnim respiratornim bolestima i epilepsijom [128,129,132]. Prema našim saznanjima, do sada se ni jedna studija nije bavila funkcionalnim značajem ovog polimorfizma u bolestima bubrega. Na osnovu dostupnih podataka o potencijalnoj ulozi *KEAP1* polimorfizma u nastanku bolesti, u našem istraživanju smo pretpostavili da *varijantni \*G* alel *KEAP1* rs1048290 (c. 1413C>G) nosi rizik za BEN. Nasuprot našim očekivanjima, rezultati ove studije nisu pokazali povezanost polimorfne ekspresije *KEAP1* rs1048290 u razvoju BEN. Slični rezultati su dobijeni i u odnosu na tumore urinarnog trakta. Naime, nismo pronašli nezavisan uticaj *KEAP1* rs1048290 na rizik od tumora gornjeg urinarnog trakta kod BEN. Osim individualnog, posmatrali smo i kombinovani efekat ova dva polimorfizma na podložnost za BEN, pri čemu je pokazano da kombinacija ova dva polimorfizma povećava rizik za BEN. Osobe koji su nosioci *Nrf2\*C/C* i *KEAP1\*C/G* ili *G/G* genotipova su skoro 2 puta podložniji nastanku endemske nefropatije, u poređenju sa osobama koje imaju *Nrf2\*C/C+KEAP1\*C/C* referentni genotip, ali rezultat nije dostigao statističku značajnost. Ovi nalazi sugerišu da bi polimorfna ekspresija gena za proteine uključene u ovaj važan citoprotektivni signalni put, mogla barem djelimično biti odgovorna za smanjenje protektivnih kapaciteta ćelije, što bi svakako moglo da pogoduje nastanku endemske nefropatije i udruženih tumora.

U daljem toku našeg istraživanja ispitivan je i polimorfizam *GSTP1* gena, zbog najnovijih pretpostavki koje sugerišu da bi aristolaktam-nitrenium jon, nitro metabolit AA, mogao biti

detoksikovano sa glutationom u reakciji koju, najvjerojatnije, katalizuju enzimi faze II metabolizma među kojima je i GSTP1 [53]. Glutathion S transferaze su velika familija enzima koji katalizuju reakcije biotransformacije, odnosno konjugacije elektrofilnih metabolita endogenog ili egzogenog porijekla sa glutationom, čime se u većini slučajeva smanjuje njihova reaktivnost prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima [133].

Polimorfna ekspresija citosolnih glutathion transferaza bila je predmet velikog broja istraživanja koja su pokušala da rasvijetle njihovu ulogu u nastanku i progresiji mnogih malignih i nemalignih bolesti [135,149,154]. U, do sada, nekoliko studija ispitivan je uticaj polimorfizma *GSTP1* gena u populaciji sa BEN, ali postojala je potreba za studijom kojom bi ispitala povezanost polimorfizama unutar *GSTP1* gena kod BEN pacijenata u Republici Srpskoj. Prema tome, u ovom istraživanju ispitivan je značaj dva polimorfizma unutar *GSTP1* gena, *GSTPIAB* rs1695 i *GSTPICD* rs1138272 na rizik za nastanak BEN, kao i na rizik za nastanak tumora gornjeg urinarnog trakta. Dosadašnje studije koje su se bavile ulogom *GSTP1* gena u populaciji sa BEN, nisu pokazale značajne razlike u distribuciji učestalosti *GSTP1* genotipova, kao ni rizika za BEN. Prema studiji Reljić i saradnika, *GSTP1*\*G/G genotip nije bio udružen sa povećanim rizikom za BEN, ali doprinosi većem riziku za liječenje hemodijalizama [33]. Osim toga, slični rezultati su dobijeni i u studiji sprovedenoj u Bugarskoj u kojoj nije pokazana razlika u učestalosti *GSTP1* genotipova kod pacijenata s BEN-om, u poređenju sa kontrolnom grupom [30]. Naši rezultati su u saglasnosti sa pomenutim studijama, ispitivani *GSTP1* (rs1695) polimorfizam se nije pokazao kao značajan biomarker rizika za nastanak BEN i udruženih tumora. Premda rezultati našeg istraživanja pokazuju veću zastupljenost ispitanika sa manje aktivnim oblikom *GSTP1* gena (*GSTP1*\*G/G genotip) u populaciji sa BEN u poređenju sa kontrolnom grupom, ta razlika nije dostigla statističku značajnost. Zbog preovladavajućeg mišljenja da Balkanska endemska nefropatija i AAN predstavljaju jedan entitet, rezultate smo uporedili sa studijama koje su se bavile polimorfizmima gena u populaciji sa AAN [22]. Prema tome možemo zaključiti da su naši rezultati u saglasnosti sa studijom Chen i saradnika sprovedenoj u populaciji žute rase, u kojoj je pokazano da *GSTP1* rs1695 nije faktor rizika za nastanak AAN [158]. S druge strane, u nekoliko studija pokazano da polimorfizmi koji se javljaju unutar gena za *GSTP1* moduliraju rizik za nastanak terminalne bolesti bubrega i određenih tumora [147,161,225,226]. Naši rezultati su pokazali da efekat prisustva *GSTP1*\*G/G genotipa u odnosu na *GSTP1*\*A/A ne utiče na povećanje rizika za tumore urotelijuma, što je u skladu sa jedinom do danas sprovedenom studijom koja je procjenjivala polimorfnu ekspresiju *GSTPIAB* rs1695 i nije pronašla povezanost ovog polimorfizma sa BEN i rizikom od urotelnog karcinoma [33].



Veoma slični rezultati su dobijeni i prilikom procjene potencijalnog uticaja polimorfizma *GSTP1CD* rs1138272, koji karakteriše tranzicija alanina u valin na kodonu 114 i izmijenjena enzimaska aktivnost. Naši rezultati su pokazali da varijantni genotip *GSTP1CD*\*C/T\*T/T nije imao uticaja na razvoj BEN i urotelnog karcinoma. Ipak, nosioci \*T varijantnog alela su pokazali 1,5 puta veći rizik za nastanak BEN, što bi ipak moglo da ukaže na potencijalnu uključenost GSTP1 u metabolizam AA.

Pomoću svoje hidroperoksidazne aktivnosti GST štite ćelije od organskih hidroperoksida, čineći moćan antioksidantni štit, a visoko su eksprimirani u epitelnim ćelijama distalnih tubula i epitelu kanalnog sistema bubrega [133]. Obzirom da analize haplotipova objedinjuju međusobne uticaje svih potencijalnih polimorfizama unutar jednog gena, kao i regionalne varijacije koje doprinose efektu u pogledu nastanka bolesti, analize haplotipova mogu biti od velikog značaja u etiološki kompleksnim oboljenjima kao što su BEN. Tako smo u našoj studiji ispitivali haplotip *GSTPIABCD*, koji još uvijek nije proučavan u odnosu na osjetljivost na BEN i urotelne tumore povezane s BEN. Iako je analiza haplotipa *GSTPIABCD* otkrila veći rizik od BEN kod nosilaca oba varijantna alela, uočeni efekat nije dostigao statističku značajnost. Naime, haplotip koji se sastoji od varijantnih \*G i \*T alela bio je povezan sa 1,6 puta višim rizikom za BEN, iako se rezultat nije pokazao statistički značajnim (OR = 1,64; 95%IP = 0,75–3,58; p = 0,210). Vjerujemo da bi genotipizacija većeg broja ispitanika mogla potencijalno pružiti značajnu povezanost haplotipa sa povećanim rizikom za razvoj BEN.

Kako pored, pomenutih, katalitičkih, GSTP1 posjeduje i nekatalitičke uloge, GSTP1 je bio prvi protein za koji je otkriveno da inhibiše JNK kroz direktnu protein-proteinsku interakciju [143]. U uslovima *in vitro* pokazano je da izlaganje tubularnih epitelnih ćelija visokim dozama AA dovodi do aktivacije JNK. Kako GSTP1 utiče na inhibiciju apoptotske molekule JNK, može se pretpostaviti da polimorfna ekspresija *GSTP1* utiče na proces apoptoze [144]. Imajući u vidu da \*A (Ala) referentni alel predstavlja potentan inhibitor c-JNK, prema tome ima jači antiapoptotički efekat, možemo pretpostaviti da bi prisustvo varijantnog \*G alela (Val), u slučaju *GSTPIAB* rs1695, moglo da dovede do apoptoze. Možda bi to mogao biti jedan od mehanizama koji dovodi do oštećenja tubula i atrofije bubrega, zabilježene na patohistohistološkim nalazima BEN pacijenata [143,227]. U skladu sa tom pretpostavkom su i rezultati naše studije, učestalost varijantnog \*Val alela (*GSTP1*\*G alela) je bila veća u BEN nego u kontrolnoj grupi (9% vs. 6%), iako je statistička značajnost izostala.

Bubrežna ekskrecija je važan dio sistema detoksikacije ksenobiotika i uključuje niz različitih transporterskih mehanizama, a među njima i ATP-zavisni transporter P-glikoprotein [193]. Poznato je da polimorfizmi gena za transportere mogu doprinijeti inter-individualnim

varijacijama u odgovoru na različite ksenobiotike iz okruženja [208]. ATP-zavisni transporter P-gp je kodiran *MDR1* genom [207]. U ovom istraživanju ispitan je individualni uticaj polimorfizma *MDR1* rs105642 (C3435) koji je povezan sa smanjenom ekspresijom i aktivnosti P-glikoproteina [207,210]. Iako postoje oprečni stavovi o ulozi P-gp u metabolizmu AA, jedna studija na bugarskim pacijentima pokazala je da je *MDR1* haplotip 1/2 (C2677/T3435) imao manju učestalost kod pacijenata sa BEN (7%), nego u kontrolnoj grupi (16%) [36]. U saglasnosti sa rezultatima *Atanasove* i saradnika, rezultati našeg istraživanja su pokazali da osobe nosioci *MDR1*\*T/T genotipa nemaju statistički značajno veći rizik za BEN. Ipak, rezultati ove studiju ukazuju da su osobe nosioci barem jednog *varijantnog MDR1*\*T alela u skoro 2 puta većem riziku za nastanak BEN, iako je rezultat bio samo blizu granice za statističku značajnost ( $p = 0,059$ ). Kako *MDR1* rs105642 SNP utiče na ekspresiju i aktivnost ovog proteina, ovo bi moglo da dovede smanjenog efluksa krajnjih nefrotoksičnih metabolita atristolohijske kiseline što bi pogodovalo pogoršanju oksidativnog distresa i tubulotoksičnosti. Ako posmatramo terminalnu bubrežnu slabost, kao neminovnu komplikaciju BEN, rezultati naše studije su u skladu sa rezultatima studije *Zhang* i saradnika, u kojoj niska ekspresija P-glikoproteina, vjerovatno kao posljedica *MDR1* rs1045642, nije bila etiološki faktor za terminalnu bolest bubrega, ali doprinosi progresiji bolesti [211].

