

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Veljko B. Šantrić

**POVEZANOST RIZIKA I PROGNOZE BOLESNIKA SA
KARCINOMOM PROSTATE LEČENIH
RADIKALNOM PROSTATEKTOMIJOM I
ZRAČENJEM SA POLIMORFIZMIMA GENA ZA
GLUTATION TRANSFERAZE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Veljko B. Šantrić

**RISK AND PROGNOSIS OF PROSTATE CANCER
PATIENTS TREATED WITH RADICAL
PROSTATECTOMY AND RADIATION IN RELATION
TO GLUTATHIONE TRANSFERASE
POLYMORPHISMS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTOR:

Prof. dr Dejan Dragičević, redovni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu

KOMENTOR:

Prof. dr Ana Savić-Radojević, redovni profesor Medicinskog
fakulteta, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Miodrag Aćimović , redovni profesor Medicinskog
fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Marina Nikitović, vanredni profesor Medicinskog
fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Marija Matić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu
4. Doc. dr Ivan Vuković, docent Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu
5. Prof. dr Ivana Stojanović, redovni profesor Medicinskog
fakulteta, Univerzitet u Nišu

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Dejanu Dragičeviću primarno na ličnoj, moralnoj i stručnoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije, zatim svom komentoru prof. dr Ani Savić-Radojević na strpljenju, usmeravanju i pomoći tokom samog rada i oblikovanja ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Tatjani Simić na ideji ovog doktorata, kao i na prilici da učestvujem u istraživanju na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju.

Zahvaljujem se kolektivu Klinike za urologiju na pomoći tokom prikupljanja materijala za ovo istraživanje, kao i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu teze, posebno kolegama dr Branku Stankoviću i dr Nebojši Prijoviću, dr Milici Djokić sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, kao i docentkinji Sonji Šuvakov sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici koja me podržavala, i verovala u mene.

REZIME

POVEZANOST RIZIKA I PROGNOZE BOLESNIKA SA KARCINOMOM PROSTATE LEČENIH RADIKALNOM PROSTATEKTOMIJOM I ZRAČENJEM SA POLIMORFIZMIMA GENA ZA GLUTATION TRANSFERAZE

Cilj: Citosolna familija enzima glutation transferaza (GST) ostvaruje plejotropnu ulogu u nastanku, progresiji i hemorezistenciji različitih solidnih tumora. Može se pretpostaviti da bi polimorfizmi *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTO1* i *GSTO2* gena mogli doprineti nastanku i progresiji karcinoma prostate. Cilj ove studije je bio razjašnjavanje pojedinačnog i kombinovanog efekta šest GST polimorfizama, uključujući *GSTM1* i *GSTT1* delecione, kao i *GSTP1* (rs1695 i rs1138272), *GSTO1* (rs4925) i *GSTO2* (rs156697) polimorfizme u podložnosti za nastanak karcinoma prostate, uključujući i njihov modifikujući efekat na ukupno preživljavanje ovih bolesnika.

Materijal i metode: Genotipizacija je izvedena kod 237 bolesnika sa karcinomom prostate i 236 kontrola uparenih po godinama korišćenjem multipleks PCR za delecione GST polimorfizme i kvantitativni PCR za polimorfizme izmene jednog nukleotida. Efekat GST polimorfizama u proceni predikcije mortaliteta je analiziran Koks regresionim modelom, dok je Kaplan-Majer analiza korišćena za utvrđivanje razlika u preživljavanju.

Rezultati: Naši rezultati su pokazali da su homozigotni nosioci oba varijantna *GSTO1**A/A i *GSTO2**G/G genotipa u povećanom riziku za nastanak karcinoma prostate. Analizom haplotipa je potvrđeno da je H2 haplotip (*GSTO1**A/*GSTO2**G) visoko rizičan. Pored toga, pokazano je da su nosioci bar jednog od varijantnih *GSTP1**Val (rs1138272) ili *GSTP1**Val (rs1695) alela u povećanom riziku za razvoj ovog karcinoma u poređenju sa nosiocima

referentnih alela (OR = 4,93; 95%CI: 2,89-8,40; $p < 0,001$ odnosno OR = 1,8; 95%CI: 1,19-2,73; $p=0,006$). Pokazani rizik je bio izraženiji kod nosilaca *GSTP1**C haplotipa (*GSTP1**Val rs1695/*GSTP1**Val rs1138272) (OR = 5,46; 95%CI=2,56-11,65; $p<0,001$). Regresionom analizom kumulativnog efekta rizičnih genotipova (*GSTM1*-aktivni, *GSTT1*-nulti, *GSTP1**Val rs1695 i *GSTP1**Val rs1138272) dobijen je povećani rizik za nastanak karcinoma prostate, koji je bio 3,65 puta povećan kod nosilaca dva rizična genotipa (95%CI=1,55-8,61; $p=0,003$), do oko 12 puta kod nosilaca sva četiri rizična genotipa (95%CI=3,05-44,93; $p<0,001$), što upućuje na potencijalni značaj ovih genetskih varijanti u riziku za nastanak karcinoma prostate. Prognostički značaj polimorfizama *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTO1* i *GSTO2* gena nije pronađen u našoj kohorti bolesnika sa karcinomom prostate. Međutim, kraće preživljavanje je dobijeno kod nosilaca *GSTP1**T/T (rs1138272) genotipa u poređenju sa nosiocima bar jednog referentnog alela. Pored toga, prisustvo *GSTP1**T/T genotipa je predstavljalo četiri puta veći rizik za mortalitet kod ovih bolesnika.

Zaključak: Efekti brojnih polimorfnih gena za glutation transferaze, posebno *GSTP1* i *GSTO* polimorfizama upućuju na značajnu ulogu interakcija gena u podložnosti za nastanak karcinoma prostate. Ova studija je takođe ukazala na značajnu prognostičku ulogu *GSTP1* rs1138272 polimorfizma.

Ključne reči: karcinom prostate, GST, polimorfizam, haplotip, rizik, preživljavanje

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Rekonstruktivna hirurgija

UDK broj: 616.65-006.6-08-037(043.3)

ABSTRACT

RISK AND PROGNOSIS OF PROSTATE CANCER PATIENTS TREATED WITH RADICAL PROSTATECTOMY AND RADIATION IN RELATION TO GLUTATHIONE TRANSFERASE POLYMORPHISMS

Purpose: Considering pleiotropic roles of cytosolic glutathione transferase (GST) family of enzymes in development, progression and chemoresistance of various solid tumors, we hypothesized that polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTO1* and *GSTO2* genes might contribute to prostate cancer (PC) development and progression. The aim of the study was to elucidate the independent and combined effect of six different GST polymorphisms, including *GSTM1* and *GSTT1*-deletion polymorphisms, as well as, *GSTP1* (rs1695 and rs1138272), *GSTO1* (rs4925) and *GSTO2* (rs156697) polymorphisms in susceptibility to prostate cancer, along with their modifying effect on the overall survival in these patients.

Methods: Genotyping was performed in 237 PC cases and 236 age-matched controls by multiplex PCR for deletion GST polymorphisms and quantitative PCR for single nucleotide polymorphisms (SNPs). The effect of GST polymorphisms on predicting mortality was analyzed by the Cox proportional hazard models, while Kaplan-Meier analysis was performed to assess differences in survival.

Results: We found that homozygous carriers of both *GSTO1**A/A and *GSTO2**G/G variant genotypes are at increased PC risk. This was further confirmed by haplotype analysis, showing H2 haplotype (*GSTO1**A/*GSTO2**G) as a high-risk combination. Moreover, carriers of either *GSTP1**Val (rs1138272) or *GSTP1**Val (rs1695) variant alleles had increased PC risk in comparison to those with both referent alleles (OR = 4.93, 95%CI: 2.89-8.40, $p < 0.001$ and OR = 1.8, 95%CI: 1.19-2.73, $p=0.006$, respectively). This risk was even more potentiated in

carriers of *GSTP1**C haplotype (*GSTP1**Val rs1695/*GSTP1**Val rs1138272) (OR = 5.46, 95%CI = 2.56-11.65, $p < 0.001$). A regression analysis on the quantity of risk-associated alleles per individual (*GSTM1**active, *GSTT1**null, *GSTP1**Val rs1695 and *GSTP1**Val rs1138272) exhibited a significant increase in PC risk, from 3.65-fold in carriers of two risk alleles (95%CI = 1.55-8.61, $p = 0.003$) to an approximately 12-fold increase in carriers of all four risk alleles (95%CI=3.05-44.93, $p < 0.001$), signifying a probable role of those variants in PC susceptibility. Prognostic relevance of polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTO1* and *GSTO2* genes was not found in our cohort of PC patients. However, shorter survival was found in carriers of *GSTP1**T/T (rs1138272) genotype compared to those carrying at least one referent allele. In addition, presence of *GSTP1**T/T genotype independently predicted four-fold higher risk of overall mortality among PC patients.

Conclusions: The effect of multiple glutathione transferase (GST) polymorphic genes, especially *GSTP1* and *GSTO* emphasizes the important role of gene-gene interactions in susceptibility to prostate cancer development. This study also revealed substantial prognostic role of *GSTP1* rs1138272 polymorphism in this cancer.

Key words: prostate cancer, GST, polymorphism, haplotype, risk, survival

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Reconstructive surgery

UDK number: **616.65-006.6-08-037(043.3)**

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA PROSTATE.....	1
1.2 ETIOLOGIJA KARCINOMA PROSTATE.....	2
1.2.1 Androgeni	2
1.2.2 Starost	2
1.2.3 Pušenje	3
1.2.4 Alkohol	3
1.2.5 Gojaznost	3
1.2.6 Seksualno prenosive bolesti.....	4
1.2.7 Vazektomija	5
1.2.8 Genetska predispozicija	5
1.3 GLUTATION TRANSFERAZE	8
1.3.1 Značaj polimorfizama Glutation transferaza u osetljivosti za nastanak malignih bolesti	10
1.4 DIJAGNOSTIKA KARCINOMA PROSTATE.....	14
1.4.1 Prostata-specifični antigen.....	15
1.4.2 Rektalni pregled prostate	16
1.4.3 Biopsija prostate.....	17
1.5 TERAPIJSKI PRISTUPI U LEČENJU LOKALIZOVANOG KARCINOMA PROSTATE.....	17
1.5.1 Hirurško lečenje- radikalna prostatektomija.....	15
1.5.2 Radioterapija	19
1.5.3 PSA relaps.....	20
1.5.4 Glutation transferaze u karcinogenezi karcinoma prostate	22

2. CILJEVI	24
3. MATERIJAL I METODE	25
3.1 SELEKCIJA ISPITANIKA	25
3.2 IZOLACIJA DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE (DNK)	29
3.3 ODREĐIVANJE GSTM1 I GSTT1 DELECIONIH POLIMORFIZAMA.....	29
3.4 ODREĐIVANJE GSTP1 RS1695 I RS1138272 POLIMORFIZAMA	31
3.5 ODREĐIVANJE GSTO1 I GSTO2 POLIMORFIZAMA	32
3.6 STATISTIČKA ANALIZA	32
4. REZULTATI.....	34
4.1 ZNAČAJ POLIMORFIZAMA GLUTATION TRANSFERAZA	
U RIZIKU ZA NASTANAK KARCINOMA PROSTATE.....	34
4.1.1 Demografske i kliničke karakteristike bolesnika	
sa karcinomom prostate	34
4.1.2 Povezanost GSTM1 i GSTT1 delecionih polimorfizama	
sa rizikom za karcinom prostate	36
4.1.3 Povezanost GSTP1 rs1695 i rs 1138272 polimorfizama	
sa rizikom za nastanak karcinoma prostate.....	37
4.1.4 Povezanost GSTP1 haplotipa sa rizikom	
za nastanak carcinoma prostate.....	38
4.1.5 Kumulativni efekat GST polimorfizama u proceni rizika	
za nastanak karcinoma prostate	39
4.1.6 Povezanost polimorfizama GSTO klase sa rizikom	
za nastanak karcinoma prostate	40
4.1.7 Kumulativni efekat GST polimorfizama kod bolesnika stratifikovanih	
prema riziku za progresiju	42

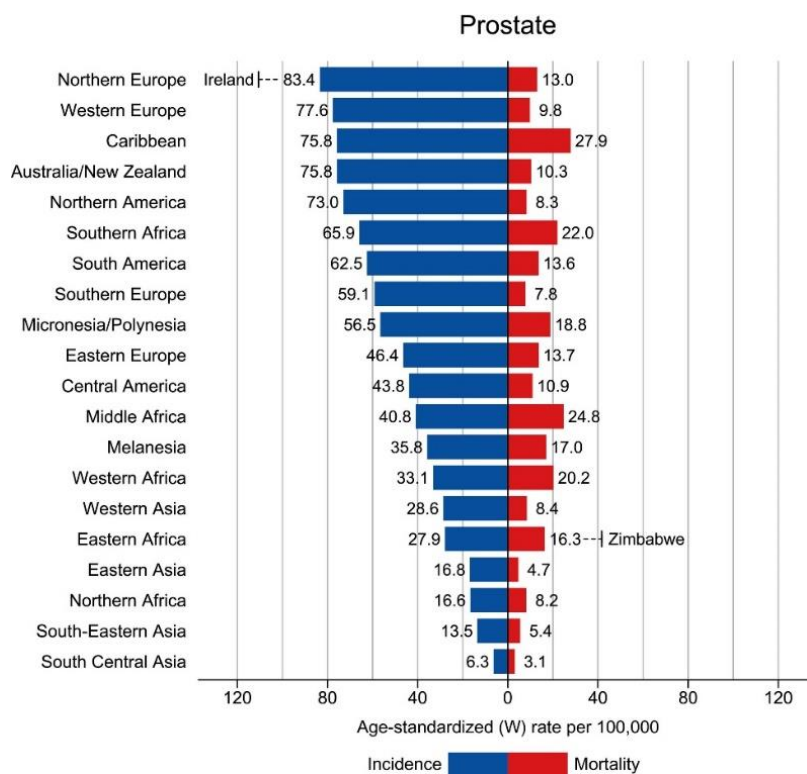
4.2 ZNAČAJ POLIMORFIZAMA GENA ZA GST U PROGNOZI	
PACIJENATA SA KARCINOMOM PROSTATE.....	43
4.2.1 Efekti GST polimorfizama na ukupno preživljavanje	
kod bolesnika sa karcinomom prostate	46
4.2.2 Efekti GST polimorfizama na rizik za ukupno preživljavanje	52
5. DISKUSIJA	54
6. ZAKLJUČCI.....	67
7. LITERATURA	69

1. UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma prostate

Karcinom prostate predstavlja drugi po učestalosti dijagnostikovani malignitet kod muškaraca u svetu, a tokom 2020. godine broj novootkrivenih tumora prostate je bio preko milion (incidenca- 1 414 259) (Slika 1). U Evropi je na prvom mestu, sa ukupnom učestalošću- 473 344, dok je u Republici Srbiji prema poslednjim podacima iz 2020. broj novoobolelih od tumora prostate iznosio 3183 (Sung H. i sar, 2021).

Tumori prostate i pored velike učestalosti, ne predstavljaju grupu tumora koja dovodi do najvećeg broja smrtnih ishoda; po broju umrlih godišnje nalaze se iza tumora kolona, kao i iza mnogo ređih tumora pankreasa (Ferlay J. i sar, 2018). Preko 90% pacijenata sa karcinomom prostate se dijagnostikuje u ranom stadijumu. Zbog spore progresije karcinoma prostate, najveći broj smrtnih ishoda, u okviru 15 godina od inicijalne dijagnoze je uzrokovan drugim uzrocima, a ne kao posledica primarnog tumora (Popiolek M. i sar, 2013).



Slika 1. Standardizovana stopa incidencije i mortaliteta za karcinom prostate u svetu u 2020. godini (slika preuzeta iz *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN*)

Tumori prostate su histološki gotovo potpuno adenokarcinomi, nastali iz epitelnih ćelija prostate, u preko 90% slučajeva su acinarni, dok su duktalna komponenta prisutna u oko 5% (2,6-6,3%), a čisto duktalni su još rjeđi slučajevi (1,3%) (Zhou M. 2018; Baig FA. i sar, 2015). Lokalizacija karcinoma je prisutna čak do 80% u perifernoj zoni prostate (Guzman JA. i sar, 2019).

1.2. Etiologija karcinoma prostate

Iako sam inicijalni faktor koji dovodi do nastanka karcinoma prostate nije sasvim jasan, zna se da udruženo u nastanku deluju i genetski faktori, kao i faktori iz spoljašnje sredine.

1.2.1. Androgeni

Poznato je da su androgeni neophodni za rast i razvoj prostate, pa je i izloženost androgenima neophodan korak u nastanku samog karcinoma. Grupa istraživača je 2008. godine analizom preko 18 studija sa više od 3000 pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom prostate je pokazala da ne postoji direktna veza nivoa testosterona, kao i dihidrotestosterona (DHT), dehidroepiandrosterona (DHEA), estradiola, androstenediona sa rizikom za nastanak karcinoma prostate (Roddam AW. i sar, 2008). S druge strane, kada u prostati već postoji maligna alteracija, androgeni stimulišu aktivnost i deobu malignih ćelija (Pejčić T. i sar, 2014).

1.2.2. Starost

Godine su najbitniji predisponirajući faktor za nastanak karcinoma prostate, pri čemu se ovaj karcinom retko pojavljuje kod muškaraca mlađih od 50 godina (Pejčić T. i sar, 2014). Prosečna starost dijagnostikovanja je 68 godine, pri čemu je 63% dijagnostikovanih karcinoma prostate iznad 65 godina (Ries LAG. 2018) Kod crnaca i kod muškaraca koji imaju bliskog srodnika obolelog od karcinoma prostate, rizik raste posle 40. godine (Perdana NR. i sar, 2016).

1.2.3. Pušenje

Pušenje može predstavljati jedan od značajnih faktora rizika, primarno zbog prisustva kadmijuma u duvanskom dimu, koji povećava nivo androgena u cirkulaciji, dovodeći do oksidativnog stresa, posledično i do povećavanja rizika za nastanak karcinoma prostate (Bostwick DG. i sar, 2004; Huncharek M. i sar, 2010; Nock NL. i sar, 2006). Prema rezultatima meta analize iz 2014. godine pušenje povećava rizik od umiranja od karcinoma prostate (Islami F. i sar, 2014).

1.2.4. Alkohol

Povezanost upotrebe alkohola i karcinoma prostate nije jasno utvrđena, prema studijama iz 2005. godine ne postoji povezanost upotrebe alkohola i pojave karcinoma prostate (Schoonen WM. i sar, 2005), dok je u ispitivanjima iz 2016. godine pokazano da povećana upotreba, ali i potpuna apstinencija od unosa alkohola povećavaju rizik ali i specifični mortalitet od karcinoma prostate, pri čemu je ovaj odnos dozna zavisian (Dickerman BA. i sar, 2016; Zhao J. i sar, 2016).

1.2.5. Gojaznost

Gojaznost, definisana kroz povišen indeks telesne mase (eng. *body mass index*, *BMI*) predstavlja faktor rizika u nastanku karcinoma prostate. Višak masnog tkiva pored toga što predstavlja energetska rezervoar, ujedno je i značajan endokrini organ koji proizvodi citokine i supstance slične njima (faktor nekroze tumora, TNF α , transformišući faktor rasta, TGF β i dr.) kao značajne markere oksidativnog stresa (Furukawa S. i sar, 2004). U gojaznosti, poremećaj koncentracije hormona u cirkulaciji može imati uticaj i na onkogenezu (Mcbride RB, 2012). U studiji koja je ispitala povezanost komponenti metaboličkog sindroma i rizika za nastanak

karcinoma prostate, uočeno je da je obim struka iznad 102 cm povezan sa značajno povišenim rizikom za nastanak ovog karcinoma. Korekcija ishrane i povećana fizička aktivnost, kao modifikacija životnih navika, dokazano dovode do smanjenja rizika za nastanak karcinoma prostate (Esposito K. i sar, 2013).