Pored toga, treba napomenuti da je u slučaju polimorfizma *MDR1* C3435T naša studija pokazala polno specifične razlike u odnosu na rizik od BEN. Tako su rezultati ove studije pokazali da je polimorfizam *MDR1* C3435T povezan sa povećanim rizikom od BEN, isključivo kod žena. Iako rezultat nije dostigao statističku značajnost, individualno *MDR1* rs1045642 je pokazao 2 puta veći povećan rizik za razvoj BEN u grupi žena (OR = 1,97; 95% IP= 0,89–4,32;  $p = 0,090$ ). Sa druge strane, kada se posmatra u kombinaciji sa drugim antioksidantnim proteinom rezultati pokazuju da pacijentice koje su nosioci barem jednog *varijantnog* alela *GPX3*\*C i barem jednog *varijantnog* alela *MDR1*\*T (*GPX3*\*T/C\*C/C genotip + *MDR1*\*C/T\*T/T genotip) imaju 3 puta veći rizik za pojavu BEN (OR2 = 3,79, 95% IP = 1,27–11,24,  $p = 0,016$ ). BEN podjednako često zahvata oba pola, iako je u nekoliko studija prijavljeno da žene neznatno češće obolijevaju [7]. Prvo, pol može odražavati različite nivoe faktora životne sredine koji su povezani sa izloženošću na poslu, ishranom ili načinom života. Još jedan od razloga za neslaganja u rezultatima mogao bi biti posljedica činjenice da polni hormoni mogu uticati na ekspresiju gena povezanih sa razvojem bolesti. Treba napomenuti da su steroidni hormoni, kao što je progesteron, u stanju da modulišu ekspresiju P-gp u nekim tkivima, što je i pokazano u studijama na miševima [228]. Steroidni polni hormoni mogu modulirati P-gp u širokom spektru tkiva, uključujući i proksimalne tubule bubrega [229–231].

Dodatno, progesteron, kao i nekoliko njegovih prirodnih metabolita, su moćni inhibitori P-gp *in vitro* [229]. U skorije vrijeme, *in vitro* studije su pokazale da estron, estriol i etinil estradiol su modulatori P-gp koji, također, regulišu transkripciju *MDR1* [232]. Sve ovo, zajedno sa pomenutim SNP, može uticati na ekspresiju *MDR1* i funkciju P-gp, čime bi mogle da se rastumače polne specifičnosti u slučaju *MDR1* rs1045642 .

Na osnovu dobijenih rezultata mogli bismo pretpostaviti da manja ekspresija i izmijenjena funkcija *MDR1* i *GPX3* proteina imaju za posljedicu slabiju antioksidativnu odbranu, što bi moglo da pogoduje većoj podložnosti za nastanak BEN. Iako, prema dosadašnjim saznanjima, postoje oprečni stavovi o ulozi *MDR1* gena u metabolizmu aristolohijske kiseline i patogenezi BEN, rezultati naše studije ukazuju da bi proizvod ovog gena mogao da ima potencijalnu ulogu u etiologiji ove bolesti. Potrebne su dalje studije sa većim brojem oboljelih, kao i studije replikacije da bi se potvrdila uloga *MDR1* C3435T (rs1045642) u patogenezi BEN, posebno u smislu polno specifičnih razlika.

U daljem toku ovog istraživanja ispitivan je kumulativni efekat pomenutih polimorfizama na rizik za nastanak BEN. Zanimljivo je da su rezultati ove studije pokazali da su 6% svih pacijenata sa BEN-om u našoj studiji bili nosioci svih 5 genotipova udruženih sa povećanim rizikom (*KEAP1*\*G/G, *Nrf2*\*A/A, *GSTPAB*\*G/G, *GSTPCD*\*T/T, *GPX3*\*C/C, *MDR1*\*T/T) od nastanka BEN. Šta više, trend u porastu unakrsnog odnosa šansi je uočen kada je analiziran kumulativni efekat genotipova na rizik za nastanak BEN.

Vodeći se činjenicom da je *GPX3* primarno eksprimiran u tkivu bubrega, te da igra ulogu u fazi inicijacije i progresije bubrežne kancerogeneze [165], poslednja faza našeg istraživanja obuhvatala je analizu polimorfizma ovog važnog antioksidantnog enzima u pogledu rizika za BEN i BEN-udruženog urotelnog karcinoma. Porodica *GPX* proteina se sastoji od 8 izoenzima, a *GPX3* je glavna vanćelijska izoforma, dok je bubreg je dominantno tkivo koje doprinosi aktivnosti *GPX3* u plazmi [162]. U bubrezima, *GPX3* se prvenstveno eksprimira u parijetalnim ćelijama Boumanovih kapsula i u ćelijama bazolateralne membrane proksimalnih tubula čime obezbjeđuje zaštitu epitelnim ćelijama od oksidativnog oštećenja [168]. Osvrnuvši se na funkcionalnu važnost ovog polimorfizma, čini se da promjene u promotorskoj regiji *GPX3* gena modifikuju ekspresiju istoimenog proteina [184]. Naime, polimorfizam *GPX3* rezultuje nižom transkripcionom aktivnošću i smanjenom intracelularnom ekspresijom *GPX3* enzima, što uveliko narušava katalitičku aktivnost ovog proteina [233]. Posmatrajući BEN, uočili smo da su nosioci najmanje jedne kopije varijantnog *GPX3*\*C alela (*GPX3*\*T/C+C/C genotip) bili pod umjereno povećanim rizikom od razvoja BEN. Iako rezultat nije dostigao statističku

značajnost, osobe nosioci *GPX3*\*T/C\*C/C genotipa su 2 puta podložniji za nastanak BEN-a, u odnosu na osobe nosioce referentnog genotipa. Prema tome, vjerovatno je da bi poremećaj redoks homeostaze kod BEN pacijenata nastao nakon ekspozicije AA mogao biti pogoršan efektom *GPX3* rs8177412 polimorfizma. Naime, moguće je pretpostaviti da AA utiče na pad intrarenalnog antioksidantnog kapaciteta smanjujući, između ostalog, ekspresiju i aktivnost *GPX3*, što u slučaju manje aktivne varijante *GPX3* gena vrlo vjerovatno vodi ka većoj produkciji ROS i nastanku bolesti. Pretpostavku da je oksidativni stres važan dio slagalice u kompleksnoj etiopatogenezi BEN potkrijepljuju i nalazi novijih *in vivo* studija, koji pokazuju vezivanje *GPX3* za bazalnu membranu proksimalnih tubula. Pretpostavlja se da je u stvari vezivanje *GPX3* za bazalnu membranu ključ njegove antioksidantne funkcije, dok epitelne ćelije tubula vjerovatno oslobađaju glutation u ovaj prostor, gdje bi mogao da posluži kao redukcionni supstrat za *GPX3* [168]. Kako je BEN bolest koji zahvata tubule, njihova disfunkcija zajedno sa manje aktivnom formom *GPX3* enzima mogla bi da bude jedan od razloga redoks disbalansa kod BEN, ali i da doprinese ulozi oksidativnog stresa u BEN.

Kao i u slučaju prethodno analiziranih genskih polimorfizama, i sada smo se osvrnuli na specifičan entitet urotelnih tumora na terenu BEN. Vođeni nalazima nekoliko studija u kojima je pokazano da gubitak ekspresije *GPX3* u tumorskim tkivima povezan sa lošijom prognozom pacijenata i kraćim preživljavanjem, ispitivali smo značaj polimorfizma *GPX3* rs8177412 kod BEN pacijenata koji su razvili tumor [175,176,189] Analogno pomenutim studijama, podaci iz TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas Program*) pokazuju da je niska ekspresija *GPX3* povezana sa lošim preživljavanjem u slučaju adenokarcinoma pluća i glioma niskog stepena [234]. Kod hepatocelularnog karcinoma nađeno je da ćelije neposredno uz tumorsko tkivo, takođe, pokazuju smanjenu ekspresiju *GPX3*, pri čemu autori sugerišu da bi to mogle biti predkancerone lezije [179].