Brojni sastojci hrane, prema rezultatima više studija, dovode se u vezu sa nastankom karcinoma. Najjasnija potvrda toga je pokazana kroz starije studije koje su ispitivale incidencu karcinoma prostate u prvoj generaciji migranata iz Kine i Japana u SAD (Muir CS. i sar, 1991) i pokazale rast učestalosti, iako stanovništvo Azije ima najmanju učestalost sa npr. 1,6 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje u Kini (Parkin DM. i sar, 2005). Kao mogući faktori rizika za karcinom prostate koji su povezani sa ishranom navode se povišen unos proteina iz mlečnih proizvoda i pržene hrane, dok je interesantno da npr. veza karcinoma prostate sa vitaminom D ima "U" oblik, gde su niska i visoka koncentracija vitamina D povezane sa povišenim rizikom (Key TJ. 2014; Lippi G. i sar, 2015; Nyame YA. i sar, 2016). Nasuprot njima, protektivnim se pokazao unos likopena, soje i sojinih produkata, kao i mahunarki, koje su bogat izvor fitoestrogena. (Chen P. i sar, 2015; Zhang M. i sar, 2016).

1.2.6. Seksualno prenosive bolesti

Brojne epidemiološke studije ukazale su na povezanost između polno prenosivih bolesti i nastanka karcinoma prostate. U tom smislu ispitivan je i stepen seksualne aktivnosti, i tom prilikom izloženost prostate infektivnim agensima, u cilju utvrđivanja povećanog rizika od nastanka karcinoma prostate. Tako je uočena i povećana učestalost karcinoma prostate kod muškaraca sa istorijom gonokokne, HPV ili druge polno prenosive infekcije (Moustafa AE. 2008; Taylor ML. i sar, 2013; Fernandez L. i sar, 2005).

1.2.7. Vazektomija

Vazektomija, kao čest oblik kontracepcije kod muškaraca u Sjedinjenim Američkim Državama, identifikovana je u ranijim studijama kao potencijalni faktor rizika za nastanak karcinoma prostate, ali rezultati skorašnje meta analize opovrgavaju njen značaj u tom kontekstu (Holt SK. i sar, 2008; Bhindi B. i sar, 2017). Sam mehanizam delovanja u tim istraživanjima nije razjašnjen, u tom smislu ispitivan je značaj prisustva antispermatskih antitela, kao i uticaj smanjenog nivoa androgena. Ipak studije iz 2002. godine su pokazale linearni trend rasta učestalosti karcinoma za 10% na svakih 10 godina nakon vazektomije (Dennis LK. i sar, 2002).

1.2.8. Genetska predispozicija

Na genetsku predispoziciju za nastanak karcinoma prostate upućuje povezanost između povišene incidence karcinoma prostate i pozitivne porodične anamneze i etničke, odnosno rasne pripadnosti (Jansson KF. i sar, 2012; Hemminki K. 2012). Posmatrajući geografske varijacije u incidenci karcinoma prostate, uočeno je da je incidenca najniža na Dalekom istoku, dok je najviša u skandinavskim zemljama (Jayadevappa R. i sar, 2011; Ferlay J. i sar, 2015). U odnosu na rasnu pripadnost, pokazano je da je incidenca najniža kod muškaraca žute rase, dok su najviša incidenca i mortalitet prisutni kod Afro-Amerikanaca, što ukazuje na urođenu genetsku predispoziciju za nastanak karcinoma prostate udruženog sa specifičnim rasnim grupama (Wu I. i sar, 2012; Powell IJ. i sar, 2013).

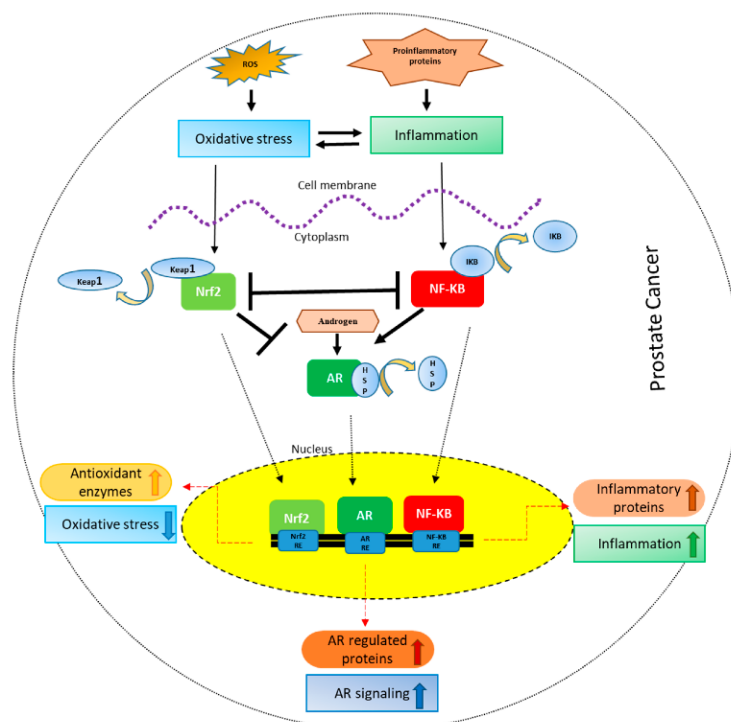
U cilju istraživanja, prema načinu nastajanja karcinom prostate može biti sporadični, familijarni i hereditarni, od čega je u najvećem procentu u pitanju sporadično nastajanje tumora (85% slučajeva) (Carter BS. i sar, 1992). Smatra se da samo mali broj pacijenata obolelih od karcinoma prostate ima pravo hereditarno oboljenje (oko 9%), što bi se definisalo kao postojanje najmanje tri obolela srodnika ili najmanje dva srodnika sa ranim početkom bolesti

(ispod 55 godina). Hereditarni oblik bolesti povezan je sa ranijim nastankom karcinoma prostate, ali bez uticaja na klinički tok i agresivnost bolesti (Hemminki K. 2012).

Genomske studije su pokazale da postoji preko 100 suspektih lokusa koji doprinose nastanku karcinoma prostate, mada su mehanizmi između genetskih i faktora sredine u nastanku bolesti i dalje nepoznati (Amin Al Olama A. i sar, 2015; Schumacher FR. i sar, 2018). Germinativne mutacije gena uključenih u reparaciju DNK otkrivene su i kod pacijenata sa nehereditarnim oblikom bolesti, i to mutacije gena *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *BRCA1*, *PALB2* i *RAD51D* (Pritchard CC. i sar, 2016). Pokazano je da nosioci mutacije *BRCA* gena imaju lošije ishode nakon lokalne terapije karcinoma prostate (hirurško lečenje ili zračna terapija) u odnosu na pacijente koji nisu nosioci (Castro E. i sar, 2015). Rezultati velike međunarodne, multicentrične studije *IMPACT (Identification of Men with a genetic predisposition to ProstAte Cancer: Targeted screening in men at higher genetic risk and controls)* su pokazali je da su nosioci mutacije *BRCA2* gena imali veću incidencu karcinoma prostate, bili su mlađi u trenutku dijagnostikovanja i imali su klinički značajnije tumore (Page EC. i sar, 2019).

U karcinogenezi tumora prostate, smatra se da je jedan od najvažnijih molekularnih mehanizama interakcija između oksidativnog stresa, hronične inflamacije i signalnih puteva posredovanih aktivacijom androgenih receptora (AR) (Reuter S. i sar, 2010; Khurana N. i sar, 2018). Takođe, pretpostavka je da oksidativni stres nije uključen isključivo u proces karcinogeneze, već i u nastanak agresivnog fenotipa ovog karcinoma (Reuter S. i sar, 2010). Smatra se da brojni udruženi faktori rizika kao što su godine, ishrana, prekancerozne lezije i hormonski disbalans mogu dovesti u vezu sa povećanom produkcijom kiseoničnih slobodnih radikala i posledično nastankom oksidativnog stresa. U odgovoru na poremećaj u redoks homeostazi, posledična aktivacija transkripcionog faktora Nrf2 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) indukuje ekspresiju čitavog seta gena, uključujući i članove superfamilje enzima glutation transferaza (GST) (Thimmulappa RK. i sar, 2002).

Smatra se da hronična inflamacija može dovesti do nastanka i progresije karcinoma prostate, menjajući ravnotežu između hemokina, citokina, reaktivnih kiseoničnih vrsta i transkripcionih faktora u tumorskom okruženju. Naime, pokazano je da je jedan od ključnih transkripcionih faktora inflamacije NF-κB (eng. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) konstitutivno aktiviran u tumorskim ćelijama karcinoma prostate, a povećana ekspresija njegove subjedinice *p65* je potvrđena kako u PIN (engl. *prostatic intraepithelial neoplasia*), tako i u kanceroznim lezijama. NF-κB može direktno inhibisati Nrf2 na nivou transkripcije, dok s druge strane NF-κB aktivira signalni put posredovan androgenim receptorom. Na taj način, uska povezanost oksidativnog stresa, inflamacije i aktivacije signalnih puteva posredovanih androgenim receptorom predstavlja važan molekularni mehanizam koji doprinosi kako karcinogenezi, tako i progresiji ovog karcinoma (Khurana N. i sar, 2018) (slika 2).

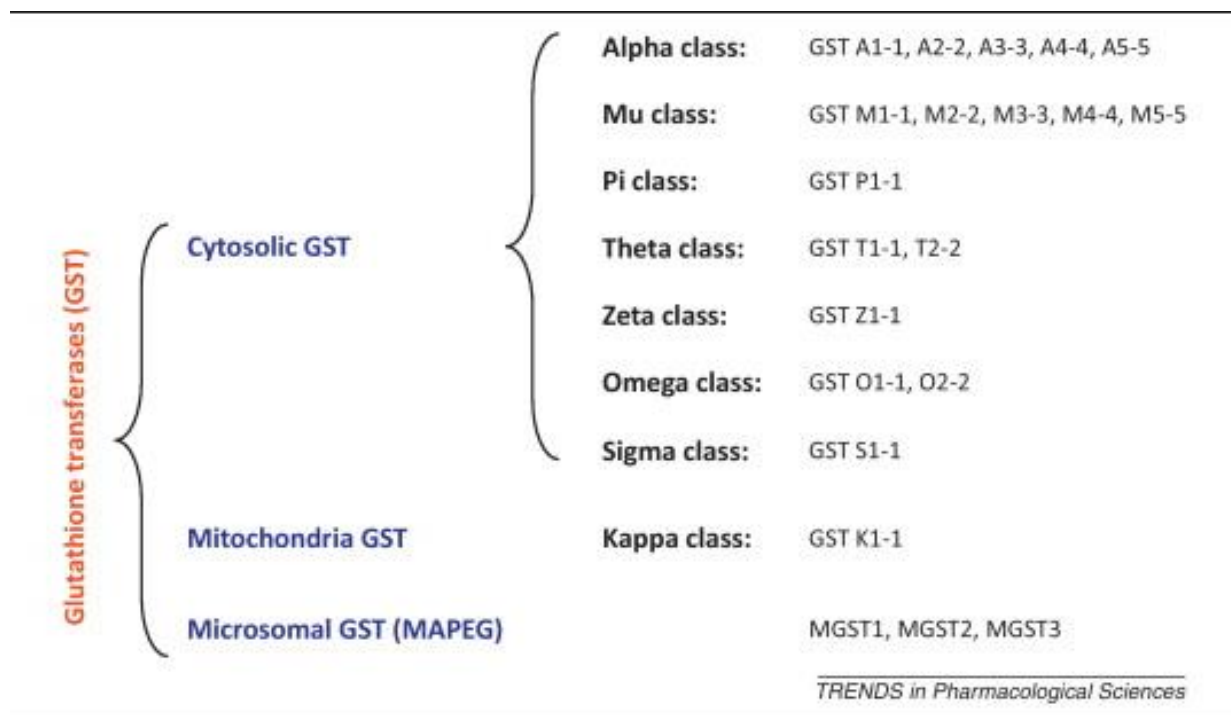


Slika 2. Povezanost oksidativnog stresa, hronične inflamacije i signalnih puteva posredovanih aktivacijom androgenih receptora u karcinomu prostate

(slika preuzeta iz rada- *Khurana N. i sar, 2018*)

1.3. Glutation transferaze

U nastanku i progresiji karcinoma prostate značajnu ulogu može imati velika superfamilija enzima glutacion S-transferaza (GST), za koje je pokazano da učestvuju u metabolizmu izvesnog broja karcinogena značajnih za nastanak ovog karcinoma. U okviru velike superfamilije glutacion S-transferaza, najveća je citosolna familija. Kod ljudi je do sada identifikovano sedam klasa citosolnih GST enzima, GSTA (alfa), GSTM (mi), GSTP (pi), GSTS (sigma), GSTT (teta), GSTZ (zeta), uključujući i klasu omega (GSTO), koja je poslednja identifikovana (Slika 3). Ovi enzimi najpoznatiji su po svojoj ulozi koju imaju u fazi II detoksikacije (Hayes JD. i sar, 2000). Naime oni katališu reakcije konjugacije redukovano glutaciona (GSH) i elektrofilnih supstrata, i na taj način učestvuju u reakcijama detoksikacije endogenih i egzogenih ksenobiotika, uključujući karcinogene i hemoterapijske agense (Dong SC. i sar, 2018; Simic T. i sar, 2009.). Pored toga, određene GST učestvuju i u metabolizmu steroidnih hormona i slobodnih radikala. Pored kataličke uloge, GSTP1 takođe učestvuje i u procesima glutacionilacije, kao i regulacije redoks zavisnih apoptotičnih signala (Pljesa-Ercegovac M. i sar, 2018). Glutacionilacija predstavlja posttranslacionu modifikaciju proteinskih tiol grupa formiranjem kompleksa disulfida sa glutacionom. Šta više, reverzibilna glutacionilacija/deglutacionilacija ima sposobnost da deluje kao regulatorni prekidač koji modulira pojedinačne enzime ili složenije puteve ćelijskog metabolizma i funkcije (Board PG. i sar, 2013).



Slika 3. Superfamilija enzima glutation S-transferaza (GST)

(slika preuzeta iz rada- Wu I. i sar, 2012)

GST izoenzimi klase omega (GSTO1-1 i GSTO2-2), iako pripadaju ovoj familiji, poseduju citav spektar specifičnih aktivnosti. Naime, zbog prisustva funkcionalne grupe cisteina u aktivnom mestu aktivnost GSTO1-1 se sve više povezuje sa ciklusom glutationilacije, sa sposobnošću da katališe reakcije i glutationilacije i deglutationilacije proteina. Naime, ova posttranslaciona modifikacija proteina dodavanjem glutationa na specifične cisteinske ostatke ima važnu ulogu u regulaciji redoks-senzitivnih signalnih puteva. Smatra se da izoenzim GSTO2-2 ima najizraženiju dehidroaskorbat reduktaznu aktivnost u ćelijama sisara. Značaj ovih enzima uključuje i regulaciju redoks ravnoteže u ćeliji, aktivaciju inflamatornog citokina interleukina-1 β (IL-1) i biotransformaciju arsena (Board PG. i sar, 2013).

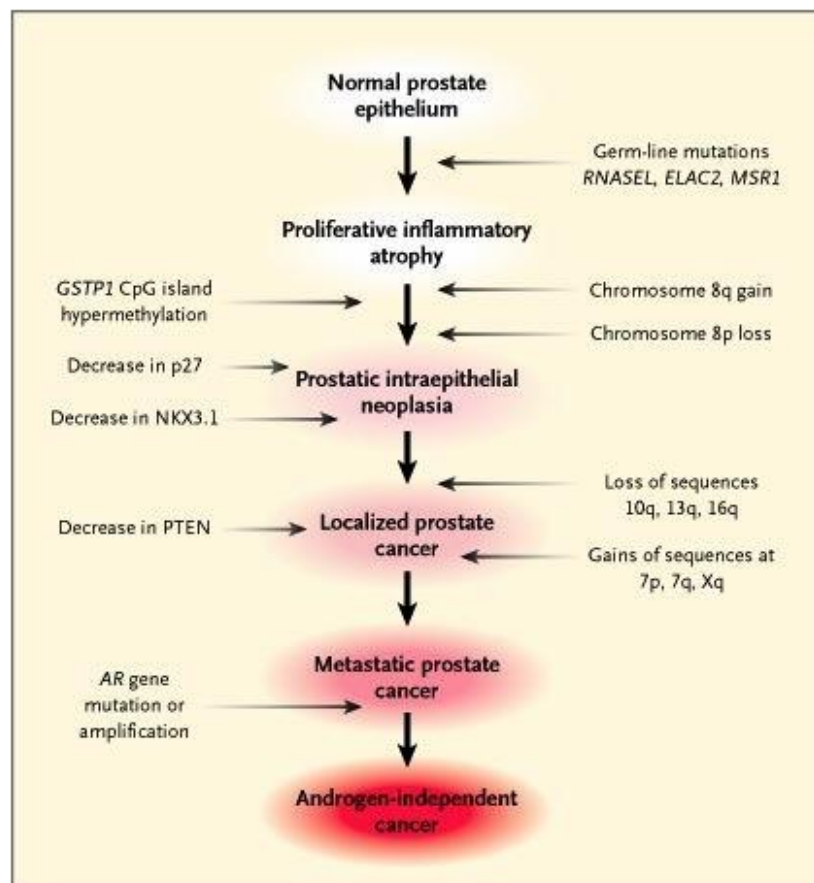
1.3.1. Značaj polimorfizama glutation transferaza u osetljivosti za nastanak malignih bolesti

Unutar svih najvažnijih citosolnih klasa GST opisan je genski polimorfizam, a najviše su izučavani *GSTM1* i *GSTT1* delecioni polimorfizmi (Tabela 1). Naime, kao posledica delecije gena ne dolazi do sinteze aktivnog *GSTM1-1*, odnosno *GSTT1-1* enzima. Time se gubi njihova uloga u detoksikaciji (Dong SC. i sar, 2018), što može pogodovati bržem slomu antitumorskih mehanizama usled kumulativnih oštećenja molekula DNK i pojave mutacija, što za posledicu može imati nastanak karcinoma. Interesantno je da među pripadnicima bele rase, 50% populacije poseduje *GSTM1*-nulti genotip, a oko 20 do 30% *GSTT1*-nulti genotip. Nosiocce *GSTT1*-nultog genotipa karakteriše smanjenje metaboličke aktivnosti prema derivatima etana koji se nalaze u duvanskom dimu. Ipak, *GSTT1* karakteriše, u nekim tkivima, uključenost u reakcije bioaktivacije jedinjenja poput trihloretilena, hlorofenola i pesticida i na taj način nastajanje još toksičnijih metabolita (Sweeney C. i sar, 2000). Poznato je da su nosioci *GSTM1*-nultog genotipa i *GSTT1*-nultog genotipa bili fokus mnogih istraživanja, u cilju utvrđivanja efekata njihove deficijencije i stepena nastajanja tumora. Hipoteza u tim istraživanjima je da homozigotna delecija *GSTM1* i *GSTT1* gena, zbog njihove oštećene sposobnosti u detoksikaciji karcinogena, povećava pojavu DNK mutacija i time posledično i rizik od pojave karcinoma (Hayes JD. i sar, 2000). Studije koje su ispitivale uticaj *GSTM1* i *GSTT1* delecionih polimorfizama u nastajanju karcinoma prostate, pokazuju vezu između *GSTM1*-nultog genotipa i značajno povećanje pojave karcinoma prostate među pripadnicima azijske i evroazijske rase (Liu D. i sar, 2013; Safarinejad MR. i sar, 2011), ali ne i među Evropljanima, prema najnovijim istraživanjima (Malik SS. i sar, 2016). Takođe je pokazano da *GSTT1* delecioni polimorfizam može biti važan biomarker karcinoma prostate među afričkom populacijom (Malik SS. i sar, 2016).