U skladu sa ovim su i rezultati dobijeni u našoj studiji, otkrili smo značajan uticaj polimorfizma *GPX3* rs8177412 na rizik od urotelnih tumora gornjeg trakta udruženog sa BEN. Rezultat je pokazao da je *GPX3*\*T/C\*C/C varijanta genotipa, koju karakteriše slabija antioksidantna aktivnost *GPX3*, značajan faktor rizika za razvoj karcinoma povezanog s BEN. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim analizom podataka u TCGA i GTEx (engl. *Genotype-Tissue Expression*) bazama [235,236], gdje je pokazano da je ekspresija gena *GPX3*, veća u normalnom tkivu mokraćne bešike nego u tkivu karcinoma mokraćne bešike [237]. Integrisana analiza govori u prilog tome da je *GPX3* bio nedovoljno eksprimiran u 22 od 34 ispitana uzorka tumorskog tkiva, uključujući karcinom urotela [238]. Najnovije istraživanje je predložilo *GPX3* kao novi biomarker u urinu, zasnovan na relativnoj ekspresiji

GPX3. Naime, nivo GPX3 bio je značajno niži u urinu pacijenata sa karcinomom mokraćne bešike nego u kontrolnoj grupi [237]. Svi ovi nalazi sugeriraju da bi smanjena ekspresija i aktivnost *GPX3*, posredovana *GPX3* SNP, mogla da bude važna karika u razvoju tumora gornjeg kanalnog sistema. Značajno je istaći da sa polimorfnom ekspresijom, zajedno sa još nekoliko faktora može da poveća podložnost za nastanak BEN i udruženih tumora. U tom kontekstu možemo istaći da hronično izlaganje AA dovodi i do smanjenja nivoa dostupnog glutationa, kofaktora GPX3 enzima, što bi moglo da pogoduje pogoršanju oksidativnog stresa kod nosioca *varijantnog GPX3*\*C alela [90]. Šta više, ekspozicija AA dovodi do smanjene aktivnosti i smanjene ekspresije u uslovima *in vitro* [62,174]. Zajedno sa polimorfnom ekspresijom ovog proteina, to bi dodatno moglo da poveća predispoziciju pojedinca za razvoj BEN i tumora urotelijuma. Još jedan od faktora značajan za aktivnost ovog enzima je selen. U ovom istraživanju nisu bili dostupni podaci u vezi sa deficijencijom selena kod pacijenata sa urotelnim tumorima, iako su istaživanja pokazala da je upravo deficijencija selena mnogo češća kod pacijenata na hemodijalizi [239]. Sve bi ovo, u kombinaciji sa polimorfnom ekspresijom *GPX3*, moglo biti udruženo sa smanjenom plazma aktivnošću GPX3 i pojačanim stepenom lipidne peroksidacije što pogoduje nastanku tumora, uključujući i tumora urotela kod BEN pacijenata.

Na osnovu izloženih rezultata i donesenih zaključaka, genotipizacija *GPX3* bi se mogla pokazati kao poželjan marker bolesti, pomažući u identifikaciji pacijenata sa BEN koji su skloniji razvoju tumora gornjeg urotela. Stoga bi dalja molekularna istraživanja mogla otkriti genetske markere BEN i povezanog urotelnog karcinoma, što bi omogućilo rano otkrivanje osjetljivih pojedinaca koji mogu biti u opasnosti od izlaganja AA.

U ovoj studiji uočeno je nekoliko ograničenja. Jedno od ograničenja je relativno mala veličina uzorka. Zbog činjenice da je BEN bolest koja pogađa samo ciljanu populaciju, ovi rezultati mogu biti korisni za dio ove populacije i vjerovatno se ne mogu prenijeti na heterogenu populaciju. Pored starosti i pola kao dodatnih faktora, vjerovatno postoji više faktora koji mogu uticati na rezultate. Takođe, ograničenje je nedostatak BEN pacijenata ili kontrola koje nose svih šest genotipova koji nisu povezani sa rizikom (*KEAP1*\*C/C, *Nrf2*\*C/C, *GSTPAB*\*A/A, *GSTPCD*\*C/C, *GPX3*\*T/T, *MDR1*\*C/C) i svih šest rizičnih genotipova (*KEAP1*\*G/G, *Nrf2*\*A/A, *GSTPAB*\*G/G, *GSTPCD*\*T/T, *GPX3*\*C/C, *MDR1*\*T/T). Stoga, kombinovani efekat i ukupan kumulativni efekat svih šest genotipova nije mogao biti analiziran. Nadamo se da ćemo nastaviti ovu studiju sa većom kohortom učesnika kako bismo, između ostalog, analizirali kombinovane i kumulativne efekte svih šest genotipova.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Distribucija polimorfizama gena za *KEAP1* (rs1048290), *Nrf2* (rs6721961), *GSTPIAB* (rs1695), *GSTPAICD* (rs1138272), *GPX3* (rs8177412) i *MDR1* (rs1045642) se ne razlikuje značajno između bolesnika sa BEN i pripadnika kontrolne grupe.
2. Distribucija polimorfizma gena za *GPX3* (rs8177412) se značajno razlikuje između grupe bolesnika sa BEN koji imaju tumore gornjeg urotelijuma i bolesnika sa BEN koji ih nemaju. Između ove dvije grupe nisu uočene razlike u distribuciji ostalih ispitivanih genskih polimorfizama.
3. Nije uočena statistički značajna povezanost pojedinačnih polimorfizama *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTPIAB*, *GSTP1CD*, *GPX3* i *MDR1* sa rizikom za nastanak BEN u cijeloj analiziranoj grupi bolesnika. Međutim, analiza povezanosti ovih polimorfizama u polno specifičnim grupama pokazala je visoke unakrsne odnose šansi (OR2 = 3,79, 95%IP = 1,27-11,24, p = 0,016) kod žena sa najmanje jednim *varijantnim* alelom gena za *GPX3* i najmanje jednim *varijantnim* alelom gena za *MDR1*, što ukazuje na značajnu ulogu sistemskog oksidativnog stresa i značaj neadekvatne eliminacije krajnjih proizvoda metabolizma aristolohijske kiseline kod žena.
4. Pokazana je značajna povezanost *varijantnog* *GPX3\*T/C\*C/C* genotipa, koji karakteriše smanjena ekspresija *GPX3*, sa rizikom za pojavu karcinoma gornjeg urotelijuma kod bolesnika sa BEN. Osobe nosioci *varijantnog* *GPX3\*T/C\*C/C* genotipa, pokazuju 8 puta veći rizik za nastanak tumora gornjeg urinarnog trakta. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu mogućnost korišćenja polimorfizma *GPX3* kao biomarkera rizika za nastanak ovih tumora u populaciji bolesnika sa BEN.
5. Analiza haplotipa *GSTPIABCD* je pokazala da je haplotip koji se sastoji od oba *varijantna* alela bio povezan sa 1,6 puta većim rizikom za nastanak ove bolesti. S obzirom da *\*Ala referenti* alel predstavlja potentan inhibitor c-JNK i ima jači antiapoptotički efekat, moguće je da prisustvo *varijantnog* *\*Val* alela, u slučaju *GSTPIAB* rs1695, dovodi do pojačane apoptoze što bi mogao biti jedan od mehanizama redukcije bubrežnog parenhima u ovoj bolesti.
6. Analiza kumulativnog efekta pet različitih genotipova povezanih sa rizikom (*KEAP1\*G/G*, *Nrf2\*A/A*, *GSTPAB\*G/G*, *GSTPCD\*T/T*, *GPX3\*C/C*, *MDR1\*T/T*)

pokazala je rastući trend rizika za nastanak BEN sugerišući značajnu ulogu oksidativnog stresa u patogenezi ove bolesti.

7. Iz svega navedenog se može zaključiti da je nastanak BEN povezan sa produkcijom slobodnih radikala u metabolizmu aristolohijske kiseline, čiji kancerogeni efekat je posebno izražen kod osoba sa varijantnim *GPX3* genotipom (*GPX3*\*T/C\*C/C). Stoga, pacijente sa BEN koji nose *varijantne* oblike *GPX3* gena treba češće pratiti u cilju ranijeg otkrivanja bolesti i prepoznavanju pacijenata koji imaju veći rizik za razvoj urotelnog tumora.

## 7. LITERATURA

1. Danilovic V. Chronic nephritis due to ingestion of lead-contaminated flour. *Br Med J*. 1958 Jan 4;1(5061):27–8.
2. Tanchev I, Evstatiev T, Dorosiev D, Pencheva Z, Tsvetkov G. [Study of nephritis in Vrattsa district]. *Suvr Med (Sofia)*. 1956;7(9):14–29.
3. Pavlovi NM. Balkan endemic nephropathy--current status and future perspectives. *Clinical Kidney Journal*. 2013 Jun 1;6(3):257–65.
4. Stefanovic V, Radovanovic Z. Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *Nat Rev Urol*. 2008 Feb;5(2):105–12.
5. Grollman AP. Aristolochic acid nephropathy: Harbinger of a global iatrogenic disease. *Environ Mol Mutagen*. 2013 Jan;54(1):1–7.
6. Pfohl-Leszkowicz A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009 Dec;60(4):465–83.
7. Stefanovic V, Toncheva D, Polenakovic M. Balkan nephropathy. *Clin Nephrol*. 2015;83(7 Suppl 1):64–9.
8. Stiborová M, Arlt VM, Schmeiser HH. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Arch Toxicol*. 2016 Nov;90(11):2595–615.
9. Jelakovi B, Nikoli J, Radovanovi Z, Nortier J, Cosyns JP, Grollman AP, et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014 Nov 1;29(11):2020–7.
10. Mesić E, Lukić L, Dolenc L, Petković N, Stipančić Z, Resić H, et al. [Balkan endemic nephropathy in Bosnia and Herzegovina--renal registry report]. *Med Arh*. 2006;60(4):240–2.
11. Stefanović V, Djukanović L, Cukuranović R, Bukvić D, Ležaić V, Marić I, et al. Beta2-microglobulin and alpha1-microglobulin as markers of Balkan endemic nephropathy, a worldwide disease. *Ren Fail*. 2011;33(2):176–83.
12. Miljković P, Strahinjić S, Hall PW, Djordjević V, Mitić-Zlatković M, Stefanović V. Urinary protein excretion in children from families with Balkan nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 1991 Nov;34:S27-31.
13. Djukanović L, Marić I, Marinković J, Ignjatović S, Bukvić D. Evaluation of criteria for the diagnosis of Balkan endemic nephropathy. *Ren Fail*. 2007;29(5):607–14.