Tabela 1. Genski polimorfizmi i funkcionalni značaj najvažnijih predstavnika citosolnih glutation transferaza (GST)

Enzim	Gen	Genski polimorfizam		Fenotip
		Alel/ haplotip	Supstitucija/ delecija	
GSTM1-1	<i>GSTM1</i> 1p13.3	<i>GSTM1</i> *A	K173	Referentni alel
		<i>GSTM1</i> *B	N173	Ne postoji funkcionalna razlika
		<i>GSTM1</i> *C	S85	Funkcionalni značaj nije okarakterisan
		<i>GSTM1</i> *O	Delecija gena	Povezanost sa odgovorom na hemoterapiju i rizikom za nastanak kancera
GSTT1-1	<i>GSTT1</i> 22q11.23	<i>GSTT1</i> *O	Delecija gena	Povezanost sa aktivacijom određenih karcinogena
		<i>GSTT1</i> *N141	N141	Nema efekta na aktivnost enzima
		<i>GSTT1</i> *stop	Delecija nukleotida G412	Nema enzimske aktivnosti
		<i>GSTT1</i> *K173	K173	Nestabilan enzim niske aktivnosti
GSTP1-1	<i>GSTP1</i> 11q13.3	<i>GSTP1</i> *I105	I105	Referentni alel
		<i>GSTP1</i> *V105	V105	Razlika u stabilnosti i aktivnosti prema karcinogenim diolepoksidima
		<i>GSTP1</i> *A114	A114	Referentni alel
		<i>GSTP1</i> *V114	V114	
GSTO1-1	<i>GSTO1</i> 10q25.1	<i>GSTO1</i> *A	A140 E155	Referentni alel
		<i>GSTO1</i> *B	D140	Nema funkcionalne razlike
		<i>GSTO1</i> *C	ΔE155 K208	Nestabilni protein
		<i>GSTO1</i> *D	ΔE155 E208	Nestabilni protein
		<i>GSTO1</i> *E	Y32	Neaktivan enzim
GSTO2-2	<i>GSTO2</i> 10q25.1	<i>GSTO2</i> *A	N142	Referentni alel
		<i>GSTO2</i> *B	D142	Nema funkcionalne razlike
		<i>GSTO2</i> *C	I41	Stabilni protein
		<i>GSTO2</i> *D	Y130	Nestabilni protein
		<i>GSTO2</i> *E	I158	Nestabilni protein

Jedna od čestih genetskih alteracija kod karcinoma prostate je utišavanje gena za *GSTP1*, koji se dešava veoma rano u procesu karcinogeneze, čime se potencira važna antioksidativna i detoksifikaciona uloga ovog enzima (Martignano F. i sar, 2016). Specifična je hipermetilacija *GSTP1* gena, koja se dešava u tkivu karcinoma prostate, dok se u zdravom tkivu kao i kod benigne hiperplazije prostate ne događa (Martignano F. i sar, 2016) (slika 4). Takođe, pokazano je da je prisustvo metilovanog *GSTP1* (m*GSTP1*) u cirkulaciji povezano sa tumorskom agresivnošću. Sa druge strane, povećana ekspresija proteina *GSTP1* u tumorskim ćelijama karcinoma prostate inhibira vijabilitet i migraciju tumorskih ćelija efektom na proto-onkogen *MYC* (Wang X. i sar, 2017).



Slika 4. Uloga hipermetilacije *GSTP1* gena u karcinogenezi karcinoma prostate

(slika je preuzeta iz Nelson W. i sar, 2003)

Posmatrajući GSTP1 polimorfizme, čiji su geni lokalizovani na hromozomu 11 (11q13.2) (Cowell IG. i sar, 1988), dva polimorfizma koji se često javljaju u okviru egzona 5/6 regiona gena (rs1695 c.313A > G, p.Ile105Val i rs1138272 c.341C > T, p.Ala114Val) mogu biti povezani sa pojavom i razvijanjem različitih tumora (Huang GZ. i sar, 2013; Xie P. i sar, 2014; Tan X. i sar, 2015; Zhou CF. i sar, 2015; Yan F. i sar, 2016) (Tabela 1). Ovi GSTP1 polimorfizmi stvaraju četiri specifična GSTP1 haplotipa: *GSTP1**A (Ile105/Ala114), *GSTP1**B (Val105/Ala114), *GSTP1**C (Val105/Val114) i *GSTP1**D (Ile105/Val114), čija specifična povezanost sa promenama u katalitičkoj i regulatornoj ulozi GSTP1 može imati potencijalni klinički značaj u podložnosti za nastanak različitih malignih i nemalignih bolesti, kao i u odgovoru na oksidativni stres (Ali Osman F. i sar, 1997). Takođe, potrebno je istaći da se GSTP1 rs 1695 polimorfizam, prema rezultatima više meta-analiza, može dovesti u vezu sa rizikom od karcinoma prostate (Zhang Y. i sar, 2016; Wei B. i sar, 2013), dok su analize povezanosti između *GSTP1**Ala114Val rs1138272 polimorfizma i rizika za karcinom prostate još uvek nedovoljno ispitani.

Pored razlika koje postoje između klase glutation transferaza i klase omega, prisutna je i značajna genetska heterogenost u okviru same omega klase koja nastaje kao posledica genskih delecija, kao i polimorfizma jednog nukleotida (eng. *Single nucleotide polymorphism, SNP*). Mnoge od ovih varijacija imaju važne funkcionalne posledice i različite naučne studije procenjuju eventualnu vezu koja postoji između GSTO polimorfizama i kliničkih oboljenja. Identifikovana su dva GSTO gena, *GSTO1* i *GSTO2*, koji su na hromozomu 10 međusobno udaljena 7,5 kb. U oba gena je pokazano prisustvo polimorfizama, od koji su dva najčešće izučavana funkcionalna polimorfizma *GSTO1**Ala140Asp (rs 4925) i *GSTO2**Asn142Asp (rs156697) (Mukherjee B. i sar, 2006; Whitbread AK. i sar, 2005). GSTO1 SNP polimorfizam rs4925 je, do sada, najčešće ispitivani polimorfizam (Whitbread AK. i sar, 2003). U slučaju

ovog polimorfizma promena se javlja u okviru egzona 4 na nukleotidu 419 kada se citozin (C) zameni adeninom (A) što dovodi do supstitucije alanina (Ala, A) aspartatom (Asp, D) u aminokiselini 140 (*A140D) (Marahatta SB. i sar, 2006). Kod GSTO2 SNP polimorfizma rs156697, promena se javlja takođe u okviru egzona 4 na nukleotidu 424 kada se adenin (A) zameni guaninom (G) što dovodi do supstitucije asparagina (Asn, N) aspartatom (Asp, D) u aminokiselini 142 (*N142D). Genotip *GSTO2**A/A je prisutan u oko 59% populacije, *GSTO2**A/G u oko 37%, a *GSTO2**G/G u oko 4% populacije (Marahatta SB. i sar, 2006). Do sada, pokazano je da se *GSTO1**A140D polimorfizam može biti važan faktor rizika za nastanak hepatocelularnog karcinoma, holangiokarcinoma i karcinoma dojke (Marahatta SB. i sar, 2006). Međutim, u literaturi nema podataka o značaju polimorfizma GST omega klase u karcinomu prostate. Bitno je istaći da pored mogućnosti da moduliraju rizik za nastanak karcinoma prostate, GST klase omega mogu značajno doprineti napredovanju ovih tumora, jer utiču na kapacitete ćelija za proliferaciju, kao i na odgovor na terapiju. Naime, sve se više ukazuje na ulogu *GSTO1* u rezistenciji kako na hemioterapijske agense, kao što je cisplatina i adriamicin, tako i na zračenje. Iako tačan molekularni mehanizam ove rezistencije nije potpuno rasvetljen (Board PG. i sar, 2013), funkcionalni polimorfizmi opisani u ovoj klasi mogu uticati na razlike u individualnom odgovoru na terapijski protokol, koji se koristi u karcinomu prostate.

1.4. Dijagnostika karcinoma prostate

Sumnja na karcinom prostate postavlja se na osnovu kliničkog pregleda-digitalnog rektalnog pregleda prostate, analize vrednosti prostata-specifičnog antigena i nalaza imidžing metoda, a definitivna dijagnoza postavlja se histopatološkom analizom isečaka dobijenih biopsijom prostate.

1.4.1. Prostata-specifični antigen (PSA)

Prostata specifični antigen (PSA) je serumski marker čija je upotreba bila revolucionarna u dijagnostici karcinoma prostate (Stamey TA. i sar, 1987). Iako je njegovo prisustvo dokazano u spermi još 1961. godine, tek se od 1981. godine posmatra kao potencijalni serumski marker za bolesti prostate (Wang MC. i sar, 1981).

PSA je po svojoj strukturi glikoprotein molekulske mase 34 kDa, član porodice kalikrein-peptidaza, sekretuju ga epitelne ćelije prostate, u kojima se nalazi u okviru prostatičnih sekretornih granula; pored epitelnih ćelija, PSA luče i periuretralne žlezde. Jedan deo stvorenog PSA (25-30%) se inaktivira (engl. *free PSA*), prelazi direktno u krvotok, preko krvno-prostatične barijere, dok drugi deo ostaje u acinusima i učestvuje u ejakulatu. Fiziološka uloga PSA je razgradnja proteina semenog koagulumu u vagini koja omogućava pokretljivost spermatozoida, dok u krvi nema fiziološku ulogu (Pejčić T. i sar, 2020; Robert M. i sar, 1999).

PSA je organ specifičan, ali ne i kancer specifičan marker i elevacija njegovog nivoa u serumu može postojati i kod drugih benignih stanja, poput benigne hiperplazije prostate ili inflamacije- prostatitisa (Sarwar S. i sar, 2017). Istorijski, granicom "normalnog" PSA se dugo smatrala koncentracija od 4,0 ng/ml, ali se danas zna da se PSA ponaša kao kontinuirani parametar- više vrednosti ukazuju na veću verovatnoću karcinoma prostate, ali su karcinomi prostate mogući i kod niskih vrednosti PSA (Pejčić T. i sar, 2020; Thompson I. i sar, 2004). Tako je, na primer, kod najnižih vrednosti PSA (0,0-0,5 ng/ml) verovatnoća prisustva karcinoma prostate 6,6% (Thompson I. i sar, 2004). Sa ciljem da se poveća senzitivnost i specifičnost PSA, u kliničkoj upotrebi su i tzv. derivati PSA: gustina PSA, brzina PSA, vreme za koje se PSA dvostruko uveća i odnos koncentracije slobodnih molekula PSA i ukupne koncentracije PSA (Pejčić T. i sar, 2020). Gustina PSA (engl. *PSA density*, *PSAD*) predstavlja odnos koncentracije PSA i zapremine prostate; više vrednosti ukazuju na veću verovatnoću karcinoma prostate. Brzina PSA (engl. *PSA velocity*, *PSAV*) predstavlja godišnji porast PSA,

pri čemu se normalnim smatra porast $\leq 0,8$ ng/ml godišnje (Pejčić T. i sar, 2020; Carter HB. i sar, 1992). Vreme za koje se PSA dvostruko uvećava (engl. *PSA doubling time, PSA-DT*) predstavlja merenje eksponencijalnog rasta PSA u serumu tokom vremena, i ovo vreme je kraće kod većih i agresivnijih tumora (Schmid HP. i sar, 1993). PSAV i PSA-DT imaju limitiranu ulogu u dijagnostici karcinoma prostate, jer su podložni brojnim uticajima, poput volumena prostate i benigne hiperplazije (Arlen PM. i sar, 2008). Odnos koncentracije slobodnih molekula i ukupne koncentracije PSA (engl. *free/total PSA ratio, f/t PSA*) klinički ima najveći značaj u tzv. "sivoj zoni" kada su vrednosti PSA 4-10 ng/ml (Huang Y. i sar, 2018). Naime, pokazano je da je karcinom prostate dokazan biopsijom kod 56% pacijenata sa vrednostima PSA u ovom opsegu i f/t PSA $< 0,10$, dok je kod svega 8% pacijenata sa f/t PSA $> 0,25$ dokazan karcinom prostate (Catalona WJ. i sar, 1998).

1.4.2. Rektalni pregled prostate

U dijagnostici karcinoma prostate značajno mesto ima i digitalni rektalni pregled prostate (engl. *digital rectal examination, DRE*) koji predstavlja sastavni deo urološkog pregleda, i pre upotrebe PSA bio je fundamentalni deo skrininga karcinoma prostate (Chodak GW. i sar, 1984). Palpatorni nalaz koji može sugerisati na prisustvo karcinoma prostate je prisustvo palpabilnih tvrdina i nodusa (Gerber GS. i sar, 2016). Većina karcinoma prostate lokalizovana je u perifernoj zoni prostate, i ovim pregledom mogu se detektovati tumori u ovoj zoni, dok se mali tumori u drugim delovima prostate nedostupnim digitalnom pregledu ne mogu detektovati na ovaj način. DRE je povezan sa detekcijom karcinoma prostate nezavisno od vrednosti PSA (Halpern JA. i sar, 2017). Nalaz DRE suspektan na prisustvo karcinoma prostate predstavlja indicaciju za biopsiju (Okotie OT. i sar, 2007; Gosselaar C. i sar, 2008).

1.4.3. Biopsija prostate

Definitivna dijagnoza karcinoma prostate postavlja se histopatološkom verifikacijom isečaka tkiva prostate dobijenih biopsijom. Biopsija prostate je indikovana onda kada postoji elevacija nivoa PSA, i/ili suspektan nalaz DRE ili neka od imidžing metoda. Ultrazvukom vođena biopsija danas je standardni vid biopsije, pri čemu se može izvoditi transrektalnim (engl. *transrectal ultrasound, TRUS*) ili transperinealnim pristupom (Porter CR. 2013). Biopsija prostate se može sprovoditi kao sistematska ili ciljana- u slučaju kada biopsiji prethodi multiparametrijski MRI pregled prostate (mpMRI), ili kombinovanjem ova dva pristupa (Drost FH. i sar, 2019). Savetuje se uzimanje 8-12 sistematskih isečaka, zavisno od veličine prostate (Donovan J. i sar, 2003; Shariat SF. i sar, 2008).

1.5. Terapijski pristupi u lečenju lokalizovanog karcinoma prostate

Kurativni tretmani lokalizovanog karcinoma prostate obuhvataju hirurško lečenje-radikalnu prostatektomiju, i radioterapiju.

1.5.1. Hirurško lečenje- radikalna prostatektomija

Radikalna prostatektomija je zahtevna hirurška procedura čiji je cilj eradikacija karcinoma, i ona obuhvata uklanjanje cele prostate sa intaktnom kapsulom i semenim kesicama praćeno formiranjem veziko-uretralne anastomoze. U savremenoj urologiji radikalna prostatektomija se može izvoditi kao otvorena- danas prvenstveno retropubičnim pristupom, kao laparoskopska i robot-asistirana (Adolfsson J, 2008). U lečenju lokalizovanog karcinoma prostate i dalje predstavlja zlatni standard za lečenje ove bolesti (Catalona WJ. i sar, 2012). Onkološki rezultati radikalne prostatektomije pokazuju da se kod pacijenata sa lokalizovanom bolešću niskog i intermedijernog rizika desetogodišnje kancer-specifično preživljavanje kreće

do 99% (Hamdy FC. i sar, 2016), dok je studija Bill-Axelson-a i saradnika pokazala da je kod ovih pacijenata kancer-specifično preživljavanje dostizalo 80% (Bill-Axelson A. i sar, 2018).

U okviru radikalne prostatektomije, ističe se i onkološki značaj disekcije pelvičnih limfnih čvorova, iako su skorašnji sistematski pregledi pokazali da izvođenje disekcije ne poboljšava onkološki ishod, uključujući i preživljavanje (Fossati N. i sar, 2017), opšte je prihvaćeno da proširena diskekcija pelvičnih limfnih čvorova pruža značajne informacije o proceni stadijuma bolesti i prognozi, koje se drugim procedurama ne mogu dobiti (Fossati N. i sar, 2017).

Prema aktuelnim vodičima Evropske asocijacije urologa, radikalna prostatektomija se nalazi u preporukama za lečenje lokalizovanog karcinoma prostate kod pacijenata sa niskim, intermedijernim i visokim rizikom (EAU, 2020) (tabela 2). Kod pacijenata sa niskim rizikom se preporučuje kao vid aktivnog lečenja ukoliko je pacijent pogodan za operativni zahvat, dok se kod pacijenata sa intermedijernim rizikom predlaže ukoliko je očekivano preživljavanje iznad 10 godina. U slučaju visoko-rizičnog lokalizovanog karcinoma prostate, ova procedura se predlaže kao deo potencijalne multimodalne terapije (EAU, 2020).

Tabela 2. Stratifikacija bolesnika sa lokalizovanim i lokalno uznapredovalim karcinomom prostate

Rizik	Stadijum bolesti	
Nizak	PSA < 10 ng/ml i GS < 7 i cT1-2a	Lokalizovan
Intermedijarni	PSA 10-20 ng/ml ili GS 7 ili cT2b	
Visok	PSA > 20 ng /ml ili GS > 7 ili cT2c	Lokalno uznapredovali
	cT3-4 ili cN+ (bez obzira na vrednost PSA i GS)	

1.5.2. Radioterapija

Radioterapija zauzima značajno mesto u lečenju lokalizovanog karcinoma prostate. Može se sprovoditi kao radioterapija spoljašnjim snopom (engl. *External beam radiation therapy*, EBRT) i kao brahiterapija (Catalona WJ. i sar, 2012). Intenzitetom modulirana radioterapija (engl. *intensity-modulated radiotherapy*, IMRT) i volumetrijski modulirana lučna terapija (engl. *volumetric arc external-beam radiotherapy*, VMAT) su vidovi radioterapije spoljašnjim snopom koji se primenjuju u lečenju lokalizovanog karcinoma prostate prema aktuelnim preporukama (EAU, 2020). Ovim tehnikama omogućava se bolje ciljanje, prilagođavanje ili oblikovanje volumena zračenja bliže prostati, upotrebu viših doza zračenja bez prekoračenja tolerancije okolnih tkiva; stoga je poboljšana kontrola tumora i smanjene akutne i hronične komplikacije u odnosu na konvencionalnu radioterapiju. U svakodnevnoj praksi, preporučuju se doze zračenja ≥ 74 Gy (Zietman AL. i sar 2010; Viani GA. i sar, 2009; Beckendorf V. i sar, 2011). Prema rezultatima ProtecT studije, randomizovane studije koja je poredila ishode aktivnog monitoringa, radikalne prostatektomije i EBRT, na osnovu 10-ogodišnjeg praćenja ne postoji razlika u onkološkim ishodima između radikalne prostatektomije i EBRT (kombinovane sa androgen-deprivacionom terapijom tokom 6 meseci) (Hamdy FC. i sar, 2016).

Brahiterapija karcinoma prostate podrazumeva uvođenje radioaktivnih izvora u tkivo prostate u terapijske svrhe (Catalona WJ. i sar, 2012). U lečenju lokalizovanog karcinoma prostate može se primeniti brahiterapija niske brzine doze (engl. *Low-dose rate*, LDR) i velike brzine doze (engl. *High-dose rate*, HDR).

1.5.3 PSA relaps

Značajno mesto u praćenju pacijenata sa karcinomom prostate zauzima i PSA relaps. Nakon sprovedene radikalne lokalne terapije karcinoma prostate (radikalne prostatektomije ili radioterapije), kod 27-53% pacijenata doći će do porasta vrednosti PSA, tj. do pojave biohemijskog, odnosno PSA relapsa (EAU, 2020). PSA relaps će se javiti tokom 10 godina nakon radikalne prostatektomije kod 20-40% pacijenata (Freedland SJ. i sar, 2005; Roehl KA. i sar, 2004), odnosno kod 30-50% pacijenata nakon radioterapije (Kupelian PA. i sar, 2006) (tabela 3). Postoji veliki broj definicija PSA relapsa nakon radikalnog lečenja čiji je cilj da iskažu vrednost PSA koja upućuje na razvoj metastatske bolesti i potrebu za drugom linijom lečenja, jer svaki detektabilan nivo PSA ne vodi nužno i progresiji bolesti (Lee EK. i sar, 2016). Prag vrednosti PSA koji najbolje predviđa pojavu metastaza nakon radikalne prostatektomije je $PSA > 0,4$ ng/ml i njegov porast (Toussi A. i sar, 2016; Stephenson AJ. i sar, 2006). Nakon primarne radioterapije, PSA relaps se definiše kao svaki porast $PSA > 2$ ng/ml iznad vrednosti nadira PSA (najniže vrednosti PSA nakon lečenja), nezavisno od vrednosti nadira (Roach M, i sar, 2006). Rezultati skorašnjeg sistematskog pregleda i meta-analize ukazuju da pojava PSA relapsa povećava rizik od razvoja udaljenih metastaza, kao i karcinom-specifični i ukupni mortalitet (Van den Broeck T. i sar, 2019).

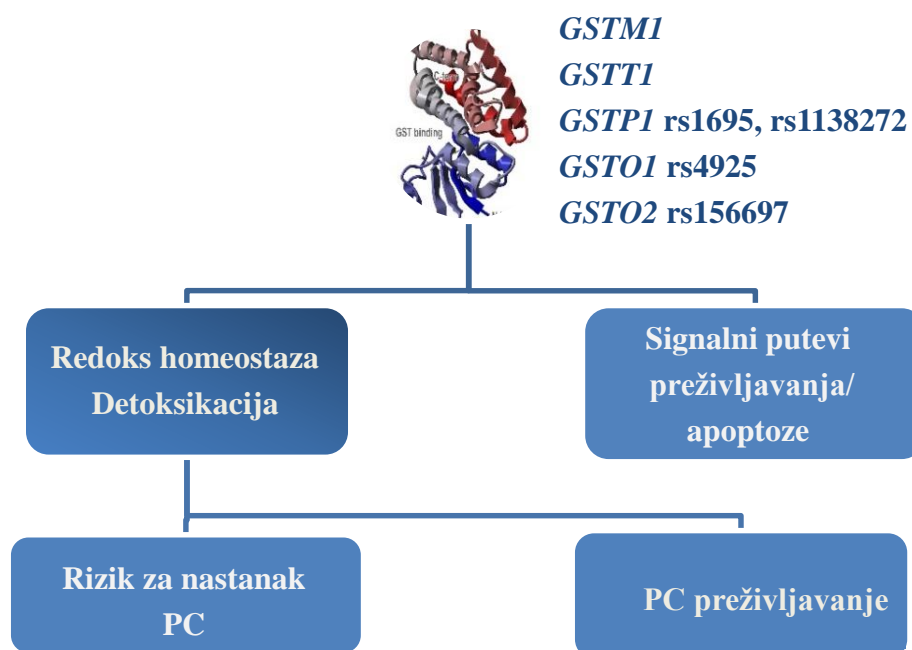
Bitno je istaći da uprkos brojnim naporima usmerenim na pravovremenu dijagnozu ponovne pojave bolesti, klinički indikatori rekurencije koji se koriste poslednjih godina imaju ograničenu senzitivnost i specifičnost (Kattan MW. i sar, 1999; Ramos CG. i sar, 2004). Pored toga, smatra se da je procena rizika za progresiju bolesti posle hirurške intervencije od veoma velikog značaja za pravilnu i pravovremenu terapiju bolesnika, s jedne strane i izbegavanje preterano agresivne terapije, s druge strane.

Tabela 3. Stratifikacija rizika za pojavu biohemijskog relapsa na osnovu terapijske opcije (preporuka Evropske asocijacije urologa)

Rizik za pojavu biohemijskog relapsa (BR)	
	Posle radikalne prostatektomije
Nizak	PSA-DT* >1 godina i pGS** < 8 (ISUP gradus <4)
Visok	PSA-DT ≤1 godine ili pGS 8–10 (ISUP gradus 4–5)
	Posle terapije zračenjem
Nizak	Period od primarne terapije do bioh.relapsa > 18 meseci i pGS**< 8 (ISUP gradus <4)
Visok	Period od primarne terapije do bioh.relapsa ≤ 18 meseci ili bGS 8–10 (ISUP gradus 4–5)
<p>PSA-DT*- vreme za koje se PSA dvostruko uvećava; pGS**- patološki određen Glison skor; bGS*** -Glison skor dobije biopsijom; ISUP - <i>International Society of Urological Pathology</i>.</p>	

1.5.4 Glutation transferaze u karcinogenezi karcinoma prostate

S obzirom da različita ekspresija glutacion transferaza može uticati na sposobnost određenog tkiva za detoksikaciju i borbu protiv oksidativnog stresa, pokazano je da su individue bez eksprimiranja nekog od GST enzima imale viši rizik za pojavu različitih karcinoma. Naime, ova velika superfamilija enzima učestvuje u reakcijama detoksikacije endogenih i egzogenih ksenobiotika, uključujući karcinogene i hemoterapijske agense. Pored toga, određene GST imaju važne regulatorne uloge u redoks homeostazi i aktivnosti signalnih puteva uključenih u preživljavanje odnosno programiranu ćelijsku smrt (Dong SC. i sar, 2018; Simić T. i sar, 2009). Literaturni podaci pokazuju da se izvestan broj karcinogena značajnih za nastanak karcinoma prostate u organizmu se metaboliše upravo delovanjem GST. Zbog svega navedenog, može se prepostaviti da bi utvrđivanje da li neki od GST enzima može predstavljati biomarker rizika ili može imati prognostički značaj kod bolesnika sa karcinomom prostate, pomoglo u uspešnijem lečenju kroz individualni pristup bolesniku (slika 5). Pored toga, važno je ustanoviti da li polimorfna ekspresija ovih važnih enzima, kao deo malignog fenotipa karcinoma prostate, utiče na progresiju ovog tumora. Zbog funkcionalnog značaja najčešće prisutnih polimorfizama gena koji kodiraju citosolne *GST* u nastanku, progresiji i napredovanju karcinoma prostate, u ovoj studiji je izvedeno sveobuhvatno istraživanje koje je obuhvatilo pojedinačne i kumulativne efekte šest GST polimorfizama u proceni rizika i prognoze bolesnika sa karcinomom prostate.



Slika 5. Pretpostavljeni efekti polimorfizama glutation transferaza (GST) u proceni rizika i prognoze bolesnika sa karcinomom prostate

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati da li postoji uticaj polimorfizama gena za *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTO1* i *GSTO2* na rizik za nastanak karcinoma prostate, kao i da li postoji udruženi efekat genotipova i poznatih faktora rizika za nastanak karcinoma prostate.
2. Ispitati da li je prisustvo varijantnih *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTO1* i *GSTO2* genotipova udruženo sa fenotipskim karakteristikama tumora.
3. Ispitati da li polimorfna ekspresija *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTO1* i *GSTO2* enzima ima prognostički značaj kod bolesnika sa karcinomom prostate.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Selekcija ispitanika

U ovo istraživanje je bilo uključeno 237 bolesnika (prosečne starosti: $68,81 \pm 6,91$ godina) sa histopatološkom potvrdom karcinoma prostate (KP) koji su se lečili na Klinici za urologiju Kliničkog Centra Srbije i Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

Tabela 4. TNM klasifikacija karcinoma prostate

Patološki (pT)	
pT2	Tumor unutar prostate
pT2a	Unilateralna lokalizacija, infiltracija obuhvata do polovine lobusa
pT2b	Unilateralna lokalizacija, infiltracija obuhvata više od pola lobusa
pT2c	Bilateralna lokalizacija
pT3	Tumor je proširen van prostate
pT3a	Širenje oko prostate
pT3b	Invazija seminalnih vezikula
pT4	Invazija okolnih struktura
Regionalni limfni nodusi (N)	

PNX	Nema regionalnih nodusa u uzorku
pN0	Nema pozitivnih regionalnih nodusa
pN1	Metastaze u regionalnim nodusima
Metastaze (M)	
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze
M1a	Neregionalni limfni nodusi
M1b	Kosti
M1c	Druge lokalizacije sa ili bez koštanih metastaza (ova kategorija se koristi za više od jedne lokalizacije)

Histopatološka procena je izvršena od strane uropatologa u skladu sa *WHO* (engl. *World Health Organization*) klasifikacijom tumora iz 2004-te godine (Epstein IJ. i sar, 2005) i *TNM* (engl. *Tumour Node Metastasis*) sistemom klasifikacije za procenu stepena diferentovanosti tumora iz 2009-te godine (Sobin LH. i sar, 2009) (Tabela 4).

U okviru histopatološkog nalaza, određivan je i Glison skor, koji je definisan na osnovu modifikovanog sistema klasifikacije Međunarodnog udruženja uropatologa (*International Society of Urological Pathology, ISUP*) iz 2005. godine. Naime, dobijeni Glison skor biopsijom prostate obuhvatao je dva najviše zastupljenog gradusa, a u slučaju da je prisutan samo jedan gradus, Glisonov skor se udvostručuje. U slučaju da je postojalo više različitih nalaza, Glison skor se računa sabiranjem najčešćeg i najvišeg gradusa (Epstein IJ. i sar, 2005) (tabela 5).

Tabela 5. Modifikovani sistem klasifikacije Glison skora

Glison skor	ISUP gradus
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 ili 3+5 ili 5+3)	4
9-10	5

Bolesnici lečeni radioterapijom su primili ukupnu dozu zračenja od 65 do 72Gy podeljenih u 33 do 36 seansi. Jedan pacijent je ozračen sa 45 Gy. Ukupno trajanje zračenja je bilo 7 nedelja +1dan, odnosno 50 dana. Bolesnici koji su regrutovani na Klinici za urologiju Kliničkog Centra Srbije, njih 118, lečeno je primarno hirurški, kao jedna od opcija lečenja lokalizovanog karcinoma prostate, i izvedena je radikalna prostatektomija, sa pelvičnom limfadenektomijom. Od tih 118 bolesnika kojima je dat upitnik, njih 99 je ušlo u studiju tj. uzeta je i krv za dodatnu analizu i poslata na Institut za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Određen broj pacijenta, u okviru praćenja preživljavanja je kroz uro-onkološke konzilijume dobijao i adjuvantnu terapiju zbog verifikovanih metastaza ili biohemijskog relapsa.

Kontrolnu grupu je činilo 236 ispitanika, uparenih po uzrastu (prosečne starosti 67,35 ± 9,18), čiji su uzorci krvi prikupljeni kao deo biobanke koja je formirana u navedenom periodu u saradnji Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju i Klinike za urologiju, bez verifikovanog malignog oboljenja.

Kriterijumi prema kojima su se ispitanici uključivali u studiju su bili klinički i patohistološki potvrđeno prisustvo karcinoma prostate, sa ili bez prisustva priznatih faktora

rizika za nastanak karcinoma prostate. Za prikupljanje podataka o izloženosti poznatim faktorima rizika za pojavu karcinoma prostate je korišćen epidemiološki upitnik, sa Instituta za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sa ciljem ispitivanja faktora rizika za nastajanje malignih bolesti. Upitnik je pre toga validiran korišćenjem odgovarajućih procedura. Upitnik je obuhvatao pitanja o starosti, polu, mestu rođenja, pušenju, konzumaciji alkohola, infekcijama i najčešćim komorbiditetima, dijabetes melitusu tip 2 i hipertenziji. U našem istraživanju, pušači su definisani kao osobe koje su navele da su pušile svakog dana tokom perioda koji je minimalno iznosio 60 dana do trenutka uključivanja u studiju. Iz istorija bolesti dobijeni su podaci o preoperativnim vrednostima PSA u krvi, kao i o Glison skoru iz histopatološkog nalaza. Svi podaci dobijeni od učesnika su se odnosili na period do trenutka postavljanja dijagnoze karcinoma kod slučajeva, i na odgovarajući period kod kontrolne grupe. Kod ovih bolesnika je takođe praćeno preživljavanje. Bolesnici sa karcinomom prostate su praćeni u vremenskom periodu od 50 meseci (od januara 2014. godine do marta 2018. godine), sa medijanom od 42 meseca (opseg 1-50 meseci). Tokom ovog vremenskog perioda praćenja, nisu dobijeni podaci od tri bolesnika sa karcinomom prostate.

Istraživanje je planirano prema etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 2013. godine) kao i prema pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj: 2650/IV-21, 10. april 2018). Svi pacijenti kojima je uziman biološki materijal korišćen u studiji, kao i njihovi lični podaci, prethodno su potpisali pristanak za učešće, a i obavešteni su o ciljevima i očekivanjima samog istraživanja.

3.2. Izolacija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK)

Za ispitivanje polimorfizama GST uzeti su uzorci pune krvi (3 ml) sa EDTA kao antikoagulansom, na Klinici za urologiju Kliničkog centra Srbije i transportovani do Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

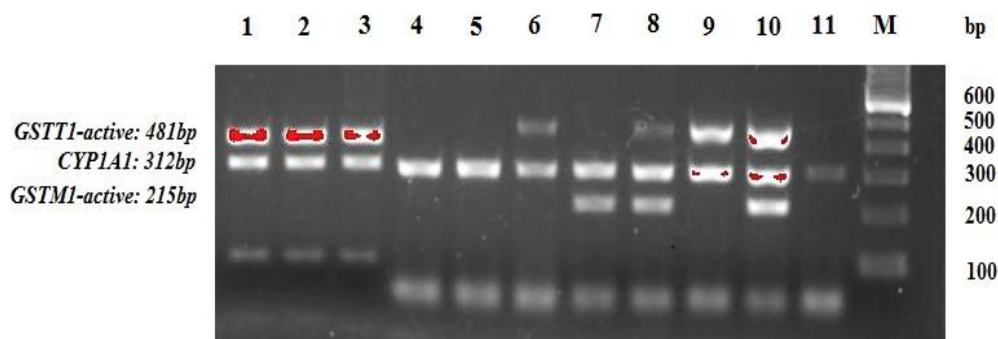
Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je izolovana iz 200 μ l venepunktirane krvi korišćenjem *QIAamp DNA mini kit-a* (*Qiagen, Chatsworth CA, USA*). Ovom metodom liziraju se membrane leukocita u rastvoru deterdženta, a histoni i ostali proteini vezani za DNK se uklanjaju enzimskom digestijom delovanjem proteinaze K. Rezultat je slobodna DNK, oslobođena od proteina, nukleaza i ostalih kontaminanata koji mogu da ometaju PCR reakciju. Dobijeni lizat se prenosi u mini spin kolone u kojima se nalazi silikonska gel membrana koja selektivno vezuje DNK. Ostatak lizata se potom ispira korišćenjem serije pufera koji sadrže soli i etanol. Alikvotirana DNK je skladištena na -20 $^{\circ}$ C do početka PCR (engl. *polymerase chain reaction*). Čistoća i količina izolovane DNK određivana je spektrofotometrijski na 230, 260, 280 i 320 nm na *GeneQuant pro* (*Biochrom, Cambridge, England*) aparatu.

3.3. Određivanje *GSTM1* i *GSTT1* delecionih polimorfizama

Multipleks *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizam je rađen po metodi Abdel-Rahman-a i sar. (Abdel-Rahman SZ. i sar, 1996) za istovremeno analiziranje genotipa *GSTM1* i *GSTT1*. Kontrolni prajmeri koji omogućavaju amplifikaciju egzona 7 *CYP1A1* gena (312 bp), takođe su bili uključivani u reakcije kako bi se potvrdilo prisustvo DNK u uzorku, kao i uslovi PCR-a. Korišćeni su navedeni prajmeri:

<i>GSTM1</i>	<i>Forward</i>	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
	<i>Reverse</i>	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
<i>GSTT1</i>	<i>Forward</i>	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC
	<i>Reverse</i>	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
<i>CYP1A1</i>	<i>Forward</i>	5' – GAACTGCCACTTCAGCTGTCT - 3'
	<i>Reverse</i>	5' – CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC - 3'

Uspeh same amplifikacije je kontrolisan elektroforezom na 2% agaroznom gelu na 125 V, 0,27 A i 50 W. Vizuelizacija proizvoda reakcije lančanog umnožavanja (eng. *polymerase chain reaction, PCR*) rađena je na UV kameri Chemidoc (Biorad, Hercules, California, USA) bojenjem DNK (SYBR® Safe DNA Gel Stain, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA). Pojava trake veličine 215 bp ukazivala je na prisustvo gena za *GSTM1*, a pojava trake veličine 481 bp na prisustvo gena za *GSTT1* (homozigotni i heterozigotni genotip). Ako traka nije bila prisutna, to je ukazivalo na homozigotnu deleciju gena za *GSTM1* i *GSTT1* (slika 6).



Slika 6. Analiza *GSTM1* i *GSTT1* genetskih varijanti multipleks PCR metodom.

U svim uzorcima je prisutna traka veličine 312 bp, koja predstavlja internu kontrolu (CYP1A1). U uzorcima 1, 2, 3, 6 i 9 trake veličine 480 bp ukazuju na prisustvo *GSTT1* aktivnog genotipa (homozigoti +/+ ili heterozigoti +/-). U uzorku 10 trake veličine 480 bp i 215 bp ukazuju na prisustvo *GSTT1* aktivnog i *GSTMI* aktivnog genotipa (homozigoti +/+ ili heterozigoti +/-). Uzrci 7 i 8 pokazuju traku veličine 215 bp, odnosno prisustvo *GSTMI* aktivnog genotipa (homozigot +/+ ili heterozigot +/-). U uzorcima 4, 5 i 11 odsustvo traka veličine 480 bp i 215 bp ukazuje na prisustvo *GSTT1* nultog i *GSTMI* nultog genotipa (homozigot -/-). M predstavlja marker molekulskih masa.

3.4. Određivanje *GSTP1* rs1695 i rs1138272 polimorfizama

Polimorfizmi jednog nukleotida (*eng. single nucleotide polymorphism, SNP*) *GSTP1**Ile105Val rs1695 i *GSTP1**Ala114Val rs1138272 su određivani korišćenjem kvantitativnog PCR (*qPCR*) primenjenog biosistema (*Taqman Drug Metabolism Genotyping*), sa identifikacionim brojevima C_3237198_20 i C_1049615_20 (*Applied Biosystems—Foster City, CA, USA*). Nakon razblaženja genomske DNK do konačne koncentracije od 6ng/L, 5µL uzorka je dodato u bunarčice reakcione ploče i osušeno na 65°C 30 min. Sledeće, 0,25 µL *TaqMan* probe, 2,50 µL komercijalnog *MasterMix*-a i 2,25 µL vode bez prisustva *DNAse*-a pomešano je u ukupnoj zapremini 5 µL i dodato u bunarčice. Termalni protokol za amplifikaciju gena uključivao je 4 minuta početne denaturacije i 40 ponovljenih ciklusa (15s na 95°C i 1 minut na 60°C), nakon čega su genotipovi bili analizirani prema *Eppendorf real plex* softverskom uputstvu.

3.5. Određivanje *GSTO1* i *GSTO2* polimorfizama

Polimorfizmi jednog nukleotida *GSTO1* i *GSTO2* su određivani korišćenjem *qPCR* primenjenog biosistema (*TaqMan SNP Genotyping assays*), sa identifikacionim brojevima C_11309430_30 i C_3223136_1 (*Applied Biosystems—Foster City, CA, USA*). Nakon razblaženja genomske DNK do konačne koncentracije od 6ng/L, 5 μ L uzorka je dodato u bunarčiće reakcione ploče i osušeno na 65°C 30 min. Sledeće, 0,25 μ L TaqMan probe, 2,50 μ L komercijalnog *MasterMix*-a i 2,25 μ L vode bez *DNase*-a pomešano je u ukupnoj zapremini 5 μ L i dodato u bunarčiće. Termalni protokol za amplifikaciju gena uključivao je 4 minuta početne denaturacije i 40 ponovljenih ciklusa (15s na 95°C i 1 minut na 60°C), nakon čega su genotipovi bili analizirani prema *Eppendorf real plex* softverskom uputstvu.

3.6. Statistička analiza

Statistička analiza je urađena pomoću statističkog paketa *Statistical Package for the Social Sciences*, verzija 15.0; SPSS Inc, Čikago, Illinois, SAD. Distribucije frekvencija demografskih karakteristika i potencijalnih faktora rizika za pojavu karcinoma prostate, primarno starost, pol, pušenje i prisustva komorbiditeta su određivane kod bolesnika sa karcinomom i odgovarajuće kontrolne grupe. Normalnost raspodele podataka je proverena računskim metodama (koeficijent varijacije, vrednosti skewness i kurtosis, statistički test *Shapiro-Wilk*), kao i grafičkim metodama za proveru normalnosti (histogram, normalni Q–Q grafikon, detrendovan normalni Q–Q grafikon, grafikon kutije- *engl. boxplot*). Statistička analiza je obuhvatala primenu χ^2 testa ili Fišerovog testa tačne verovatnoće za kategoričke varijable i Studentovog t-testa za kontinuirane varijable za procenu značajnosti razlike dobijenih rezultata između ispitivanih bolesnika i kontrolne grupe. Statistička analiza je

obuhvatala, pored deskriptivne statistike, procenu da li se odgovarajući genotipovi nalaze u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži i primenu χ^2 testa za determinisanje značajnosti razlike u frekvenciji dobijenih genotipova između pripadnika studijske i kontrolne grupe. Efekti genetskog polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma su procenjivani pomoću principa logističke regresije koji su korišćeni za računanje odnosa šansi (engl. *odds ratio*, *OR*), interval poverenja od 95% (CI 95%).