14. Stiborova M, Martínek V, Frei E, Arlt V, Schmeiser H. Enzymes Metabolizing Aristolochic Acid and their Contribution to the Development of Aristolochic Acid Nephropathy and Urothelial Cancer. *CDM*. 2013 Jul 1;14(6):695–705.
15. Bamias G, Boletis J. Balkan nephropathy: evolution of our knowledge. *Am J Kidney Dis*. 2008 Sep;52(3):606–16.
16. Batuman V. Fifty years of Balkan endemic nephropathy: daunting questions, elusive answers. *Kidney Int*. 2006 Feb;69(4):644–6.
17. Arlt VM, Ferluga D, Stiborova M, Pfohl-Leszkowicz A, Vukelic M, Ceovic S, et al. Is aristolochic acid a risk factor for Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer? *Int J Cancer*. 2002 Oct 10;101(5):500–2.
18. Anandagoda N, Lord GM. Preventing aristolochic acid nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Feb 6;10(2):167–8.
19. Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MSJ. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2--a global assessment based on bibliographic sources. *J Ethnopharmacol*. 2009 Aug 17;125(1):108–44.
20. Ivić M. [Etiology of endemic nephropathy]. *Lijec Vjesn*. 1969;91(12):1273–81.
21. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, De Plaen JF, Ferluga D, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int*. 1994 Jun;45(6):1680–8.
22. Cosyns JP. Aristolochic acid and ‘Chinese herbs nephropathy’: a review of the evidence to date. *Drug Saf*. 2003;26(1):33–48.
23. Cosyns JP, Goebbels RM, Liberton V, Schmeiser HH, Bieler CA, Bernard AM. Chinese herbs nephropathy-associated slimming regimen induces tumours in the forestomach but no interstitial nephropathy in rats. *Arch Toxicol*. 1998 Nov;72(11):738–43.
24. De Broe ME. *Clinical nephrotoxins: renal injury from drugs and chemicals*. 3rd ed. New York: Springer; 2008.
25. Toncheva D, Dimitrov T. Genetic predisposition to Balkan endemic nephropathy. *Nephron*. 1996;72(4):564–9.
26. Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL. The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers. *Environ Health Perspect*. 1998 Nov;106(11):689–700.
27. Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int*. 2008 Jul;74(2):158–69.
28. Radović M, Schiller A. *Balkan endemic nephropathy* [Internet]. Covic A, editor. Vol. 1. Oxford University Press; 2018 [cited 2023 Nov 21]. Available from: <https://academic.oup.com/book/40212/chapter/343544758>

29. Atanasova SY, von Ahsen N, Toncheva DI, Dimitrov TG, Oellerich M, Armstrong VW. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 among patients with Balkan endemic nephropathy (BEN). *Clin Biochem.* 2005 Mar;38(3):223–8.
30. Andonova IE, Sarueva RB, Horvath AD, Simeonov VA, Dimitrov PS, Petropoulos EA, et al. Balkan endemic nephropathy and genetic variants of glutathione S-transferases. *J Nephrol.* 2004;17(3):390–8.
31. Toncheva DI, Von Ahsen N, Atanasova SY, Dimitrov TG, Armstrong VW, Oellerich M. Identification of NQO1 and GSTs genotype frequencies in Bulgarian patients with Balkan endemic nephropathy. *J Nephrol.* 2004;17(3):384–9.
32. Atanasova S, Von Ahsen N, Dimitrov Tz, Oellerich M, Toncheva D. First Study of NAT1 and NAT2 Polymorphisms in Bulgarian Patients with Balkan Endemic Nephropathy (Ben) and Healthy Controls. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2004 Jan;18(1):95–103.
33. Reljic Z, Zlatovic M, Savic-Radojevic A, Pekmezovic T, Djukanovic L, Matic M, et al. Is increased susceptibility to Balkan endemic nephropathy in carriers of common GSTA1 (\*A/\*B) polymorphism linked with the catalytic role of GSTA1 in ochratoxin a biotransformation? Serbian case control study and in silico analysis. *Toxins (Basel).* 2014 Aug 8;6(8):2348–62.
34. Matic M, Dragicevic B, Pekmezovic T, Suvakov S, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, et al. Common Polymorphisms in *GSTA1*, *GSTM1* and *GSTT1* Are Associated with Susceptibility to Urinary Bladder Cancer in Individuals from Balkan Endemic Nephropathy Areas of Serbia. *Tohoku J Exp Med.* 2016;240(1):25–30.
35. Dragicevic B, Suvakov S, Jerotic D, Reljic Z, Djukanovic L, Zelen I, et al. Association of SOD2 (rs4880) and GPX1 (rs1050450) Gene Polymorphisms with Risk of Balkan Endemic Nephropathy and its Related Tumors. *Medicina (Kaunas).* 2019 Aug 3;55(8):435.
36. Atanasova S, Von Ahsen N, Dimitrov T, Armstrong V, Oellerich M, Toncheva D. *MDR1* Haplotypes Modify BEN Disease Risk: A Study in Bulgarian Patients with Balkan Endemic Nephropathy Compared to Healthy Controls. *Nephron Exp Nephrol.* 2004 Nov 17;96(1):e7–13.
37. Stiborová M, Hudeček J, Frei E, Schmeiser H. Contribution of biotransformation enzymes to the development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid: urgent questions, difficult answers. *Interdisciplinary Toxicology.* 2008 Jun 1;1(1):8–12.
38. Stiborova M, Mares J, Levova K, Pavlickova J, Barta F, Hodek P, et al. Role of cytochromes P450 in metabolism of carcinogenic aristolochic acid I: evidence of their contribution to aristolochic acid I detoxication and activation in rat liver. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32 Suppl 1:121–30.
39. Anger EE, Yu F, Li J. Aristolochic Acid-Induced Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms and Potential Protective Approaches. *IJMS.* 2020 Feb 10;21(3):1157.

40. Dekant W. The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. *EXS*. 2009;99:57–86.
41. Stiborová M, Levová K, Bárta F, Shi Z, Frei E, Schmeiser HH, et al. Bioactivation versus Detoxication of the Urothelial Carcinogen Aristolochic Acid I by Human Cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicological Sciences*. 2012 Feb;125(2):345–58.
42. Chen M, Gong L, Qi X, Xing G, Luan Y, Wu Y, et al. Inhibition of renal NQO1 activity by dicoumarol suppresses nitroreduction of aristolochic acid I and attenuates its nephrotoxicity. *Toxicol Sci*. 2011 Aug;122(2):288–96.
43. Chan W, Cui L, Xu G, Cai Z. Study of the phase I and phase II metabolism of nephrotoxin aristolochic acid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(11):1755–60.
44. Shibutani S, Bonala RR, Rosenquist T, Rieger R, Suzuki N, Johnson F, et al. Detoxification of aristolochic acid I by O-demethylation: less nephrotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid Ia in rodents. *Int J Cancer*. 2010 Sep 1;127(5):1021–7.
45. Stiborová M, Bárta F, Levová K, Hodek P, Schmeiser HH, Arlt VM, et al. A Mechanism of O-Demethylation of Aristolochic Acid I by Cytochromes P450 and Their Contributions to This Reaction in Human and Rat Livers: Experimental and Theoretical Approaches. *Int J Mol Sci*. 2015 Nov 18;16(11):27561–75.
46. Xiao Y, Ge M, Xue X, Wang C, Wang H, Wu X, et al. Hepatic cytochrome P450s metabolize aristolochic acid and reduce its kidney toxicity. *Kidney Int*. 2008 Jun;73(11):1231–9.
47. Feng C, Xie X, Wu M, Li C, Gao M, Liu M, et al. Tanshinone I protects mice from aristolochic acid I-induced kidney injury by induction of CYP1A. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013 Nov;36(3):850–7.
48. Martinek V, Kubickova B, Arlt VM, Frei E, Schmeiser HH, Hudecek J, et al. Comparison of activation of aristolochic acid I and II with NADPH:quinone oxidoreductase, sulphotransferases and N-acetyltransferases. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011;32 Suppl 1:57–70.
49. Okuno Y, Bonala R, Attaluri S, Johnson F, Grollman AP, Sidorenko VS, et al. Bioactivation mechanisms of *N*-hydroxyaristolactams: Nitroreduction metabolites of aristolochic acids. *Environ Mol Mutagen*. 2019 Dec;60(9):792–806.
50. Meinel W, Pabel U, Osterloh-Quiroz M, Hengstler JG, Glatt H. Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue. *Int J Cancer*. 2006 Mar 1;118(5):1090–7.
51. Sidorenko VS, Attaluri S, Zaitseva I, Iden CR, Dickman KG, Johnson F, et al. Bioactivation of the human carcinogen aristolochic acid. *Carcinogenesis*. 2014 Aug;35(8):1814–22.
52. Hashimoto K, Zaitseva IN, Bonala R, Attaluri S, Ozga K, Iden CR, et al. Sulfotransferase-1A1-dependent bioactivation of aristolochic acid I and *N*-hydroxyaristolactam I in human cells. *Carcinogenesis*. 2016 Jul;37(7):647–55.