Statistička analiza dobijenih rezultata, na osnovu distribucije podataka je korigovana u odnosu na dijabetes melitus tipa 2 i indeks telesne mase usled mogućeg efekta u multivarijantnom logističkom regresionom modelu. Primenjena je Bonferoni post-hok korekcija. Neravnoteža vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD) između parova polimorfizma jednog nukleotida je procenjivana korišćenjem *SNPStats*. Jačina neravnoteže vezanosti je izražena kao $D'=D/D_{max}$. Individualni haplotip i njegove frekvencije su procenjivani korišćenjem EM algoritma iz *haplo.stats* paketa.

Preživljavanje bolesnika sa karcinomom prostate je analizirano pomoću Kaplan–Majer testa za određivanje ukupne verovatnoće preživljavanja. Prediktivna vrednost različitih GST genotipova se procenjivala Koks regresionim modelom. Kao vreme praćenja, uzimao se period od dijagnostikovanja bolesti do trenutka smrti, odnosno poslednje provere ishoda. Efekti genetskog polimorfizma kao i rizik za pojavu smrti od karcinoma su predstavljeni kao *hazard ratios* (HR) sa intervalom poverenja od 95% (CI 95%). P vrednost <0.05 se smatrala statistički značajnom.

4. REZULTATI

U cilju rasvetljavanja potencijalnog značaja polimorfizama citosolnih glutation transferaza (GST) u proceni rizika za pojavu karcinoma prostate, ovo istraživanje je obuhvatilo određivanje šest funkcionalnih GST polimorfizama i analizu njihovih pojedinačnih i kumulativnih efekata. Prognostički značaj polimorfizama ovih enzima je procenjivan prema četvorogodišnjem preživljavanju ovih bolesnika.

4.1. Značaj polimorfizama glutation transferaza u riziku za nastanak karcinoma prostate

Delecioni genetski polimorfizmi, *GSTM1* i *GSTT1*, kao i polimorfizmi izmene jednog nukelotida *GSTP1* rs 1695 i rs1138272, *GSTO1* rs4925 i *GSTO2* rs156697 su određivani kod 237 bolesnika sa histopatološki potvrđenim karcinomom prostate i 236 ispitanika kontrolne grupe.

4.1.1. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa karcinomom prostate

Demografske i kliničke karakteristike pacijenata i kontrolne grupe su predstavljeni u tabeli 6. Prosečna starost bolesnika sa karcinomom prostate je bila $68,81 \pm 6,91$ godina, dok je prosečna starost u kontrolnoj grupi bila $67,35 \pm 9,18$ godina. Posmatrajući tabelu 6, ne postoji statistička značajnost poredeći godine, indeks telesne mase (engl. *Body mass index*) i pušenje ($p > 0,05$), dok je prisustvo tipa 2 dijabetes melitusa, kao i hipertenzije bilo statistički značajno veće kod bolesnika sa karcinomom prostate, kada poredimo sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$ odnosno $p = 0,002$).

Vrednost PSA iznad 20 ng/ml pri postavljanju dijagnoze je bio najčešći nalaz kod pacijenata sa dijagnostikovanim karcinomom prostate (36%), a prosečna vrednost u našoj kohorti bolesnika je bila $23,41 \pm 27,48$ ng/ml. U slučaju Glison skora, kod najvećeg procenta bolesnika (30%) nalaz Glison skora bio je 7 (3+4) (tabela 6).

Tabela 6. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa karcinomom prostate i kontrolne grupe

	Bolesnici, <i>n</i> (%)	Kontrole, <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Starost*	68,81 ± 6,91	67,35 ± 9,18	0,052
<i>BMI</i> *	26,98 ± 3,48	26,52 ± 3,71	0,203
Hipertenzija			
Da	125 (58)	87 (39)	<0,001
Ne	92 (42)	135 (61)	
Tip 2 dijabetes melitusa			
Da	37 (16)	12 (7)	0,002
Ne	188 (84)	174 (93)	
Pušenje			
Da	111(48)	104 (46)	0,570
Ne	119 (52)	124 (54)	
PSA u trenutku dijagnoze (ng/ml)			
<10	78 (34)	/	/
10-20	69 (30)	/	/
>20	82 (36)	/	/
PSA u trenutku dijagnoze (ng/ml) *	23,41 ± 27,48		
Glison skor			
≤ 6	56 (27)	/	/
7 (3+4)	62 (30)	/	/
7 (4+3)	38 (18)	/	/
8	28 (14)	/	/
9/10	22 (11)	/	/

* srednja vrednost ± standardna devijacija

4.1.2. Povezanost *GSTM1* i *GSTT1* delecionih polimorfizama sa rizikom za nastanak karcinoma prostate

Distribucija najčešće određivanih delecionih *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizama je prikazana u tabeli 7. Kao posledica delecije odgovarajućeg gena, nosioci *GSTM1*-nultog odnosno *GSTT1*-nultog genotipa nemaju odgovarajući enzim. Distribucija *GSTM1*-nultog genotipa u kontrolnoj grupi je pokazana u 44% ispitanika, odnosno u 34% ispitanika za nosioce *GSTT1*-nultog genotipa. Prema rezultatima može se uočiti da nije postojala statistički značajna povezanost, kako pojedinačnih *GSTM1* ili *GSTT1* polimorfizama, tako i kombinovanog efekta ovih polimorfizama i rizika za nastanak karcinoma prostate ($p > 0,05$).

Tabela 7. Distribucija pojedinačnih i kombinovanih *GSTM1* i *GSTT1* genotipova kod bolesnika sa karcinomom prostate i kontrola

Genotip	Bolesnici, <i>n</i> (%)	Kontrole, <i>n</i> (%)	OR (95% CI) ^a	<i>p</i>
<i>GSTM1</i>				
<i>GSTM1</i> -aktivni	147 (62)	131 (56)	1,0	
<i>GSTM1</i> -nulti	90 (38)	104 (44)	0,77 (0,51-1,15)	0,203
<i>GSTT1</i>				
<i>GSTT1</i> - aktivni	148 (62)	156 (66)	1,0	
<i>GSTT1</i> -nulti	89 (38)	79 (34)	1,11 (0,73-1,70)	0,625
<i>GSTM1/GSTT1</i>				
<i>M1/T1</i> - aktivni	86 (36)	85 (36)	1,0	
<i>M1</i> -nulti / <i>T1</i> -aktivni	62 (26)	71 (30)	0,85 (0,51-1,41)	0,525
<i>M1</i> -aktivni/ <i>T1</i> -nulti	61 (26)	46 (20)	1,23 (0,71-2,13)	0,453
<i>M1/T1</i> -nulti	28 (12)	33 (14)	0,79 (0,41-1,49)	0,461

^a OR-Odnos šansi, CI 95%-95% interval poverenja; vrednosti su prilagođene za godine, HT i DM2

4.1.3. Povezanost *GSTP1* rs1695 i rs1138272 polimorfizama sa rizikom za nastanak karcinoma prostate

U ovom istraživanju su određivana dva bliska polimorfizma gena za *GSTP1* na poziciji 105 koji dovodi do supstitucije izoleucina (*Ile*) u valin (*Val*) (rs1695 c.313A > G, p.Ile105Val) i na poziciji 114, koji dovodi do promene alanina (*Ala*) u valin (*Val*) (rs1138272 c.341C > T, p.Ala114Val). Za oba *GSTP1* polimorfizma, najčešće prisutan alel je smatran referentnim, za razliku od varijantnog alela koji je procentualno bio manje zastupljen. U slučaju rs1695, uočeno je da je u kontrolnoj grupi referentni *GSTP1**Ile/Ile genotip imalo 46% ispitanika, 40% su bili heterozigotni nosioci *GSTP1**Ile/Val genotipa i 14% ispitanika je imalo varijantni *GSTP1**Ile/Val genotip. Određivanje rs1138272 polimorfizma je pokazalo prisustvo referentnog *GSTP1**Ala/Ala genotipa kod 87% ispitanika, *GSTP1**Ala/Val genotipa kod 12% ispitanika i *GSTP1**Val/Val genotipa kod 1% ispitanika kontrolne grupe.

Naši rezultati pokazuju da su nosioci makar jednog *GSTP1**Val (rs1695) alela bili u 1,8 puta većem riziku od nastanka karcinoma prostate u poređenju sa nosiocima oba referentna alela ($p = 0,006$). Taj rizik je bio još izraženiji u slučaju nosioca oba varijantna *GSTP1**Val (rs1695) alela (OR=1,99; 95%CI: 1,08–3,68; $p=0,028$). Slično, nosioci *GSTP1**Val (rs1138272) alela su imali blizu 5 puta veći rizik od nastanka karcinoma prostate, u poređenju sa osobama sa oba referentna alela (OR=4,93; 95%CI: 2,89–8,40; $p < 0,001$). Šta više, ovaj rizik je bio čak 7 puta veći u slučaju oba varijantna *GSTP1**Val (rs1138272) alela (OR = 7,16; 95%CI: 1,54–33,26; 0,012). Bitno je istaći da je Hardi-Vajnbergova ravnoteža svih *GST* genotipova potvrđena kod bolesnika sa karcinomom prostate i pripadnika kontrolne grupe ($p > 0,05$). Rezultati distribucije genetskih varijanti dva funkcionalna *GSTP1* polimorfizama je prikazana u tabeli 8.

Tabela 8. Distribucija *GSTP1* genotipova rs1695 i rs1138272 kod bolesnika sa karcinomom prostate i kontrola

Genotip	Bolesnici, <i>n</i> (%)	Kontrole, <i>n</i> (%)	OR (95% CI) ^a	<i>p</i>
<i>GSTP1</i> rs1695				
*IleIle	83 (35)	107 (46)	1,0	
*IleVal	114 (48)	95 (40)	1,74 (1,12-2,72)	0,014
*ValVal	40 (17)	32 (14)	1,99 (1,08-3,68)	0,028
*IleVal + ValVal	154 (65)	127 (54)	1,80 (1,19-2,73)	0,006
<i>GSTP1</i> rs1138272				
*AlaAla	135 (57)	184 (87)	1,0	
*AlaVal	89 (38)	26 (12)	4,71 (2,70-8,20)	<0,001
*ValVal	11 (5)	2 (1)	7,16 (1,54-33,26)	0,012
*AlaVal + ValVal	100 (43)	28 (13)	4,93 (2,89-8,40)	<0,001

4.1.4. Povezanost *GSTP1* haplotipa sa rizikom za nastanak karcinoma prostate

Imajući u vidu da su određivani polimorfizmi *GSTP1* gena, *GSTP1**Ile105Val rs1695 i *GSTP1**Ala114Val rs1138272 prostorno bliski i odvojeni za otprilike 1kb, u daljem istraživanju je bilo značajno ispitati potencijalnu povezanost haplotipa sa rizikom za nastanak ovog karcinoma. U analizi neravnoteže vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*-LD) dobijena je *D'* od 0.48, koji je ukazao na postojanje povezanosti između određivanih polimorfizama. Naime, kao rezultat ovih polimorfizama, opisuju se četiri specifična *GSTP1* haplotipa: *GSTP1**A (Ile105/Ala114), *GSTP1**B (Val105/Ala114), *GSTP1**C (Val105/Val114) i *GSTP1**D (Ile105/Val114). Naši rezultati su pokazali da je najčešći haplotip kod bolesnika sa karcinomom prostate bio *GSTP1**A (51%), slično kao i u kontrolnoj grupi (64%), uzimajući u obzir referentne alele u oba *GSTP1* polimorfizma (*GSTP1**Ile rs1695 + *GSTP1**Ala rs1138272) (Tabela 9). Nosioци *GSTP1**C haplotipa, koji čine oba varijantna alela

(*GSTPI**Val rs1695 + *GSTPI**Val rs1138272) su imali 5,46 puta veći rizik od nastajanja karcinoma prostate, u poređenju sa osobama sa najčešćim haplotipom (OR = 5,46; 95%CI = 2,56–11,65; p < 0,001) (Tabela 7). Najmanje zastupljen haplotip je bio *GSTPI**D kod bolesnika (8%), a i kontrola (2%), uzimajući u obzir i referentne u *GSTPI* rs1695 (*GSTPI**Ile), a i varijantne *GSTPI* rs1138272 alele (*GSTPI**Val). Ipak, osobe sa ovim haplotipom su imale otprilike 2,5 puta veći rizik za nastanak karcinoma prostate u poređenju sa *GSTPI**A haplotipom (OR = 2,40; 95%CI = 1,08-5,34; p = 0,033) (Tabela 9).

Tabela 9. Distribucija *GSTPI* rs1695/rs1138272 haplotipa kod bolesnika sa karcinomom prostate i kontrolne grupe

Haplotip	<i>GSTPI</i> rs1695	<i>GSTPI</i> rs1138272	Kontrole (%)	Bolesnici (%)	OR (95% CI) ^a	p
A	*A	*C	64	51	1,00	
B	*G	*C	29	25	1,33 (0,89-1,99)	0,170
C	*G	*T	5	16	5,46 (2,56-11,65)	<0,001
D	*A	*T	2	8	2,40 (1,08-5,34)	0,033

^aOR-Odnos šansi, CI 95%-95% interval poverenja; vrednosti su prilagođene za godine, HT i DM tip 2;

4.1.5. Kumulativni efekat GST polimorfizama u proceni rizika za nastanak karcinoma prostate

Za evaluaciju potencijalnih kumulativnih efekata GST polimorfizama u proceni rizika za nastanak karcinoma prostate, urađena je regresiona analiza prema broju povezanih rizičnih alela (*GSTMI*-aktivni, *GSTTI*-nulti, *GSTPI**Val rs1695 i *GSTPI**Val rs1138272). Rezultati koji su prikazani u tabeli 10, su pokazali statistički značajno povećanje u riziku za nastanak karcinoma prostate, od 3,65 puta kod nosioca dva rizična alela (OR=3,65; 95%CI = 1,55-8,61; p = 0,003) do približno 12 puta kod nosioca sva 4 rizična alela (OR = 11,71; 95%CI = 3,05-

44,93; $p < 0,001$). Zanimljivo je da su čak 22 ispitanika sa karcinomom prostate bili nosioci sva 4 “rizična” *GST* genotipa, za razliku od samo 4 ispitanika kontrolne grupe. Prema dobijenim rezultatima, zaključuje se da su “rizični” *GST* genotipovi pokazali sinergistički efekat, kojim se može objasniti značajno veći rizik za razvoj ovog karcinoma.

Tabela 10. Kumulativni efekat *GST* rizičnih genotipova u proceni rizika za nastanak karcinoma prostate

Genotip	Bolesnici, n (%)	Kontrole, n (%)	OR (95%CI) ^a	p
<i>GSTM1-aktivni, GSTT1-multi, GSTP1*Val rs1695 i GSTP1*Val rs1138272</i>				
0 rizičnih alela	11 (5)	25 (12)	1,0	
1 rizičan alel	63 (27)	81 (39)	2,06 (0,87-4,89)	0,100
2 rizična alela	82 (35)	66 (31)	3,65 (1,55-8,61)	0,003
3 rizična alela	57 (24)	34 (16)	4,30 (1,74-10,59)	0,002
4 rizična alela	22 (9)	4 (2)	11,71 (3,05-44,93)	<0,001

4.1.6. Povezanost polimorfizama *GSTO* klase sa rizikom za nastanak karcinoma prostate

Distribucija *GSTO1* rs 4925 i *GSTO2* rs156697 genotipova je prikazana u tabeli 11. Kako je i prikazano, nosioci varijantnog *GSTO1**A/A genotipa su imali 2,1 puta veći rizik od razvijanja karcinoma prostate, u poređenju sa nosiocima referentnog *GSTO1**C/C genotipa (95%CI: 1,06-4,23; $p = 0,033$). Logistička regresiona analiza *GSTO2* rs156697 polimorfizma je pokazala da nosioci heterozigotnog genotipa *GSTO2**A/G imaju 1,6 puta veći rizik u podložnosti za razvoj karcinoma prostate, u poređenju sa nosiocima referentnog *GSTO2**A/A genotipa (95%CI: 1,02-2,49; $p = 0,041$). Ovaj rizik je bio izraženiji kod nosioca *GSTO2**A/G ili *GSTO2**G/G genotipa u poređenju sa nosiocima referentnog genotipa (OR=1,75; 95%CI: 1,14-

2,68; p=0,010), a najveći rizik za pojavu karcinoma prostate je uočen za varijantni *GSTO2**G/G genotip (OR=2,55; 95% CI:1,28-5,08; p=0,008). Na nivou alela, *GSTO2**G održava 1,48 puta veći rizik za pojavu bolesti nego *GSTO2**A alel (p =0,005). Kada su *GSTO1* rs4925 i *GSTO2* rs156697 polimorfizmi analizirani u kombinaciji, nosioci bar jednog varijantnog *GSTO1**A i *GSTO2**G alela su imali 1,8 puta veći rizik za nastajanje karcinoma prostate, u poređenju sa referentnom kombinacijom genotipa (95% CI:1,07-2,96, p=0,026) (Tabela 11).

Tabela 11. Distribucija pojedinačnih i kombinovanih *GSTO1* rs4925 i *GSTO2* rs156697 genotipova u kontrolnoj grupi i kod bolesnika sa karcinomom prostate

Genotip	Kontrole, n (%)	Bolesnici, n (%)	OR (95% CI)*	p
<i>GSTO1</i> rs4925^a				
*C/C	82 (37)	68 (31)	1.00	
*C/A	115 (52)	116 (53)	1.34 (0.85-2.13)	0.210
*A/A	23 (11)	36 (16)	2.12 (1.06-4.23)	0.033
*C/C	82 (37)	68 (31)	1.00	
*CA+*AA	138 (63)	152 (69)	1.47 (0.94-2.28)	0.090
*C	277 (63)	254 (57)	1.00	
*A	161 (37)	188 (43)	1.27 (0.97-1.67)	0.080
<i>GSTO2</i> rs156697^b				
*A/A	95 (45)	74 (32)	1.00	
*A/G	97 (46)	119 (52)	1.59 (1.02-2.49)	0.041
*G/G	20 (9)	36 (16)	2.55 (1.28-5.08)	0.008
*A/A	95 (45)	74 (32)	1.00	
*AG+*GG	117 (55)	155 (68)	1.75 (1.14-2.68)	0.010
*A	285 (68)	269 (58)	1.00	
*G	137 (32)	191 (42)	1.48 (1.12-1.94)	0.005
Kombinovani <i>GSTO1</i> rs4925/<i>GSTO2</i> rs156697 genotipovi				
*CC/*AA	57 (28)	49 (23)	1.00	
*CC/*AG+*GG	20 (10)	18 (8)	1.30 (0.55-3.05)	0.553
*CA+*AA/*AA	35 (17)	20 (9)	0.87 (0.41-1.83)	0.715
*CA+*AA/*AG+*GG	92 (45)	129 (60)	1.78 (1.07-2.96)	0.026

*OR-odnos šansi prilagođavan za godine, hipertenziju i DM tip 2 za genotipove, 95% CI-95% interval poverenja; ^aZa *GSTO1* rs4925, genotipizacija je bila uspešna kod 220 od 236 kontrola i 220 od 237 uzoraka pacijenata; ^bZa *GSTO2* rs156697, genotipizacija je bila uspešna kod 212 of 236 kontrola i 229 od 237 uzoraka pacijenata

Rezultati individualnih i kombinovanih efekata GSTO polimorfizama obuhvaćeni logističkom regresionom analizom, su takođe potvrđeni analizom haplotipa, rađenoj prema neravnoteži vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*) koja je nađena između ovih polimorfizama jednog nukleotida ($D'=0,66$, $p<0,001$). Najčešće prisutan haplotip u kontrolnoj grupi (55%) i grupi pacijenata (50%) je bio H1 haplotip, koji su činili referentni *GSTO1**C i *GSTO2**A aleli. S druge strane, nosioci H2 haplotipa, koji su činili oba varijantna *GSTO1**A i *GSTO2**G alela, su imali značajno veći rizik od nastanka karcinoma prostate kada poredimo sa nosiocima H1 haplotipa (OR=1,59, 95% CI:1,12-2,25, $p=0,009$) (Tabela 12).

Tabela 12. Haplotipovi *GSTO1 rs4925* i *GSTO2 rs156697* i rizik za nastanak karcinoma prostate

Haplotip	<i>GSTO1</i> <i>rs4925</i>	<i>GSTO2</i> <i>rs156697</i>	Kontrole, %	Bolesnici, %	OR (95% CI) ^a	p
H1	*C	*A	55	50	1,00	
H2	*A	*G	25	34	1,59 (1,12-2,25)	0,009
H3	*A	*A	12	9	0,98 (0,55-1,74)	0,940
H4	*C	*G	8	7	1,41 (0,72-2,77)	0,320

Globalna haplotipska povezanost $p=0,045$; ^aOR-odnos šansi prilagođavan za godine, hipertenziju i DM tip 2, 95% CI-95% interval poverenja;

4.1.7. Kumulativni efekat GST polimorfizama kod bolesnika stratifikovanih prema riziku za progresiju

Prema vodiču Evropske asocijacije urologa bolesnici sa karcinomom prostate su dalje stratifikovani prema riziku za progresiju bolesti na sledeći način: nizak rizik ukoliko su ispunjena sva tri uslova, PSA ≤ 10 ng/mL, GS ≤ 6 i T1-T2a, srednji rizik ukoliko je ispunjen bar jedan od tri uslova, PSA 10-20 ng/mL i/ili GS7 i/ili T2b, a visoki rizik ukoliko je PSA >20 ng/mL ili GS 8-10 ili $\geq T2c$. Na osnovu ove kategorizacije, 20 bolesnika (9%) je imalo nizak rizik, 82 (39%) je bilo u grupi sa srednjim i 112 (52%) u grupi visokog rizika. Podaci nisu bili dostupni za 23

bolesnika sa karcinomom prostate. Naši rezultati nisu pokazali povezanost kumulativnog efekta GST polimorfizama sa rizikom za progresiju bolesti ($p < 0,05$) (tabela 13).

Tabela 13. Efekat “rizičnih” GST genotipova kod bolesnika stratifikovanih prema riziku za progresiju

Genotip	Rizik za progresiju bolesti			p
	Nizak, n (%)	Srednji, n (%)	Visoki, n (%)	
<i>GSTM1*aktivni + GSTT1*multi + GSTP1 rs1695*Val + GSTP1 rs1138272*Val</i>				
0 rizičnih alela	1 (5)	4 (5)	5 (5)	0.936
1 rizični alel	6 (30)	27 (33)	26 (23)	
2 rizična alela	7 (35)	26 (32)	44 (39)	
3 rizična alela	5 (25)	18 (22)	28 (25)	
4 rizična alela	1 (5)	6 (8)	9 (8)	

4.2. Značaj polimorfizma gena za GST u prognozi pacijenata sa karcinomom prostate

Pacijenti su praćeni maksimalno 50 meseci (od januara 2014. do marta 2018.), do smrti ili završetka perioda praćenja. Medijana praćenja je bilo 42 meseca (u opsegu od 1-50 meseci). Kaplan-Majerova analiza je korišćena za izračunavanje srednjeg vremena preživljavanja i formiranja krive preživljavanja. Evaluacija varijacije u vremenu preživljavanja između različitih GST genotipova je rađena log rank testom. Tokom perioda praćenja 23 pacijenta su umrli od karcinoma prostate i 3 pacijenta su izgubljena iz praćenja. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih na osnovu preživljavanja u ovom periodu su prikazane u tabeli 14.

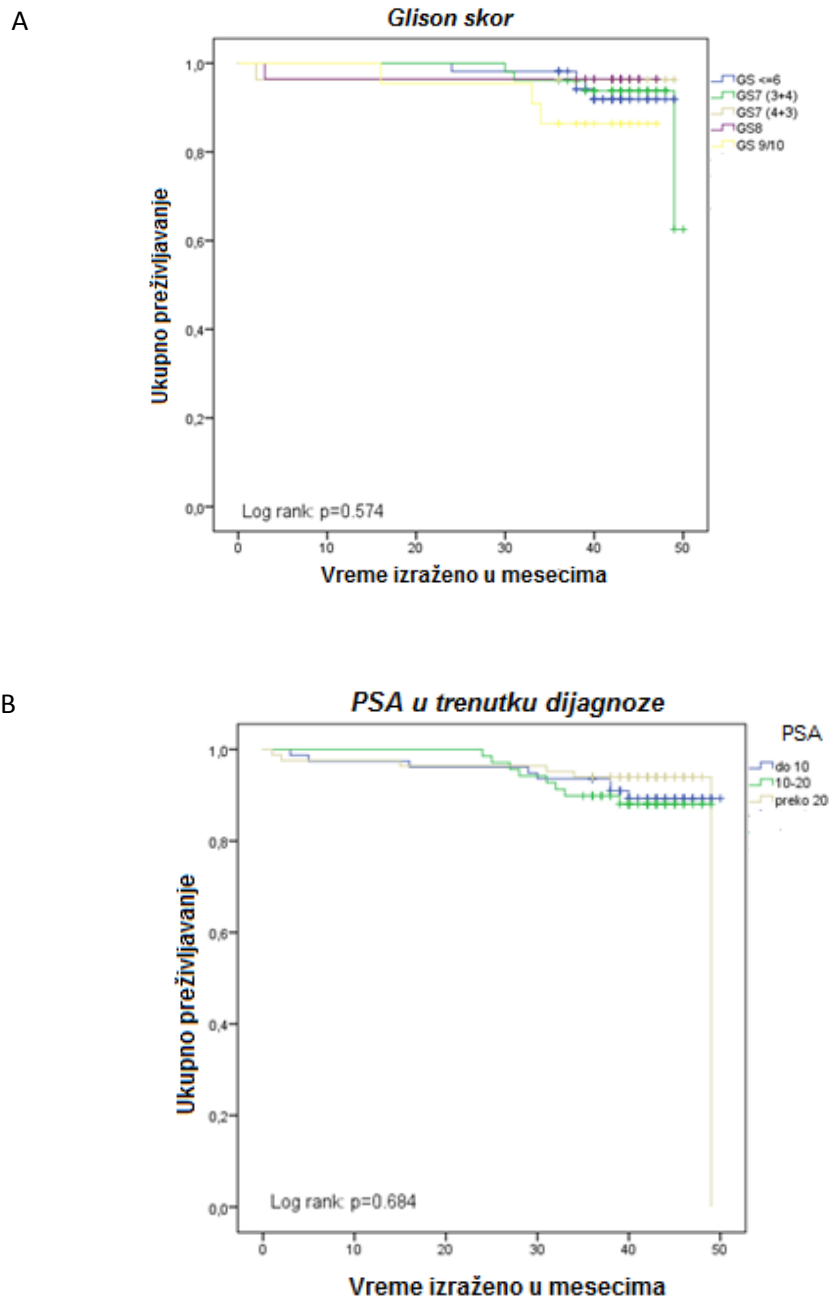
Tabela 14. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih na osnovu preživljavanja

Parametar	Bolesnici, n (%)		
	Preminuli	Zivi	p**
Starost ^a	71.32 ± 7.03	68.55 ± 6.87	0,074
Period praćenja (meseci) ^a	26.23 ± 13.26	42.44 ± 3.23	<0,001
BMI (kg/m²)^b			
< 25	7 (32)	64 (30)	0,906
25-29.9	10 (45)	105 (50)	
≥ 30	5 (23)	41 (20)	
Hipertenzija^c			
da	14 (67)	111 (57)	0,377
ne	7 (33)	85 (43)	
DMT2^d			
da	7 (32)	30 (15)	0,041
ne	15 (68)	173 (85)	
Pušenje^e			
da	9 (43)	102 (49)	0,603
ne	12 (57)	107 (51)	
PSA u trenutku dijagnoze (ng/ml)			
<10	8 (35)	70 (33)	0,639
10-20	8 (35)	61 (29)	
>20	6 (26)	76 (35)	
nepoznato	1 (4)	7 (3)	
Glison skor			
≤ 6	4 (17)	52 (24)	0,703
7 (3+4)	5 (22)	57 (27)	
7 (4+3)	3 (13)	35 (16)	
8	1 (4)	27 (13)	
9/10	3 (13)	19 (9)	
nepoznato	7 (31)	24 (11)	

*Srednja vrednost = standardna devijacija; **p vrednost χ^2 ili Fišerovog testa za kategoričke varijable i t-testa za dva nezavisna uzorka za kontinuirane varijable; ^a vreme u mesecima od datuma uključenja u studiju do datuma smrti (n=23) ili do kraja perioda praćenja (n=214) izraženo kao srednja vrednost= standardna devijacija; ^b informacije su bile dostupne za 173 od 236 kontrola i 232 od 237 pacijenata; ^c Informacije su bile dostupne za 222 od 236 kontrola i 2317 od 237 pacijenata; ^d Informacije su bile dostupne za 186 od 236 kontrola i 228 od 237 pacijenata; ^e pušači su bili bolesnici koji su se izjašnjavali kao pušači u trenutku uključenja u studiju; informacije su bile dostupne za 228 od 236 kontrola i 230 od 237 pacijenata.

U grupi bolesnika koji su preminuli 67% je imalo hipertenziju, a 32% tip 2 dijabetes melitusa. Analizom Glison skora u vreme dijagnoze karcinoma prostate, pokazano je da je u grupi bolesnika koji su umrli 39% u vreme dijagnoze imalo Glison skor ≤ 6 i 7 (3+4), dok je 51%

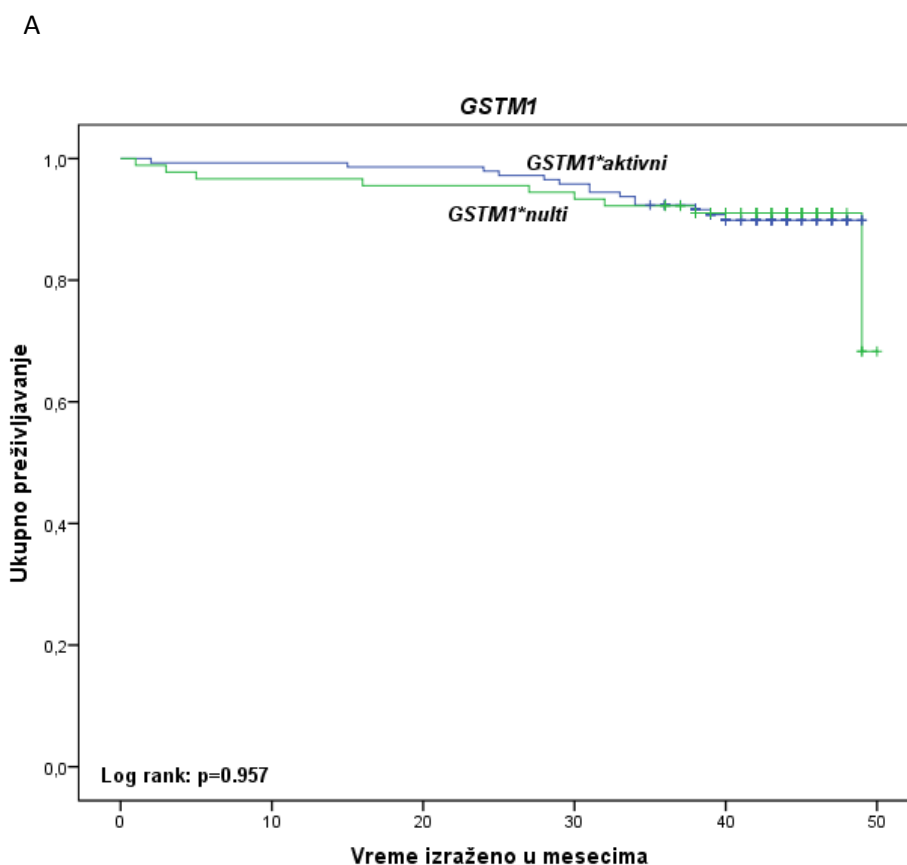
bolesnika sa ovim skorom zabeleženo u podgrupi živih. S obzirom da Glison skor može ima važnu ulogu u prognozi, određivana je Kaplan-Majer kriva preživljavanja bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih prema Glison skoru (A) i PSA u trenutku dijagnoze (B) (Slika 7). Ovi rezultati pokazuju da nije bilo statističke značajnosti u preživljavanju bolesnika stratifikovanih ni prema Glison skoru ($p=0,574$), ni prema PSA u trenutku dijagnoze bolesti ($p=0,684$).



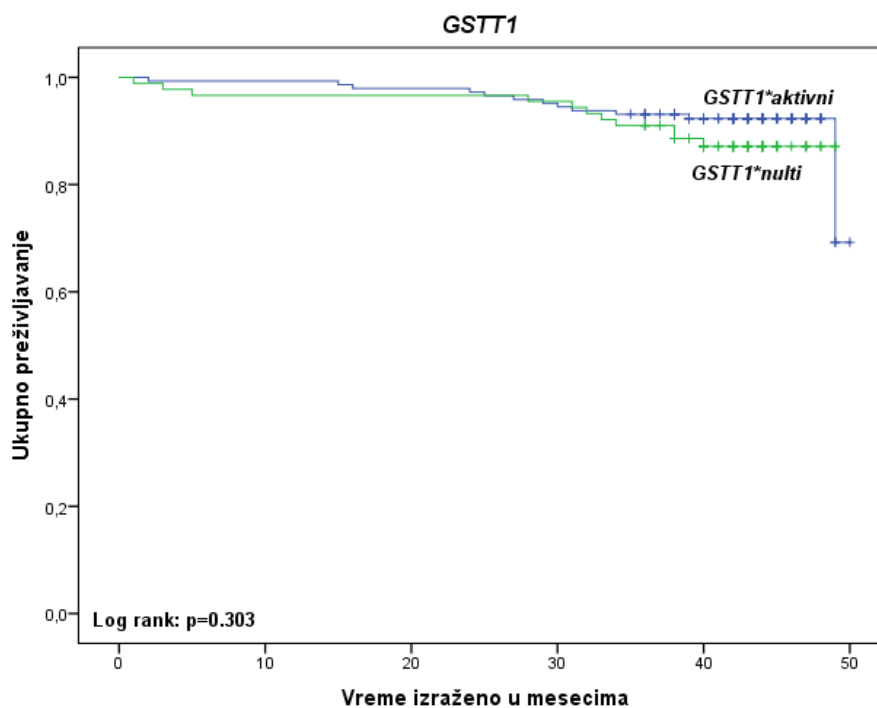
Slika 7. Kaplan-Majer kriva preživljavanja bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih prema Glison skoru (A) i PSA u trenutku dijagnoze (B)

4.2.1. Efekti GST polimorfizama na ukupno preživljavanje kod bolesnika sa karcinomom prostate

Za sve ispitivane GST polimorfizme urađena je Kaplan-Majer analiza preživljavanja. Pojedinačni delecioni *GSTM1* i *GSTT1* polimorfizmi nisu pokazali modulirajući efekat na ukupno preživljavanje među ovim bolesnicima ($p=0,957$ odnosno $p=0,303$) (slika 8). S druge strane, zanimljivo je da je kod nosilaca kombinovanog *GSTM1*-nultog/*GSTT1*-nultog genotipa zabeleženo kraće vreme preživljavanja, u poređenju sa nosiocima oba aktivna genotipa, iako bez statističke značajnosti ($43,05 \pm 2,72$ odnosno $46,65 \pm 0,87$ meseci) (tabela 15).



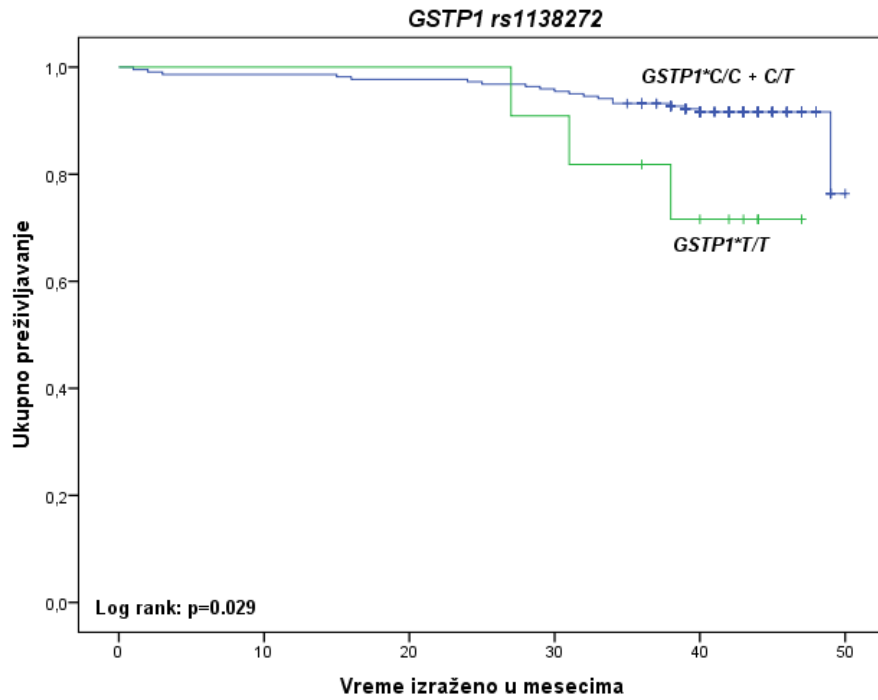
B



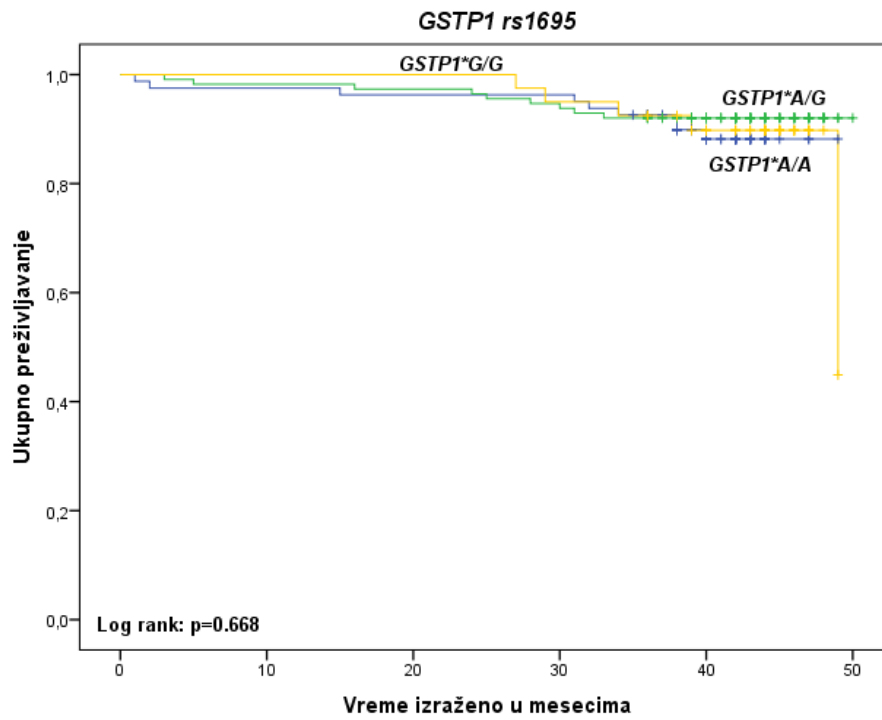
Slika 8. Kaplan-Majer kriva preživljavanja bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih prema *GSTM1* (A) i *GSTT1* genotipovima (B)

Kaplan-Majer ova analiza preživljavanja je pokazala statistički značajan efekat *GSTP1* rs1138272 polimorfizma na ukupno preživljavanje među pacijentima sa karcinomom prostate (Slika 9A). Naime, nosioci *GSTP1**T/T genotipa su imali kraće ukupno preživljavanje ($p=0,029$) u poređenju sa nosiocima bar jednog *GSTP1**C referentnog alela. Drugi *GSTP1* rs1695 polimorfizam nije imao statistički značajan efekat na ukupno preživljavanje među bolesnicima sa karcinomom prostate (Slika 9B).