53. Gao C, Zhang Q, Ma L, Xu G, Song P, Xia L. Metabolic pathway and biological significance of glutathione detoxification of aristolochic acid I. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2021 Sep;7:100054.
54. Zhang J, Chan CK, Ham YH, Chan W. Identifying Cysteine, *N*-Acetylcysteine, and Glutathione Conjugates as Novel Metabolites of Aristolochic Acid I: Emergence of a New Detoxification Pathway. *Chem Res Toxicol*. 2020 Jun 15;33(6):1374–81.
55. Chang SY, Weber EJ, Sidorenko VS, Chapron A, Yeung CK, Gao C, et al. Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity. *JCI Insight*. 2017 Nov 16;2(22):e95978, 95978.
56. Miletić-Medved M, Domijan AM, Peraica M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. *Wien Klin Wochenschr*. 2005 Sep;117(17):604–9.
57. Cvitković A, Vuković-Lela I, Edwards KL, Karanović S, Jurić D, Cvorišćec D, et al. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in forthcoming decades? *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(3):147–52.
58. Chen CH, Dickman KG, Moriya M, Zavadil J, Sidorenko VS, Edwards KL, et al. Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 22;109(21):8241–6.
59. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med*. 2000 Jun 8;342(23):1686–92.
60. Lord GM, Cook T, Arit VM, Schmeiser HH, Williams G, Pusey CD. Urothelial malignant disease and Chinese herbal nephropathy. *The Lancet*. 2001 Nov;358(9292):1515–6.
61. Mengs U. Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Arch Toxicol*. 1987 Feb;59(5):328–31.
62. Liu X, Wu J, Wang J, Feng X, Wu H, Huang R, et al. Mitochondrial dysfunction is involved in aristolochic acid I-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells. *Hum Exp Toxicol*. 2020 May;39(5):673–82.
63. Sborchia M, Keun HC, Phillips DH, Arlt VM. The Impact of p53 on Aristolochic Acid I-Induced Gene Expression In Vivo. *IJMS*. 2019 Dec 6;20(24):6155.
64. Markovic N, Ignjatovic I, Cukuranovic R, Petrovic B, Kocic B, Stefanovic V. Decreasing incidence of urothelial cancer in a Balkan endemic nephropathy region in Serbia. A surgery based study from 1969 to 1998. *Pathologie Biologie*. 2005 Jan;53(1):26–9.
65. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2002;82:1–556.

66. Jelaković B, Karanović S, Vuković-Lela I, Miller F, Edwards KL, Nikolić J, et al. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney Int.* 2012 Mar;81(6):559–67.
67. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):104–13.
68. Moriya M, Slade N, Brdar B, Medverec Z, Tomic K, Jelaković B, et al. TP53 Mutational signature for aristolochic acid: an environmental carcinogen. *Int J Cancer.* 2011 Sep 15;129(6):1532–6.
69. Olivier M, Hollstein M, Schmeiser HH, Straif K, Wild CP. Upper urinary tract urothelial cancers: where it is A:T. *Nat Rev Cancer.* 2012 Aug;12(8):503–4.
70. Schmeiser HH, Nortier JL, Singh R, Gamboa Da Costa G, Sennesael J, Cassuto-Viguier E, et al. Exceptionally long-term persistence of DNA adducts formed by carcinogenic aristolochic acid I in renal tissue from patients with aristolochic acid nephropathy: Persistence of aristolochic acid-DNA adducts. *Int J Cancer.* 2014 Jul 15;135(2):502–7.
71. Leung EMK, Chan W. Quantification of aristolochic acid-RNA adducts in the urine of aristolochic acid-treated rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 2015 Apr 20;28(4):567–9.
72. Jelaković B, Dika Ž, Arlt VM, Stiborova M, Pavlović NM, Nikolić J, et al. Balkan Endemic Nephropathy and the Causative Role of Aristolochic Acid. *Semin Nephrol.* 2019 May;39(3):284–96.
73. Stiborová M, Arlt VM, Schmeiser HH. DNA Adducts Formed by Aristolochic Acid Are Unique Biomarkers of Exposure and Explain the Initiation Phase of Upper Urothelial Cancer. *IJMS.* 2017 Oct 14;18(10):2144.
74. Gökmen MR, Cosyns JP, Arlt VM, Stiborová M, Phillips DH, Schmeiser HH, et al. The epidemiology, diagnosis, and management of aristolochic acid nephropathy: a narrative review. *Ann Intern Med.* 2013 Mar 19;158(6):469–77.
75. Zhang J, Chan CK, Pavlović NM, Chan W. Effects of Diet on Aristolochic Acid-DNA Adduct Formation: Implications for Balkan Endemic Nephropathy Etiology. *Chem Res Toxicol.* 2023 Mar 20;36(3):438–45.
76. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180–3.
77. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20;86:715–48.
78. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel).* 2020 Sep 10;9(9):852.
79. Romanov V, Whyard TC, Waltzer WC, Grollman AP, Rosenquist T. Aristolochic acid-induced apoptosis and G2 cell cycle arrest depends on ROS generation and MAP kinases activation. *Arch Toxicol.* 2015 Jan;89(1):47–56.

80. Bunel V, Antoine MH, Stévigny C, Nortier J, Duez P. New in vitro insights on a cell death pathway induced by magnolol and honokiol in aristolochic acid tubulotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2016 Jan;87:77–87.
81. Sung CC, Hsu YC, Chen CC, Lin YF, Wu CC. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:301982.
82. Galvan DL, Green NH, Danesh FR. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2017 Nov;92(5):1051–7.
83. Wang Y, Ma X, Zhou C, Jia Y, Liu S, Xiong Z, et al. Aristolochic acid induces mitochondrial apoptosis through oxidative stress in rats, leading to liver damage. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2021 Oct 13;31(8):609–18.
84. Chan W, Ham YH. Probing the Hidden Role of Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in the Etiology of Aristolochic Acid Nephropathy. *Chem Res Toxicol*. 2021 Aug 16;34(8):1903–9.
85. Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelle FD, Decaestecker C, Van den Branden C, Verbeelen D, et al. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int*. 2008 Mar;73(5):595–607.
86. Deng HF, Yue LX, Wang NN, Zhou YQ, Zhou W, Liu X, et al. Mitochondrial Iron Overload-Mediated Inhibition of Nrf2-HO-1/GPX4 Assisted ALI-Induced Nephrotoxicity. *Front Pharmacol*. 2020;11:624529.
87. Jadot I, Declèves AE, Nortier J, Caron N. An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature. *IJMS*. 2017 Jan 29;18(2):297.
88. Huang TC, Chen SM, Li YC, Lee JA. Increased renal semicarbazide-sensitive amine oxidase activity and methylglyoxal levels in aristolochic acid-induced nephrotoxicity. *Life Sci*. 2014 Sep 26;114(1):4–11.
89. Lin CE, Chang WS, Lee JA, Chang TY, Huang YS, Hirasaki Y, et al. Proteomics analysis of altered proteins in kidney of mice with aristolochic acid nephropathy using the fluorogenic derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Biomed Chromatogr*. 2018 Mar;32(3).
90. Yu FY, Wu TS, Chen TW, Liu BH. Aristolochic acid I induced oxidative DNA damage associated with glutathione depletion and ERK1/2 activation in human cells. *Toxicol In Vitro*. 2011 Jun;25(4):810–6.
91. Declèves AÉ, Jadot I, Colombaro V, Martin B, Voisin V, Nortier J, et al. Protective effect of nitric oxide in aristolochic acid-induced toxic acute kidney injury: an old friend with new assets. *Exp Physiol*. 2016 Jan;101(1):193–206.
92. Kim JY, Leem J, Jeon EJ. Protective Effects of Melatonin Against Aristolochic Acid-Induced Nephropathy in Mice. *Biomolecules*. 2019 Dec 19;10(1):11.
93. Wu TK, Wei CW, Pan YR, Cherng SH, Chang WJ, Wang HF, et al. Vitamin C attenuates the toxic effect of aristolochic acid on renal tubular cells via decreasing

- oxidative stress-mediated cell death pathways. *Molecular Medicine Reports*. 2015 Oct;12(4):6086–92.
94. Gluhovschi C, Modilcă M, Margineanu M, Gluhovschi G, Velciov S, Petrica L, et al. Surprising good antioxidant status in patients with Balkan Endemic Nephropathy on hemodialysis undergoing vitamin C therapy. A pilot study. *Rom J Intern Med*. 2014;52(3):158–61.
95. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018 Dec 10;29(17):1727–45.
96. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999 Jul 8;234(2):177–86.
97. Aerts J, Wetzels Y, Cohen N, Aerssens J. Data mining of public SNP databases for the selection of intragenic SNPs. *Hum Mutat*. 2002 Sep;20(3):162–73.
98. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jul;37(13):4181–93.
99. Emmert-Streib F, Dehmer M. Enhancing systems medicine beyond genotype data by dynamic patient signatures: having information and using it too. *Front Genet*. 2013;4:241.
100. Reid-Lombardo KM, Petersen GM. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals. *Surgery*. 2010 Apr;147(4):469–74.
101. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sciences*. 2022 Feb;291:120111.
102. Sykiotis GP. Keap1/Nrf2 Signaling Pathway. *Antioxidants*. 2021 May 22;10(6):828.
103. Zhang DD, Lo SC, Sun Z, Habib GM, Lieberman MW, Hannink M. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30091–9.
104. Chan K, Lu R, Chang JC, Kan YW. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13943–8.
105. Lo SC, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, Hannink M. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J*. 2006 Aug 9;25(15):3605–17.
106. Tao S, Liu P, Luo G, Rojo De La Vega M, Chen H, Wu T, et al. p97 Negatively Regulates NRF2 by Extracting Ubiquitylated NRF2 from the KEAP1-CUL3 E3 Complex. *Molecular and Cellular Biology*. 2017 Apr 1;37(8):e00660-16.
107. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015 Nov;88:179–88.

108. Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacological Reports*. 2017 Jun;69(3):393–402.
109. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*. 2008 Oct;74(13):1526–39.
110. Canning P, Sorrell FJ, Bullock AN. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015 Nov;88:101–7.
111. Du C, Wang X, Chen H. Oxidative Stress to Renal Tubular Epithelial Cells – A Common Pathway in Renal Pathologies. In: Laher I, editor. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2023 Sep 1]. p. 2605–24. Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30018-9\\_187](https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30018-9_187)
112. Kim HJ, Vaziri ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010 Mar;298(3):F662–71.
113. Shelton LM, Lister A, Walsh J, Jenkins RE, Wong MHL, Rowe C, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analyses uncover regulatory roles of Nrf2 in the kidney. *Kidney International*. 2015 Dec;88(6):1261–73.
114. Huang X, Wu J, Liu X, Wu H, Fan J, Yang X. The protective role of Nrf2 against aristolochic acid-induced renal tubular epithelial cell injury. *Toxicol Mech Methods*. 2020 Oct;30(8):580–9.
115. Wu J, Liu X, Fan J, Chen W, Wang J, Zeng Y, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates aristolochic acid (AA)-induced acute kidney injury through Nrf2 pathway. *Toxicology*. 2014 Apr 6;318:22–31.
116. Wang Y, Liu Z, Ma J, Xv Q, Gao H, Yin H, et al. Lycopene attenuates the inflammation and apoptosis in aristolochic acid nephropathy by targeting the Nrf2 antioxidant system. *Redox Biology*. 2022 Nov;57:102494.
117. Vaziri ND. Oxidative stress and its implications in chronic kidney disease [Internet]. Goldsmith DJ, editor. Vol. 1. Oxford University Press; 2015 [cited 2023 Sep 1]. Available from: <https://academic.oup.com/book/40212/chapter/343546131>
118. Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, et al. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013 Jan;28(1):202–12.
119. Jerotic D, Matic M, Suvakov S, Vucicevic K, Damjanovic T, Savic-Radojevic A, et al. Association of Nrf2, SOD2 and GPX1 Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients. *Toxins*. 2019 Jul 23;11(7):431.



120. Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lanken PN, et al. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J.* 2007 Jul;21(9):2237–46.
121. Cho HY, Marzec J, Kleeberger SR. Functional polymorphisms in Nrf2: implications for human disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 2015 Nov;88:362–72.
122. Shimoyama Y, Mitsuda Y, Hamajima N, Niwa T. Polymorphisms of Nrf2, an antioxidative gene, are associated with blood pressure in Japanese. *Nagoya J Med Sci.* 2014 Feb;76(1–2):113–20.
123. Wang J, Yu M, Chen J, Zhu L, Liu J, Xu J. Association of Nuclear Factor Erythroid-2-Related Actor 2 Gene Polymorphisms with Diabetic Nephropathy in Chinese Patients. *Int J Gen Med.* 2021;14:1231–7.
124. Reszka E, Jablonowski Z, Wieczorek E, Jablonska E, Krol MB, Gromadzinska J, et al. Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Oct;140(10):1723–31.
125. Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, et al. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol.* 2013 Jun;33(12):2402–12.
126. Hartikainen JM, Tengström M, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Pylkäs K, Kosma VM, et al. *KEAP1* Genetic Polymorphisms Associate with Breast Cancer Risk and Survival Outcomes. *Clinical Cancer Research.* 2015 Apr 1;21(7):1591–601.
127. Muscarella LA, Fazio VM. Keap1/Nrf2 impairing revised: are we missing the single nucleotide polymorphisms? *J Thorac Dis.* 2016 Dec;8(12):E1752–4.
128. Almeida M, Soares M, Ramalhinho AC, Moutinho JF, Breitenfeld L. Prognosis of hormone-dependent breast cancer seems to be influenced by KEAP1, NRF2 and GSTM1 genetic polymorphisms. *Mol Biol Rep.* 2019 Jun;46(3):3213–24.
129. Dhamodharan U, Ponjayanthi B, Sireesh D, Bhakkiyalakshmi E, Ramkumar KM. Association of single-nucleotide polymorphisms of the KEAP1 gene with the risk of various human diseases and its functional impact using in silico analysis. *Pharmacological Research.* 2018 Nov;137:205–18.
130. Chen S, Pan H, Chen Y, Lu L, He X, Chen H, et al. Association between genetic polymorphisms of NRF2, KEAP1, MAFF, MAFK and anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a nested case-control study. *Sci Rep.* 2019 Oct 4;9(1):14311.
131. Yoo NJ, Kim HR, Kim YR, An CH, Lee SH. Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers: KEAP1 mutation in cancers. *Histopathology.* 2012 May;60(6):943–52.
132. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Aznabaeva YG, Kochetova OV, Zagidullin NSh, Kzhyshkowska JG, et al. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Gene.* 2019 Apr;692:102–12.

133. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51–88.
134. 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 Nov 15;360(Pt 1):1–16.
135. Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat Rev Urol.* 2009 May;6(5):281–9.
136. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2005;401:1–8.
137. Bocedi A, Noce A, Fabrini R, Di Daniele N, Galli F, Ricci G. Erythrocyte Glutathione Transferase as a Biomarker in Kidney Health and Disease. In: Patel VB, Preedy VR, editors. *Biomarkers in Kidney Disease* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016 [cited 2023 Sep 5]. p. 577–98. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7699-9\\_44](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7699-9_44)
138. Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J, Awasthi S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015 Dec 15;289(3):361–70.
139. Bocedi A, Noce A, Marrone G, Noce G, Cattani G, Gambardella G, et al. Glutathione Transferase P1-1 an Enzyme Useful in Biomedicine and as Biomarker in Clinical Practice and in Environmental Pollution. *Nutrients.* 2019 Jul 27;11(8):1741.
140. Satoh K, Itoh K, Yamamoto M, Tanaka M, Hayakari M, Ookawa K, et al. Nrf2 transactivator-independent GSTP1-1 expression in ‘GSTP1-1 positive’ single cells inducible in female mouse liver by DEN: a preneoplastic character of possible initiated cells. *Carcinogenesis.* 2002 Mar;23(3):457–62.
141. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830(5):3267–88.
142. Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Mimic-Oka J, Simic T. Co-localization of GSTP1 and JNK in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Genet Mol Biol.* 2010 Jul;33(3):460–2.
143. Rui H liang, Wang Y yan, Cheng H, Chen Y pu. JNK-dependent AP-1 activation is required for aristolochic acid-induced TGF- $\beta$ 1 synthesis in human renal proximal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Jun 15;302(12):F1569-1575.
144. Lin CY, Fu RH, Chou RH, Chen JH, Wu CR, Chang SW, et al. Inhibition of JNK by pi class of glutathione S-transferase through PKA/CREB pathway is associated with carnosic acid protection against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis. *Food and Chemical Toxicology.* 2017 May;103:194–202.
145. Thévenin AF, Zony CL, Bahnson BJ, Colman RF. GST pi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2. *Protein Sci.* 2011 May;20(5):834–48.

146. Yang F, Ozols E, Ma FY, Leong KG, Tesch GH, Jiang X, et al. c-Jun Amino Terminal Kinase Signaling Promotes Aristolochic Acid-Induced Acute Kidney Injury. *Front Physiol.* 2021;12:599114.
147. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology.* 2000 Sep;61(3):154–66.
148. Krajka-Kuźniak V, Szaefer H, Baer-Dubowska W. Hepatic and extrahepatic expression of glutathione S-transferase isozymes in mice and its modulation by naturally occurring phenolic acids. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2008 Jan;25(1):27–32.
149. Cui J, Li G, Yin J, Li L, Tan Y, Wei H, et al. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). *Int J Oncol.* 2020 Apr;56(4):867–78.
150. Hauptstock V, Kuriakose S, Schmidt D, Düster R, Müller SC, von Ruecker A, et al. Glutathione-S-transferase pi 1(GSTP1) gene silencing in prostate cancer cells is reversed by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Sep 9;412(4):606–11.
151. Moyer AM, Salavaggione OE, Wu TY, Moon I, Eckloff BW, Hildebrandt MAT, et al. Glutathione s-transferase p1: gene sequence variation and functional genomic studies. *Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4791–801.
152. Mlakar SJ, Prezelj J, Marc J. Testing GSTP1 genotypes and haplotypes interactions in Slovenian post-/pre-menopausal women: Novel involvement of glutathione S-transferases in bone remodeling process. *Maturitas.* 2012 Feb;71(2):180–7.
153. Ginsberg G, Smolenski S, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic Polymorphism in Glutathione Transferases (GST): Population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009;12(5–6):389–439.
154. Sharma A, Pandey A, Sharma S, Chatterjee I, Mehrotra R, Sehgal A, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Delhi population and comparison with other global populations. *Meta Gene.* 2014 Dec;2:134–42.
155. Karaca S, Karaca M, Cesuroglu T, Erge S, Polimanti R. *GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1* genetic variability in Turkish and worldwide populations: GST Genes in Turkish Population. *Am J Hum Biol.* 2015 May 6;27(3):310–6.
156. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* 1997 Apr 11;272(15):10004–12.
157. Hur SE, Lee JY, Moon HS, Chung HW. Polymorphisms of the genes encoding the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* in Korean women: no association with endometriosis. *MHR: Basic science of reproductive medicine.* 2005 Jan 1;11(1):15–9.

158. Chen B, Bai Y, Sun M, Ni X, Yang Y, Yang Y, et al. Glutathione S-transferases T1 null genotype is associated with susceptibility to aristolochic acid nephropathy. *Int Urol Nephrol*. 2012 Feb;44(1):301–7.
159. Ma J, Zhu SL, Liu Y, Huang XY, Su DK. GSTP1 polymorphism predicts treatment outcome and toxicities for breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Sep 22;8(42):72939–49.
160. Elofey SGH, Shafik NF, Radwan NH, Mansour OM, Allam RM, Shouman S, et al. Relation between GSTP1 polymorphism and oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2020 Dec;32(1):38.
161. Klusek J, Nasierowska-Guttmejer A, Kowalik A, Wawrzycka I, Lewitowicz P, Chrapek M, et al. *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms and colorectal cancer risk in Polish nonsmokers. *Oncotarget*. 2018 Apr 20;9(30):21224–30.
162. Yu YP, Luo J. GPX3 (Glutathione peroxidase 3). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [Internet]. 2017 Aug [cited 2023 Sep 12];(Nascimento). Available from: <http://hdl.handle.net/2042/62498>
163. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1830(5):3289–303.
164. Miess H, Dankworth B, Gouw AM, Rosenfeldt M, Schmitz W, Jiang M, et al. The glutathione redox system is essential to prevent ferroptosis caused by impaired lipid metabolism in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2018 Oct;37(40):5435–50.
165. Chang C, Worley BL, Phaëton R, Hempel N. Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer. *Cancers*. 2020 Aug 6;12(8):2197.
166. Hong YA, Park CW. Catalytic Antioxidants in the Kidney. *Antioxidants*. 2021 Jan 18;10(1):130.
167. Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002 Jul 1;283(1):F20–8.
168. Olson GE, Whitin JC, Hill KE, Winfrey VP, Motley AK, Austin LM, et al. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 May;298(5):F1244-1253.
169. Pang P, Abbott M, Abdi M, Fucci QA, Chauhan N, Mistri M, et al. Pre-clinical model of severe glutathione peroxidase-3 deficiency and chronic kidney disease results in coronary artery thrombosis and depressed left ventricular function. *Nephrol Dial Transplant*. 2018 Jun 1;33(6):923–34.
170. Zou Z, Ren T, Li Y, Zeng Q, Wang X, Teng J, et al. The Association Between Serum Glutathione Peroxidase-3 Concentration and Risk of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery: A Nested Case-Control Study. *Am J Cardiol*. 2023 Oct 12;209:29–35.
171. 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 Apr;51(4):233–41.

172. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thévenin M, Jaudon MC, et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(6):845–53.
173. Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KDK, Robertson IK, et al. Relationship between antioxidant enzyme genotype and activity and kidney function: a case-control study. *Clin Nephrol*. 2012 Aug;78(2):135–44.
174. Chiang. Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. *Oncol Rep [Internet]*. 2010 May 27 [cited 2023 Mar 11];24(1). Available from: <http://www.spandidos-publications.com/or/24/1/141>
175. Hu Q, Chen J, Yang W, Xu M, Zhou J, Tan J, et al. GPX3 expression was down-regulated but positively correlated with poor outcome in human cancers. *Front Oncol*. 2023 Feb 9;13:990551.
176. Worley BL, Kim YS, Mardini J, Zaman R, Leon KE, Vallur PG, et al. GPx3 supports ovarian cancer progression by manipulating the extracellular redox environment. *Redox Biology*. 2019 Jul;25:101051.
177. Barrett CW, Ning W, Chen X, Smith JJ, Washington MK, Hill KE, et al. Tumor suppressor function of the plasma glutathione peroxidase gpx3 in colitis-associated carcinoma. *Cancer Res*. 2013 Feb 1;73(3):1245–55.
178. Oh IJ, Kim HE, Song SY, Na KJ, Kim KS, Kim YC, et al. Diagnostic value of serum glutathione peroxidase 3 levels in patients with lung cancer. *Thorac Cancer*. 2014 Sep;5(5):425–30.
179. Qi X, Ng KTP, Lian QZ, Liu XB, Li CX, Geng W, et al. Clinical significance and therapeutic value of glutathione peroxidase 3 (GPx3) in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Nov 30;5(22):11103–20.
180. Hu Q, Chen J, Yang W, Xu M, Zhou J, Tan J, et al. GPX3 expression was down-regulated but positively correlated with poor outcome in human cancers. *Front Oncol*. 2023 Feb 9;13:990551.
181. Shinichi Y, Hiroshi S, Yasushi T, Kaori A, Noboru K, Tetsuya M. The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32. *Gene*. 1994 Aug;145(2):293–7.
182. Nowak-Göttl U, Fiedler B, Hüge A, Niederstadt T, Thedieck S, Seehafer T, et al. Plasma glutathione peroxidase in pediatric stroke families. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011 Jan;9(1):33–8.
183. Vieira SM, Monteiro MB, Marques T, Luna AM, Fortes MA, Nery M, et al. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet*. 2011 Dec;12(1):129.
184. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Benke KS, Kenet G, Simioni P, et al. Promoter Polymorphisms in the Plasma Glutathione Peroxidase ( *GPx-3* ) Gene: A Novel Risk

- Factor for Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults and Children. *Stroke*. 2007 Jan;38(1):41–9.
185. Hargreaves MK, Liu J, Buchowski MS, Patel KA, Larson CO, Schlundt DG, et al. Plasma Selenium Biomarkers in Low Income Black and White Americans from the Southeastern United States. Ran Q, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jan 20;9(1):e84972.
186. Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1–2):13–28.
187. Baez-Duarte BG, Mendoza-Carrera F, García-Zapién A, Flores-Martínez SE, Sánchez-Corona J, Zamora-Ginez I, et al. Glutathione peroxidase 3 serum levels and GPX3 gene polymorphisms in subjects with metabolic syndrome. *Arch Med Res*. 2014 Jul;45(5):375–82.
188. Bumbasirevic U, Bojanic N, Pljesa-Ercegovac M, Zivkovic M, Djukic T, Zekovic M, et al. The Polymorphisms of Genes Encoding Catalytic Antioxidant Proteins Modulate the Susceptibility and Progression of Testicular Germ Cell Tumor. *Cancers*. 2022 Feb 20;14(4):1068.
189. Zhao H, Li J, Li X, Han C, Zhang Y, Zheng L, et al. Silencing GPX3 Expression Promotes Tumor Metastasis in Human Thyroid Cancer. *Curr Protein Pept Sci*. 2015;16(4):316–21.
190. Schwanstecher C, Schwanstecher M. ATP-dependent K<sup>+</sup> Channels. In: Offermanns S, Rosenthal W, editors. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [cited 2023 Oct 22]. p. 230–6. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-38918-7\\_24](http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-38918-7_24)
191. Burckhardt G, Koepsell H. Organic Anion and Cation Transporters in Renal Elimination of Drugs. In: Seldin and Giebisch's *The Kidney* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2023 Oct 22]. p. 2045–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120884889500760>
192. Luker GD, Flagg TP, Sha Q, Luker KE, Pica CM, Nichols CG, et al. MDR1 P-glycoprotein reduces influx of substrates without affecting membrane potential. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):49053–60.
193. Ahmed Juvale II, Abdul Hamid AA, Abd Halim KB, Che Has AT. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*. 2022 Jun;8(6):e09777.
194. Mercer SL, Coop A. Opioid analgesics and P-glycoprotein efflux transporters: a potential systems-level contribution to analgesic tolerance. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(9):1157–64.
195. Jiang B, Yan LJ, Wu Q. ABCB1 (C1236T) Polymorphism Affects P-Glycoprotein-Mediated Transport of Methotrexate, Doxorubicin, Actinomycin D, and Etoposide. *DNA Cell Biol*. 2019 May;38(5):485–90.

196. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008 Jul;38(7–8):802–32.
197. Staud F, Ceckova M, Micuda S, Pavek P. Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods Mol Biol*. 2010;596:199–222.
198. Peeters K, Wilmer MJ, Schoeber JP, Reijnders D, Heuvel LP van den, Masereeuw R, et al. Role of p-glycoprotein expression and function in cystinotic renal proximal tubular cells. *Pharmaceutics*. 2011 Oct 27;3(4):782–92.
199. Oza AM. Clinical development of P glycoprotein modulators in oncology. *Novartis Found Symp*. 2002;243:103–15; discussion 115-118, 180–5.
200. Miller DS, Bauer B, Hartz AMS. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2008 Jun;60(2):196–209.
201. Tramonti G, Romiti N, Norpoth M, Chieli E. P-glycoprotein in HK-2 proximal tubule cell line. *Ren Fail*. 2001;23(3–4):331–7.
202. Shchulkin AV, Abalenikhina YuV, Mylnikov PY, Chernykh IV, Yakusheva EN. Assessment of Malondialdehyde Belonging to Modulators and Substrates of the P-Glycoprotein Transporter Protein. *Dokl Biochem Biophys*. 2022 Dec;507(1):247–55.
203. Abalenikhina YV, Shchulkin AV, Mylnikov PY, Rokunov ED, Yakusheva EN. Mechanisms of P-Glycoprotein Regulation Under Exogenous and Endogenous Oxidative Stress In Vitro. *Acta Naturae*. 2022;14(3):69–78.
204. Bruhn O, Cascorbi I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014 Oct;10(10):1337–54.
205. Liu X. ABC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1141:13–100.
206. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1794(5):860–71.
207. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*. 2001 Apr;11(3):217–21.
208. Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(9):553–76.
209. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*. 2002 Jan 5;359(9300):30–6.
210. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schäffeler E, Fischer J, Schwab M, et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-

- glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics*. 2001 Jun;11(4):293–8.
211. Zhang W xia, Chen B, Zhang W, Chen N, Yu Z cheng, Cai W min. Effect of MDR1 gene polymorphism on progression of end-stage renal disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 Apr;28(4):579–83.
212. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263–5.
213. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1;22(15):1928–9.
214. Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Buchanan A, Stengård J, et al. Haplotype Structure and Population Genetic Inferences from Nucleotide-Sequence Variation in Human Lipoprotein Lipase. *The American Journal of Human Genetics*. 1998 Aug;63(2):595–612.
215. Chan W, Pavlović NM, Li W, Chan CK, Liu J, Deng K, et al. Quantitation of Aristolochic Acids in Corn, Wheat Grain, and Soil Samples Collected in Serbia: Identifying a Novel Exposure Pathway in the Etiology of Balkan Endemic Nephropathy. *J Agric Food Chem*. 2016 Jul 27;64(29):5928–34.
216. Upadhyay R, Batuman V. Aristolochic acid I induces proximal tubule injury through ROS / HMGB1 /mt DNA mediated activation of TLRs. *J Cellular Molecular Medi*. 2022 Aug;26(15):4277–91.
217. Baudoux T, Jadot I, Declèves AE, Antoine MH, Colet JM, Botton O, et al. Experimental Aristolochic Acid Nephropathy: A Relevant Model to Study AKI-to-CKD Transition. *Front Med*. 2022 May 4;9:822870.
218. Urate S, Wakui H, Azushima K, Yamaji T, Suzuki T, Abe E, et al. Aristolochic Acid Induces Renal Fibrosis and Senescence in Mice. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 18;22(22):12432.
219. Li XW, Yokota S, Wang D, Wang X, Shoyama Y, Cai SQ. Localization of aristolochic acid in mouse kidney tissues by immunohistochemistry using an anti-AA-I and AA-II monoclonal antibody. *Am J Chin Med*. 2014;42(6):1453–69.
220. Chen T. Genotoxicity of aristolochic acid: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* [Internet]. 2020 Jul 14 [cited 2023 Oct 21];15(4). Available from: <https://www.jfda-online.com/journal/vol15/iss4/10>
221. Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M, van Ypersele de Strihou C, Cosyns JP. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res*. 1996 May 1;56(9):2025–8.
222. Zhao YY, Wang HL, Cheng XL, Wei F, Bai X, Lin RC, et al. Metabolomics analysis reveals the association between lipid abnormalities and oxidative stress, inflammation, fibrosis and Nrf2 dysfunction in aristolochic acid-induced nephropathy. *Sci Rep*. 2015 Aug 7;5(1):12936.