A

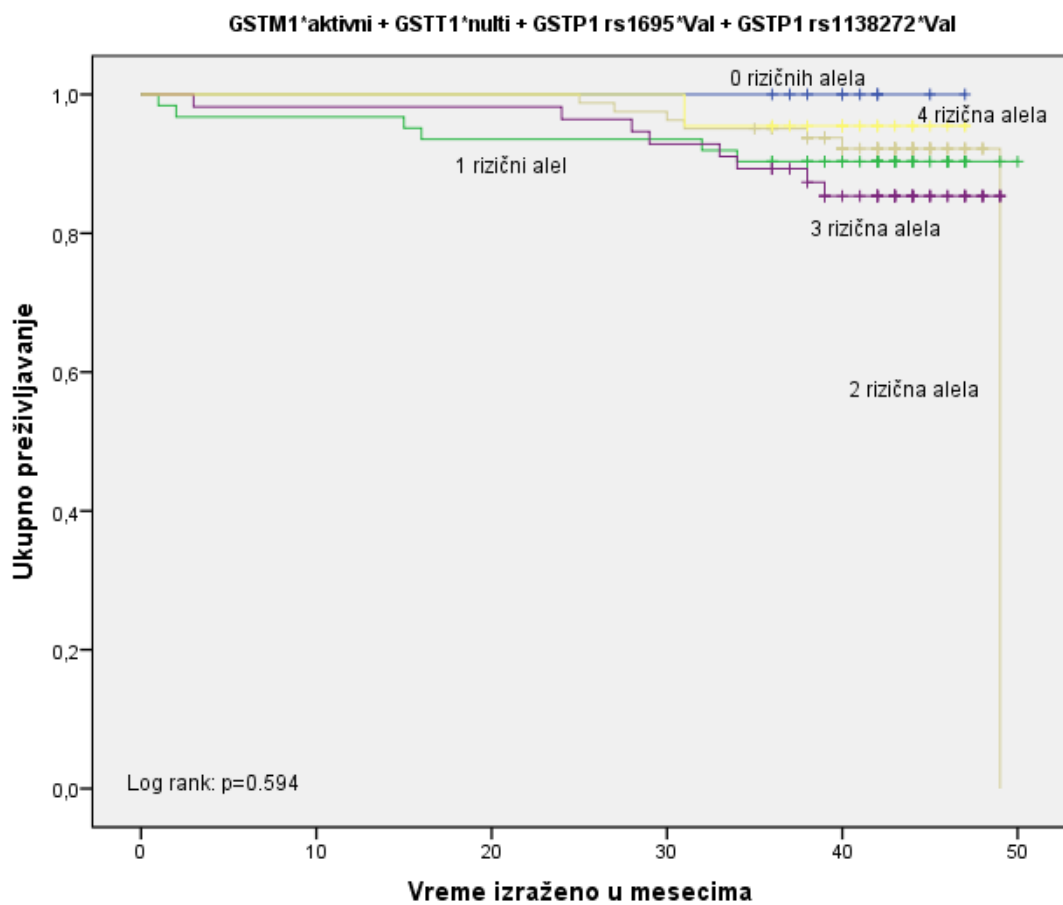


B



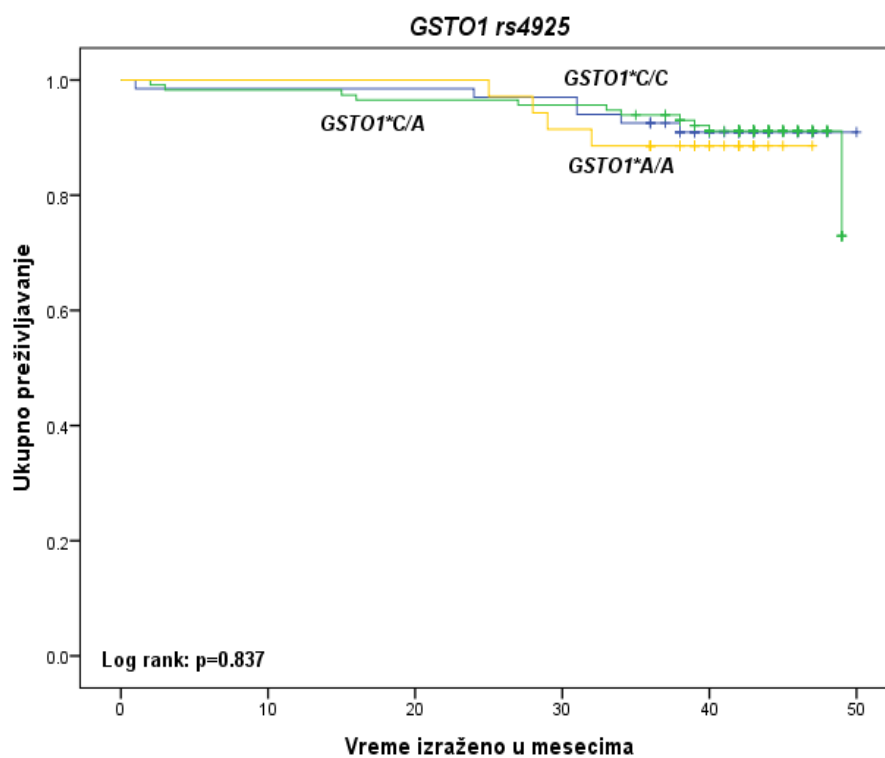
Slika 9. Kaplan-Majer kriva preživljavanja bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih prema *GSTP1* rs1138272 (A) i *GSTP1* rs4925 genotipovima (B)

Uzimajući u obzir da je pokazan kumulativni efekat GST polimorfizama (*GSTM1*-aktivni, *GSTT1*-nulti, *GSTP1**Val rs1695 i *GSTP1**Val rs1138272) u riziku za nastanak karcinoma prostate, izvedena je Kaplan-Majer ova analiza preživljavanja prema broju povezanih rizičnih alela. Ovi rezultati pokazuju da nema statistički značajne razlike u preživljavanju bolesnika stratifikovanih prema broju rizičnih alela ($p=0,594$) (Slika 10).

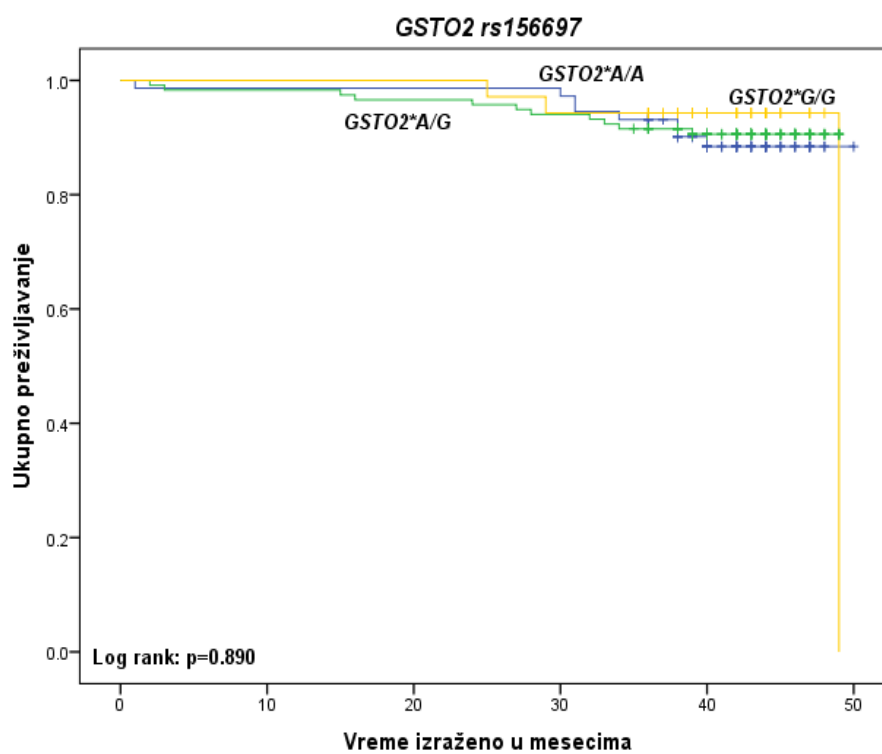


Slika 10. Kaplan-Majer kriva preživljavanja bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih prema broju rizičnih GST genotipova

A



B



Slika 11. Kaplan-Majer kriva preživljavanja bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih prema *GSTO1* (A) i *GSTO2* genotipovima (B)

GSTO1 i GSTO2 polimorfizmi nisu imali modulirajući efekat na preživljavanje bolesnika sa karcinomom prostate (Slika 11).

Tabela 15. Srednje vreme preživljavanja kod bolesnika sa karcinomom prostate stratifikovanih prema GST genotipovima

Genotip	Vreme praćenja (meseći) ^a	95%CI ^b	Log rank	p
<i>GSTM1</i>				
GSTM1-aktivni	46.99 ± 0.56	45.89-48.10		
GSTM1-nulti	47.01 ± 1.04	44.98-49.04	0.003	0.957
<i>GSTT1</i>				
GSTT1-aktivni	47.84 ± 0.63	46.61-49.07		
GSTT1-nulti	46.07 ± 0.98	44.16-47.99	1.060	0.303
<i>GSTM1/GSTT1</i>				
M1/T1-aktivni	46.65 ± 0.87	44.95-48.36		
M1-nulti/T1-aktivni	48.28 ± 0.78	46.75-49.81		
M1-aktivni/T1-nulti	46.56 ± 0.57	45.44-47.68		
M1/T1-nulti	43.05 ± 2.72	37.73-48.38	2.581	0.461
<i>GSTP1 rs1695</i>				
*IleIle	46.34 ± 0.99	44.41-48.27		
*IleVal	47.74 ± 0.77	46.23-49.26		
*ValVal	47.30 ± 0.93	45.48-49.13	0.807	0.668
*IleVal + ValVal (dominantni)	47.68 ± 0.63	46.44-48.92	0.342	0.559
*IleIle + IleVal (recesivni)	47.53 ± 0.62	46.32-48.75	0.204	0.651
<i>GSTP1 rs1138272</i>				
*AlaAla	47.82 ± 0.70	46.44-49.19		
*AlaVal	47.26 ± 0.76	45.76-48.75		
*ValVal	42.81 ± 2.16	38.58-47.04	4.802	0.091
*AlaVal + ValVal (dominantni)	46.92 ± 0.73	45.49-48.35	0.405	0.524
*AlaAla + AlaVal (recesivni)	47.81 ± 0.53	38.58-47.04	4.792	0.029

^a srednja vrednost ± standardna greška; ^b 95% interval poverenja

4.2.2. Efekti *GST* polimorfizama na rizik za ukupno preživljavanje

Multivarijantna Koks regresiona analiza je potvrdila da je *GSTP1**T/T genotip nezavisni prediktor visokog rizika za ukupnu smrtnost kod bolesnika sa karcinomom prostate (tabela 16).

Tabela 16. Genski polimorfizmi *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTO1* rs4925, *GSTO2* rs156697, *GSTP1* rs1695 i *GSTP1* rs1138272 u proceni rizika za mortalitet kod bolesnika sa karcinomom prostate

Genotip	Model 1 ^a		Model 2 ^b	
	HR (95% CI) ^c	p	HR (95% CI)	p
<i>GSTM1</i>				
aktivni	1.00		1.00	
nulti	0.98 (0.42-2.27)	0.957	0.99 (0.42-2.34)	0.983
<i>GSTT1</i>				
aktivni	1.00		1.00	
nulti	1.53 (0.68-3.47)	0.307	1.51 (0.65-3.52)	0.335
<i>GSTO1</i> rs4925				
*C/C	1.00		1.00	
*C/A	0.99 (0.37-2.71)	0.997	1.13 (0.39-3.29)	0.818
*A/A	1.39 (0.39-4.94)	0.609	1.76 (0.47-6.59)	0.403
<i>GSTO2</i> rs156697				
*A/A	1.00		1.00	
*A/G	0.83 (0.33-2.06)	0.680	0.94 (0.37-2.44)	0.906
*G/G	0.77 (0.20-2.89)	0.695	0.86 (0.22-3.33)	0.828
<i>GSTP1</i> rs1695				
*A/A	1.00		1.00	
*A/G	0.69 (0.27-1.74)	0.430	0.77 (0.30-1.94)	0.575
*G/G	1.02 (0.34-3.07)	0.967	0.80 (0.25-2.63)	0.718
<i>GSTP1</i> rs1138272				
*C/C	1.00		1.00	
*C/T	1.05 (0.42-2.63)	0.917	1.36 (0.53-3.50)	0.524
*T/T	3.65(1.02-13.12)	0.047	4.67(1.26-17.37)	0.021

^aModel 1 predstavlja rezultate bez dodatnih faktora rizika; ^bModel 2 je prilagođavan za DM tip 2;

^cHR-hazard ratio, 95% CI-95% interval poverenja;

Naime, nosioci *GSTP1**T/T genotipa su imali 3,6 puta veći rizik od smrtnosti u odnosu na homozigotne nosioce *GSTP1**C alela u modelu 1 (HR=3,65; 95%CI: 1,02-13,12; p=0,047). U modelu 2, prilagođenom za prisustvo diabetes mellitusa tip 2, rizik od smrtnosti je povećan za više od 4 puta (HR=4,67; 95%CI: 1,26-17,37; p=0,021). Multivarijantna Koks regresiona analiza nije pokazala statistički značajnu vezu između ispitivanih *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTO1*, *GSTO2*, *GSTP1* rs1695 polimorfizama i ukupnog preživljavanja.

5. DISKUSIJA

Superfamiliju glutation transferaza (GST), tradicionalno prepoznatu kao familija enzima faze II ćelijske detoksikacije, sačinjavaju multifunkcionalni enzimi sa širokim repertoarom kataličkih funkcija (Mannervik B. i sar, 1988; Hayes JD. i sar, 2000; Plješa-Ercegovac M. i sar, 2018.) Pored njihovih raznovrsnih kataličkih uloga, GST su takođe prepoznate i kao regulatori ćelijske proliferacije i signalnih puteva preživljavanja. Smatra se da interindividualne varijacije koje nastaju kao posledica funkcionalnih polimorfizama citosolnih GST determinišu individualni odgovor na izloženost različitim egzogenim i endogenim ksenobioticima, uključujući i kiseonične slobodne radikale i proizvode oksidativnog stresa. Povezanost polimorfizama gena za ovu veliku familiju detoksikacionih enzima i njihov značajan modulirajući efekat u sadejstvu sa različitim faktorima spoljašnje sredine, poput načina života, ishrane i profesionalne izloženosti je pokazan kao važan faktor koji može determinisati rizik za nastanak različitih karcinoma. U ovom istraživanju je ispitivana povezanost polimorfizma u genima za *GSTP1* (rs1695 i rs1138272), *GSTO1*, *GSTO2*, kao i delecionih *GSTM1* i *GSTT1* enzima sa rizikom za pojavu karcinoma prostate.

O značaju *GSTP1* enzima u karcinomu prostate govore i skoriji podaci koji su pokazali da je neoplastična transformacija u tkivu prostate preko utišavanja *GSTP1* tumor-supresorske funkcije, može biti posredovana aktivacijom *c-myc* (Boldrini L. i sar, 2019), dok je značajan protektivni efekat u ovom procesu dobijen posle ekspresije *GSTP1*, *in vitro* i *in vivo* (Wang XX. i sar, 2017). Uzimajući u obzir da metilacija promotorskog regiona gena za *GSTP1* predstavlja jednu od važnih fenotipskih karakteristika ovog karcinoma, u dosadašnjim istraživanjima je posebnu pažnju privukao SNP polimorfizam rs1695, koji dovodi do

supstitucije izoleucina (*Ile*) u valin (*Val*) na poziciji 105 u aminokiselinskom lancu, što uslovljava izmenjenu kako katalitičku, tako i regulatornu ulogu ovog enzima. Iako je pokazana povezanost ovog funkcionalnog polimorfizma sa rizikom za nastanak različitih solidnih tumora, rezultati dobijeni za karcinom prostate su još uvek nedovoljno jasni. Pored toga, značaj drugog blisko povezanog SNP polimorfizma *GSTPI* rs1138272, koji dovodi do promene alanina (*Ala*) u valin (*Val*) na poziciji 114 u riziku za nastanak ovog karcinoma je od skoro predmet istraživanja.

Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da su muškarci nosioci bar jednog varijantnog alela *GSTPI**Ala/Val+Val/Val (rs1138272) ili *GSTPI**Ile/Val + Val/Val (rs1695) bili u značajno većem riziku za pojavu karcinoma prostate. Ovaj rizik je bio još izraženiji kod nosilaca oba *GSTPI* varijantna alela, koji je dodatno potvrđen i analizom haplotipa. Naime, pokazano je da su nosioci *GSTPI**C haplotipa, koji predstavlja kombinaciju oba *GSTPI* varijantna alela bili u skoro pet puta većem riziku za nastajanje karcinoma prostate, kada poredimo sa nosiocima *GSTPI**A (oba referentna alela). Do sada je najveći broj istraživanja obuhvatio upravo ispitivanje povezanosti *GSTPI* rs1695 polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma prostate, uključujući nekoliko meta-analiza, ali sa različitim zaključcima (Zhang Y. i sar, 2016; Wei B. i sar, 2013; Mo Z. i sar, 2009; Cai Q. i sar, 2013). Tako je studija Cai i saradnika pokazala značajnu povezanost ovog *GSTPI* polimorfizma među pripadnicima bele rase, za razliku od pripadnika azijske i afroameričke etničke pripadnosti (Cai Q. i sar, 2013). Rezultati druge meta-analize su pokazali značajnu vezu između *GSTPI**Ile105Val polimorfizma i rizika za nastanak karcinoma prostate, ali samo među pripadnicima azijske rase (Zhang Y. i sar, 2016). Velika meta-analiza koja je sprovedena na grupi od 5301 pacijenta i 5621 kontrole je pronašla značajnu povezanost *GSTPI**Ile105Val polimorfizma i rizika za nastajanje ovog karcinoma (Mo Z. i sar, 2009). Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa ranijim analizama, gde se ističe uloga *GSTPI**Ile105Val polimorfizma u karcinogenezi

prostate, dok je povećan rizik za nastanak karcinoma prostate nađen kod nosioca bar jednog varijantnog *GSTP1**Val alela.

Značaj drugog *GSTP1**Ala114Val rs1138272 polimorfizma u riziku za nastanak ovog karcinoma nije dovoljno istražen. Pokazano je da se *GSTP1**T/T genotip može povezati sa većim ukupnim rizikom za pojavu tumora među narodima u Africi i Aziji, a specifično sa kolorektalnim tumorima i tumorima glave i vrata kod pripadnika bele rase. Takođe, *GSTP1**CT genotip može biti u vezi sa povećanim rizikom za karcinom pluća kod pripadnika bele rase (Ding F. i sar, 2018; Wang J. i sar, 2011; Wang Y. i sar, 2003). Za razliku od najčešće ispitivanog *GSTP1**Ile105Val rs1695 polimorfizma, potencijalni efekat *GSTP1**Ala114Val rs1138272 polimorfizma na rizik za nastanak karcinoma prostate je ispitivan u samo dve studije (Cornu JN. i sar, 2017; Oskina NA. i sar, 2014). Ove studije su pokazale da među SNP polimorfizmima, *GSTP1**Ala114Val rs1138272 polimorfizam se može dovesti u vezu sa volumenom prostate koji je analiziran kod pripadnika bele rase sa lokalizovanim karcinomom prostate kojima je rađena radikalna prostatektomija (Cornu JN. i sar, 2017).