223. Wong TF, Yoshinaga K, Monma Y, Ito K, Niikura H, Nagase S, et al. Association of keap1 and nrf2 genetic mutations and polymorphisms with endometrioid endometrial adenocarcinoma survival. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Nov;21(8):1428–35.
224. Aranda-Rivera AK, Cruz-Gregorio A, Pedraza-Chaverri J, Scholze A. Nrf2 Activation in Chronic Kidney Disease: Promises and Pitfalls. *Antioxidants*. 2022 Jun 3;11(6):1112.
225. Agrawal S, Tripathi G, Khan F, Sharma R, Baburaj VP. Relationship between GSTs gene polymorphism and susceptibility to end stage renal disease among North Indians. *Ren Fail*. 2007;29(8):947–53.
226. Klusek J, Głuszek S, Klusek J. GST gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer development. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18(4):219–21.
227. Markovic-Lipkovski J, Tulic C, Vuksanovic A, Dragicevic D, Dokic M, Tatic S, et al. Morphology of Balkan endemic nephropathy: current state. *Clin Nephrol*. 2012 Jan;77(1):25–31.
228. Cui YJ, Cheng X, Weaver YM, Klaassen CD. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. *Drug Metab Dispos*. 2009 Jan;37(1):203–10.
229. van Kalken CK, Broxterman HJ, Pinedo HM, Feller N, Dekker H, Lankelma J, et al. Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Br J Cancer*. 1993 Feb;67(2):284–9.
230. Uhr M, Holsboer F, Müller MB. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mdr1a and mdr1b P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol*. 2002 Sep;14(9):753–9.
231. Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5;267(34):24248–52.
232. Kim WY, Benet LZ. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharm Res*. 2004 Jul;21(7):1284–93.
233. Nirgude S, Choudhary B. Insights into the role of GPX3, a highly efficient plasma antioxidant, in cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2021 Feb;184:114365.
234. Falck E, Karlsson S, Carlsson J, Helenius G, Karlsson M, Klinga-Levan K. Loss of glutathione peroxidase 3 expression is correlated with epigenetic mechanisms in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Cell Int*. 2010 Nov 24;10:46.
235. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):315–22.
236. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):580–5.

237. Song Y, Jin D, Ou N, Luo Z, Chen G, Chen J, et al. Gene Expression Profiles Identified Novel Urine Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of High-Grade Bladder Urothelial Carcinoma. *Front Oncol.* 2020;10:394.
238. Wang Y, Fu G, Chen X, Xia Z, Qi M, Du X, et al. Glutathione Peroxidase 3 (GPX3) Expression Predicts the Prognosis of Numerous Malignant Tumors: A Pan-Cancer Analysis [Internet]. In Review; 2021 Sep [cited 2023 Apr 29]. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-845660/v1>
239. Badri S, Vahdat S, Pourfarzam M, Assarzadeh S, Seirafian S, Ataei S. Potential Benefits of Selenium Supplementation in Patients with Kidney Disease. *J Res Pharm Pract.* 2021;10(4):149–58.

## LISTA SKRAĆENICA

AA	Aristolochic acid, <i>engl.</i>
AA-I	Aristolochic acid I, <i>engl.</i>
AA-Ia	8-hidroksiaristolohna kiselina
AA-II	Aristolochic acid II, <i>engl.</i>
AAN	Aristolochic acid nephropathy, <i>engl.</i>
ABC	ATP-binding cassette transporter, <i>engl.</i>
ABC	ATP-binding cassette transporters, <i>engl.</i>
AL-NOH	N-hidroksi-aristolaktam
AL-NOSO3H	Aristolaktam-N-sulfat
ARE	Antioxidant response elements, <i>engl.</i>
BEN	Balkanska endemska nefropatija
CHN	Chinese herb nephropathy, <i>engl.</i>
CPR	NADPH-CYP reduktaza
CYP	Citohrom P
dA-AA I	7- (deoksiadenozin-N6-il) aristolaktam I
dG-AA I	7-(deoksigvanozin-N2-il) aristolaktam I
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	Etilen diamin tetrasirćetna kiselina
G6PD	Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
GCLC	Glutamat-cistein ligaza
GPX 3	Glutation peroksidaza 3

GPX2	Glutation peroksidaza 2
GSH	Glutation
GSR 1	Glutation reduktaza
GST	Glutation transferaza
GSTM1	Glutation transefaza M1
GSTP 1	Glutation transferaza P1
GTE <sub>x</sub>	Genotype-Tissue Expression, <i>engl.</i>
IARC	International agency for Research on Cancer, <i>engl.</i>
IDH1	Izocitrat dehidrogenaza
JNK	C-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase, <i>engl.</i>
KEAP 1	Kelch-like ECH-associated protein 1, <i>engl.</i>
LD	Linkage disequilibrium, <i>engl.</i>
MAP kinaza	Mitogen-activated protein kinase, <i>engl.</i>
MDR 1	Multidrug Resistance 1, <i>engl.</i>
m-RNA	Messenger RNA, <i>engl.</i>
NAT	N-acetiltransferaza
NBD	ATP-vezujući domen ABC transportera
NOX 2	NADH oksidaza
NQO1	NADPH-kinon oksidoreduktaza 1
Nrf 2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, <i>engl.</i>
OAT	Organic anion transporter, <i>engl.</i>
OR	Odds ratio, <i>engl.</i>

PAH	Policiklični aromatični ugljovodonici
PCR	Polymerase chain reaction, <i>engl</i>
PCR-CTTP	Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers, <i>engl</i>
PDG	6-fosfoglukonat dehidrogenaza
P-gp	P-glikoprotein
RNS	Reactive nitrogen species, <i>engl.</i>
ROS	Reactive oxygen species, <i>engl.</i>
RT-PCR	Real- Time Polymerase chain reaction, <i>engl</i>
SD	Standardna devijacija
sMaf	Small Maf, <i>engl.</i>
SNP	Single nucleotide polymorphism, <i>engl.</i>
SRXN1	Sulforedoksin
SULT	Sulfotransferaza
TCGA	The Cancer Genome Atlas, <i>engl.</i>
TMD	Transmembranski domen
TXN	Tioredoksin
TXNRD1	Tioredoksin reduktaza
LCAT	Lecitin-holesterol aril transferaza

## BIOGRAFIJA

Žana (Goran) Radić Savić rođena 11.07.1992. u Banjoj Luci. Osnovnu školu završila u Kotor Varošu. Srednju Medicinsku školu završila u Banjoj Luci 2011. godine. Iste godine upisala Medicinski fakultet u Banjoj Luci, a završila 2017. godine sa prosječnom ocjenom 9,17. Od marta 2018. godine izabrana u zvanje asistenta na predmetu Medicinska biohemija, a 2022. u zvanje višeg asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju.

Od 2019. godine student trećeg ciklusa Biomedicinskih nauka na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci.

Do sada objavila nekoliko naučnih radova iz oblasti molekularne medicine i biohemije. Član Udruženja doktora Republike Srpske i Udruženja medicinskih biohemičara RS.

Udata, majka jedne kćerke.

Изјава 1

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем  
да је докторска дисертација

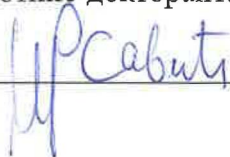
Наслов рада : "Испитивање повезаности полиморфизама гена за регулаторне и каталитичке антиоксидатне протеине са ризиком за настанак Балканске ендемске нефропатије"

Наслов рада на енглеском језику : "The association of regulatory and catalytic antioxidant gene polymorphisms with the risk of Balkan endemic nephropathy"

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

У Бањој Луци, дана 20.01.2024. године

Потпис докторанта

  
\_\_\_\_\_

## Изјава 2

### Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом Испитивање повезаности полиморфизама гена за регулаторне и каталитичке антиоксидатне протеине са ризиком за настанак Балканске ендемске нефропатије која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

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


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

- Ауторство
- Ауторство – некомерцијално
- Ауторство – некомерцијално – без прераде
- Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
- Ауторство – без прераде
- Ауторство – дијелити под истим условима

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

У Бањој Луци, дана 20.01.2024. године

Потпис докторанта

  
\_\_\_\_\_



## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ КРЕАТИВНЕ ЗАЈЕДНИЦЕ

### **Ауторство (CC BY)**

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

### **Ауторство - некомерцијално (CC BY-NC)**

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

### **Ауторство - некомерцијално - без прерада (CC BY-NC-ND)**

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

### **Ауторство - некомерцијално - дијелити под истим условима (CC BY-NC-SA)**

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

### **Ауторство - без прерада (CC BY-ND)**

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

### **Ауторство - дијелити под истим условима (CC BY-SA)**

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

**Напомена:** Овај текст није саставни дио изјаве аутора.

Више информација на линку: <http://creativecommons.org.rs/>

### Изјава 3

#### Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора: Жана Радић Савић

Наслов рада : Испитивање повезаности полиморфизама гена за регулаторне и каталитичке антиоксидантне протеине са ризиком за настанак Балканске ендемске нефропатије

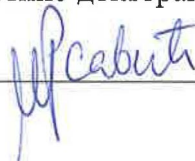
Ментор: проф. др Татјана Симић, дописни члан САНУ

Коментор: проф. др Боса Мирјанић-Азарић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, дана 20.01.2024. године

Потпис докторанда



---