Izgleda da se funkcionalna značajnost oba ova *GSTP1* polimorfizma u riziku za nastanak karcinoma prostate može dovesti u vezu sa promenama koje nastaju i u kataličkoj i regulatornoj funkciji enzima. Naime, genetska varijacija koja dovodi do supstitucije izoleucina u valin na 105 poziciji polipeptidnog lanca rezultuje u steričkoj restrikciji H- mesta u okviru aktivnog mesta enzima, što bi moglo uticati na specifičnost prema supstratu. Tako *GSTP1**105Val varijantni enzim ima sposobnost vezivanja manje teškog supstata nego *GSTP1**105Ile alozim (Zhang Y. i sar, 2016; Moyer AM. i sar, 2008). U slučaju *GSTP1**Ala114Val rs1138272 polimorfizma, promene specifičnosti prema supstratu su prisutne zbog izmenjene sposobnosti razlikovanja planarnog i neplanarnog supstrata (Ali-Osman F. i sar, 1997). Uprkos činjenici da je poznato da je *GSTP1* uključena u detoksikaciju epoksida iz karcinogenih policikličnih aromatičnih ugljovodonika, prisutnih i u duvanskom

dimu, rezultati skorašnjih studija ne podržavaju pretpostavku da su pušači nosioci *GSTP1**Ile105Val polimorfizma u većem riziku za nastanak karcinoma prostate (Lavender NA. i sar, 2009). Još jedna grupa mogućih karcinogenih *GSTP1* supstrata su pesticidi, koji su se pokazali kao potencijalni faktori rizika za karcinom prostate (Sritharan J. i sar, 2019; Matić MG. i sar, 2014). I na kraju, pokazano je da izloženost određenim teškim metalima, a posebno kadmijumu i živi, koji stupaju u interakciju sa *GSTP1* enzimom, mogu povećati rizik za nastanak karcinoma prostate (Sritharan J. i sar, 2019; Waalkes MP. i sar, 1994; Lacorte LM. i sar, 2015). Tako, u eksperimentalnom modelu u kojem je karcinom prostate indukovan kadmijumom, snižena ekspresija *GSTP1* bila je udružena sa nastankom oksidativnog stresa (Arriazu R. i sar, 2005). Pored toga, u svojim novim istraživanjima, *Chang* i saradnici (Chang WH. i sar, 2018) su utvrdili da su kod pacijenata sa benignom hiperplazijom prostate, kadmijum, nikel i bakar bili prisutni u značajno višim koncentracijama nego u kontrolnoj grupi, dok je koncentracija žive bila viša u grupi pacijenata sa karcinomom prostate (Chang WH. i sar, 2018). Interesantno, i različite epidemiološke studije su našle povezanost između *GST* polimorfizma, uključujući *GSTP1**Ile105Val i *GSTP1**Ala114Val, i razlikama u metabolizmu i eliminaciji žive i arsena (Custodio HM. i sar, 2004; Gundacker C. i sar, 2009; Marcos R. i sar, 2006). Takođe, određena epidemiološka istraživanja, kao i *in vitro* rezultati su pokazali da *GSTP1**Ile105Val i *GSTP1**Ala114Val polimorfizmi mogu uticati na toksikokinetiku žive, uzimajući u obzir razlike u enzimskoj aktivnosti kod nosilaca određenih genskih varijanti (Goodrich JM. i sar, 2012). Na osnovu dosadašnjih rezultata o povezanosti *GSTP1* polimorfizama, izloženosti određenim teškim metalima, kao što je živa i rizika za nastanak karcinoma prostate, buduća istraživanja na značajno većem broju bolesnika mogla bi da pruže preciznije odgovore o novim faktorima rizika u nastanku ovog karcinoma.

Pored klasične katalitičke funkcije, *GSTP1* enzim takođe ispoljava regulatornu ulogu u signalnoj kaskadi posredovanoj mitogenom aktivisanim protein kinazama (eng. *Mitogen-*

activated protein kinase, MAPK) (Laborde E. 2010). Pored toga, utvrđeno je da različite polimorfne GSTP1 varijante, koje se razlikuju u amino kiselinama na pozicijama 105 i 114 polipeptidnog lanca, imaju i različite regulatorne efekte. Tako je pokazano da je GSTP1*C haplotip potentniji inhibitor signalnog molekula MAPK kaskade, c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), nego referentni GSTP1*A (Thevenin AF. i sar, 2011). Imajući u vidu ulogu JNK u apoptozi, proliferaciji, ćelijskoj migraciji i DNK reparaciji kod karcinoma prostate, kao i vezu između JNK i androgenih receptora, može se pretpostaviti da različite GSTP1 polimorfne varijante imaju i različit efekat u riziku za pojavu ovog karcinoma (Xu R. i sar, 2020). U tom smislu, naši rezultati koji pokazuju povezanost GSTP1*C haplotipa i rizika za nastanak karcinoma prostate predstavljaju potvrdu ove pretpostavke. Potrebno je istaći i da GSTP1 polimorfizmi verovatno najveći uticaj mogu imati u ranoj fazi nastanka karcinoma prostate. Naime, imajući u vidu metilaciju promotorskog regiona gena za GSTP1, kao mehanizma za sniženje ekspresije odgovarajućeg proteina u ovom karcinomu, može se pretpostaviti da ova polimorfna ekspresija pre svega utiče na rizik u ranim fazama karcinogeneze. U kasnijim fazama karcinogeneze, metilacijom GSTP1 gena ovi efekti varijantog genotipa gube na značaju, dok utišavanje gena rezultira u smanjenju ekspresije proteina i posledično funkcije. Martignano i saradnici su analizirajući tkivo prostate nakon prostatektomija dokazali metilaciju GSTP1 u preko 90% tumorskog tkiva i u oko 5% zdravog tkiva čime je potvrđeno da GSTP1 metilacija predstavlja značajan tumorski biomarker, koji bi mogao imati ulogu ranog dijagnostičkog markera (Martignano F. i sar, 2016).

U poređenju sa drugim GST klasama, omega klasa (GSTO) poseduje specifične kataličke, kao i nekataličke uloge. Naime, njihova tioltransferazna, dehidroaskorbat reduktazna i deglutationilazna aktivnost doprinose regulaciji redoks hemostaze (Board PG. i sar, 2013). GSTO2-2 ispoljava snažnu dehidroaskorbat reduktaznu aktivnost, dok GSTO1-1 ima važnu ulogu u ciklusu glutathionilacije, koji predstavlja značajan mehanizam koji reguliše funkciju

proteina katalizujući i glutationilaciju i deglutinationilaciju (Board PG. i sar, 2013). GSTO1-1 ima i mnoštvo regulatornih uloga, kao što je modulacija posttranslacione obrade proinflamatornog citokina interleukina-1 β (IL1- β) i rijanodinskih receptora (Dulhunty A. i sar, 2001). Takođe, antiapoptotička i uloga u preživljavanju GSTO1-1 je opisana kao važan aspekt hemorezistencije kod nekoliko ćelijskih tumorskih linija (Piaggi S. i sar, 2010). Do sada je opisan 31 polimorfizam *GSTO1* i 66 polimorfizma *GSTO2* gena (Mukherjee B. i sar, 2006). Dokazano je postojanje povezanosti između *GSTO1* rs4925 polimorfizma i rizika za nastanak akutne limfoblastne leukemije kod dece (Pongstaporn W. i sar, 2009), hepatocelularnog karcinoma, holangiokarcinoma (Marahatta SB. i sar, 2006) i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (Ada TG. i sar, 2013). Posmatrajući *GSTO2**A424G polimorfizam (rs156697), pokazano je da *GSTO2**G varijantni alel povećava rizik za pojavu karcinoma jajnika, ali ova veza nije pokazala statističku značajnost (Pongstaporn W. i sar, 2006). Različite studije su ispitivale potencijalnu ulogu *GSTO* polimorfizama u riziku za nastanak tumora mokraćne bešike (Djukić T. i sar, 2015; Wang YH. i sar, 2009; Lesseur C. i sar, 2012). Wang i saradnici su utvrdili da nosioci *GSTO2**G/G genotipa (rs2297235) pokazuju značajno veći rizik za pojavu karcinoma mokraćne bešike (Wang YH. i sar, 2009). Takođe su pokazali da nosioci haplotipa koji čine *GSTO1**C referentni (rs4925), *GSTO2**G varijantni (rs156697) i *GSTO2**G varijantni (rs2297235) aleli imaju povećan rizik za nastajanje karcinoma mokraćne bešike, u poređenju sa haplotipom sastavljenim od sva tri referentna alela (Wang YH. i sar, 2009). Dve studije su pokazale vezu između *GSTO2**G/G genotipa (rs156697) sa visokim rizikom za pojavu karcinoma mokraćne bešike (Djukić T. i sar, 2015; Lesseur C. i sar, 2012). Rezultati Djukić i saradnika su takođe dokazali vezu *GSTO1**C (rs4925)/ *GSTO2**G (rs156697) haplotipa sa visokim rizikom za nastajanje karcinoma mokraćne bešike (Djukić T. i sar, 2015). Interesantno, postoje i potvrde povezanosti *GSTO2**A/A referentnog genotipa (rs156697) sa povećanim rizikom za kolorektalni karcinom, kod pojedinaca sa pozitivnom porodičnom anamnezom

karcinoma (Masoudi M. i sar, 2011), kao i protektivna uloga *GSTO2**G/G varijantnog genotipa (rs156697) u riziku za pojavu karcinoma želuca (Masoudi M. i sar, 2009). Istraživanja uticaja GSTO polimorfizama i rizika za karcinom dojke su kontradiktorna (Andonova IE. i sar, 2010; Marahatta SB. i sar, 2006; Xu YT, i sar, 2014). Skorije analize izvođene u cilju ispitivanja jačine same veze GSTO polimorfizama sa rizikom za karcinom, dovele su do zaključka da se *GSTO2* rs156697 polimorfizam može povezati sa većim rizikom za karcinom dojke (Xu YT. i sar, 2014).

Naši rezultati po prvi put pokazuju da su homozigotni nosioci *GSTO1**A/A i *GSTO2**G/G varijantnog genotipa u povećanom riziku za nastajanje karcinoma prostate. Ovo je takođe potvrđeno i analizom haplotipa koja pokazuje da nosioci H2 haplotipa, koji obuhvata oba varijantna *GSTO1**A i *GSTO2**G alela predstavlja visoko rizičnu kombinaciju. Naši rezultati, koji pokazuju da su homozigotni nosioci *GSTO1**A/A varijantnog genotipa u povećanom riziku za pojavu ovog karcinoma su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja *GSTO1* polimorfizma u drugim tumorima urotrakta, kao što je svetloćelijski karcinom bubrega (Radic T. i sar, 2018). Takođe, rezultati o povezanosti *GSTO2**G varijantnog alela sa povećanim rizikom za karcinom prostate su u saglasnosti sa prethodnim studijama na karcinomu jajnika (Pongstaporn W. i sar, 2006), karcinomu dojke (Xu YT. i sar, 2014), karcinomu mokraćne bešike (Djukić T. i sar, 2015) i svetloćelijskom karcinomu bubrega (Radić T. i sar, 2018). Izgleda da svoje delovanje *GSTO1* i *GSTO2* enzimi u regulaciji redoks homeostaze ostvaruju sinergističkim mehanizmima. Prvenstveno, svoju regulatornu ulogu u redoks homeostazi *GSTO1-1* ostvaruje u ciklusu glutathionilacije, koji predstavlja značajan mehanizam koji reguliše funkciju čitavog niza proteina, uključujući i molekule signalnih puteva. Kao rezultat funkcionalnog polimorfizma, pokazano je da *GSTO1**C referentni alel pokazuje deglutathionilaznu aktivnost, za razliku od glutathionilazne aktivnosti *GSTO1**A varijantnog alela (Board PG. i sar, 2013). S obzirom na činjenicu da glutathionilacija, kao

posttranslaciona modifikacija, može uticati na aktivnost mnogih proteina uključenih u rast tumora, dok proces deglutinationilacije može dovesti do izlaganja osetljivih tiolnih grupa u tkivu prostate procesu oksidacije, može se pretpostaviti da je prisustvo oba varijantna *GSTO1* i *GSTO2* alela u procesu karcinogeneze u prostati, u situaciji kada postoji narušena redoks homeostaza doprinosi bržoj malignoj transformaciji. U toku karcinogeneze prostate, jedna od prvih molekularnih alteracija je aktivacija protoonkogeno *c-myc*, praćena prekomernom ekspresijom transkripcionog faktora, hipoksija inducibilnog faktora-1 α (eng. *Hypoxia-inducible factor*, HIF-1 α) (Boldrini L. i sar, 2019). Kao centralni molekul intratumorske hipoksije, HIF-1 α je povezan sa kraćim vremenom do biohemijskog relapsa, pojavom metastaza i hemorezistencijom kod pacijenata sa karcinomom prostate, i predstavlja najčešće mesto za ciljanu tumorsku terapiju (Vergis R. i sar, 2008, Ranasinghe WK. i sar, 2013). Interesantno, u okviru promena ćelijske redoks regulacije indukovane intratumorskom hipoksijom, skoriji dokazi pokazuju da u tumorskim ćelijama kolona dolazi do povećane ekspresije HIF-1 α , kao i nivoa njegove S-glutationilacije (Jeon D. i sar, 2018). Šta više, značaj glutathionilisanog HIF-1 α u malignoj transformaciji tumorskih ćelija karcinoma kolona Jeon i saradnici su potvrdili u eksperimentima u kojima su indukovali ekspresiju glavnog intracelularnog enzima uključenog u proces deglutinationilacije, glutaredoksina 1 (Jeon D. i sar, 2018). U uslovima hipoksije, u ovim glutaredoksin ekspresujućim ćelijama nije došlo do povećanja ekspresije HIF-1 α . Pored regulatorne uloge u glutathionilaciji, neefikasna regeneracija askorbinske kiseline, kao potencijalna posledica *GSTO2* polimorfizma, može usmeriti HIF signalni put u različitom pravcu. Naime, za aktivnost kiseonik-zavisnih protein hidroksilaza, koje su medijatori ubikvitinisko-proteazomalne degradacije HIF-1 α , koriste vitamin C kao kofaktor. Može se pretpostaviti da vitamin C- zavisna inhibicija HIF puta može obezbediti dodatni pristup za kontrolu tumorske progresije (Li Y. i sar, 2007).

Poslednja istraživanja pokazuju interakciju GSTO1 sa rijanodinskim receptorima tipa 1 (RyR1) koji stimuliše tumorske stem ćelije tokom hemioterapije (Haiquan L. i sar, 2021). Kao posledica interakcije GSTO1 sa RyR1, dolazi do aktivacije niza signalnih puteva-PYK2/SRC/STAT3 (eng. *Proline-rich tyrosine kinase 2/ Src family of Protein tyrosine kinase/ Signal transducers and activators of transcription*) i do povećanja ekspresije tumorskih stem ćelija.

Piaggi i saradnici su ispitivali udruženost ekspresije GSTO1-1 sa rezistencijom na apoptozu, indukovanu cisplatinom. Predloženi mehanizam delovanja rezistencije bi mogao biti, aktivacija dva signalna puta preživljavanja (Akt i ERK1/2), kao i inhibicija puta apoptoze (JNK1) indukovanim ekspresijom GSTO1-1 (Piaggi S. i sar, 2010). Do sada, najjači inhibitor GSTO1-1 u grupi α -hloracetamida je C1-27 (Ramkumar K. i sar, 2016). Zaista, C1-27 je pokazao obećavajuću antitumorsku aktivnost u oba, *in vitro* i *in vivo* modela, kod kolorektalnog karcinoma, bez velike sistemske toksičnosti (Ramkumar K. i sar, 2016). Usled njihovih ključnih uloga kod karcinoma, nekoliko potencijalnih ciljnih molekula PI3K/Akt signalnog puta je predloženo u terapiji karcinoma (Hayes JD. i sar, 2000).

Što se tiče moguće interakcije između gena i sredinskih faktora, važno je napomenuti da je u našoj kohorti pacijenata sa karcinomom prostate, prisustvo dijabetesa i hipertenzije bilo značajno veće kada poredimo sa kontrolnom grupom. Dosadašnja istraživanja ukazuju da ovi komorbiditeti mogu uticati nepovoljno kod uznapredovalog i metastatskog karcinoma prostate, kao i da imaju određeni uticaj na ishod nakon različitih terapijskih tretmana, uključujući androgen deprivacionu terapiju (EAU, 2020; Di Francesco S. i sar, 2019). Međutim, podaci o modifikujućem efektu GST genetskih varijacija kod bolesnika sa karcinomom prostate koji boluju od dijabetesa i hipertenzije još uvek nisu konzistentni (Hayes JD. i sar, 2000; Ge B. i sar, 2015). U svakom slučaju, rezultati naših istraživanja ukazuju na značajnu gen-gensku interakciju. Naime, dosadašnja istraživanja ukazuju na nedvosmisleni udruženi efekat

delecioni i *SNP GST* polimorfizama na ukupni individualni kapacitet za detoksikaciju ksenobiotika (Tabrez S. i sar, 2014). Iako u našem istraživanju nije pokazana veza delecioni polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* enzima i rizika za nastanak karcinoma prostate, kod muškaraca nosilaca varijantnih *GSTP1* alela i određenog delecionog *GSTM1/GSTT1* polimorfizma rizik za nastanak ovog karcinoma je bio veći, što govori o njihovom značajnom aditivnom efektu. Može se zaključiti da u riziku za nastanak karcinoma prostate važnu ulogu mogu imati brojni polimorfni geni, ističući ulogu kako gen-genske interakcije, tako i interakcije između gena i sredinskih faktora, koji determinišu osetljivost pojedinca na nastajanje samog karcinoma.

Prognostički značaj GST polimorfizama u našem istraživanju pokazan je jedino za *GSTP1* rs1138272 polimorfizam, dok polimorfizami ostalih GST klasa nisu imali prognostički značaj. Naime, statistički značajno kraće preživljavanje je dobijeno kod nosilaca *GSTP1**T/T (rs1138272) genotipa, kada poredimo sa nosiocima bar jednog referentnog alela. Takođe bolesnici sa karcinomom prostate nosioci *GSTP1**T/T genotipa su imali četverostruko veći rizik od ukupnog mortaliteta. Posmatrajući prognostičku ulogu GST polimorfizama u karcinomu prostate, potencijalni značaj je do sada pokazan za *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* rs1695 polimorfizme (Agalliu I. i sar, 2006; Cotignola J. i sar, 2013; Acevedo CA. i sar, 2014). Zaista, *GSTM1* delecioni polimorfizam je smatran kao značajni biomarker za otkrivanje bolesnika sa karcinomom prostate kod kojih postoji visok rizik od letalnog ishoda (Agalliu I. i sar, 2006), S druge strane, prognostički značaj *GSTM1*-aktivnog i *GSTT1*-nultog genotipa je pokazan kod bolesnika sa uznapredovalim tumorima (Acevedo CA. i sar, 2014). Kada su u pitanju dva često prisutna *GSTP1* polimorfizma (rs1695 i rs1138272), do sada je analiziran samo *GSTP1* rs1695 polimorfizam i pokazano je da nema prognostički značaj, što se slaže i sa našim dobijenim rezultatima (Zhang Y. i sar, 2016; Wei B. i sar, 2013).

Takođe, važno je istaći da, pored kataličke uloge u konjugaciji različitih elektrofilnih komponenti, uključujući hemioterapeutike, *GSTP1* takođe učestvuje i u procesu

glutationilacije, kao i regulacije redoks zavisnih apoptotičnih signala (Plješa-Ercegovac M. i sar, 2018). Važnost statusa glutacionilacije i poremećaja redoks homeostaze tokom progresije karcinoma prostate, je takođe istaknuta i u promeni transkripcione aktivnosti androgenog i estrogenog receptora α (Bonkhoff H. i sar, 1999; Shiota M. i sar, 2011; Zhang Y. i sar, 2018). Skorija istraživanja ukazuju da oksidativni stres, preko različitih mehanizama, uključujući i glutacionilaciju estrogenog receptora α , dovodi do konverzije androgen zavisnog u kastraciono rezistentni karcinom prostate (Xu Z. i sar, 2020.). Neka nova istraživanja trebalo bi usmeriti ka ispitivanju značaja ovog novog GSTP1 polimorfizma, kao potencijalnog biomarkera za otkrivanje bolesnika kod kojih postoji rizik za rekurenciju bolesti, kao i u stvaranju personalizovanog pristupa lečenju bolesnika sa karcinomom prostate (Cotignola J. i sar, 2013).

Odgovor na hemoterapiju kod pacijenata sa karcinomom često je ugrožena rezistencijom na lekove. Iako je hemorezistencija multifaktorijski fenomen, mnoge studije su pokazale da se izmenjeni metabolizam citostatika događa zbog povećane ekspresije enzima uključenih u biotransformaciju ovih lekova, uključujući i glutation transferaze (GST). Konkretno, prekomerna ekspresija glutation transferaze P1 (GSTP1) je i potvrđena kroz ranija klinička ispitivanja, dok je direktna inhibicija GSTP1 pokazala pozitivan efekat u primenjenoj antitumorskoj terapiji. Važno je istaći da uticaj određenih GSTP1 polimorfničkih varijanti na regulatorne nekatalitičke uloge koje ovaj enzim pokazuje, uključujući i regulatorne uloge ostalih GST enzima, mogu imati važne modulirajući efekte kako u nastanku i progresiji karcinoma prostate, delujući prvenstveno na proliferaciju tumorskih ćelija, tako i na njihov odgovor na terapiju (Singh S. 2015; Hokaiwado N. i sar, 2008). Naime, ove regulatorne uloge GST enzima su posredovane prvenstveno protein-proteinskim interakcijama sa određenim signalnim molekulima, čime moduliraju signalne puteve koji kontrolišu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu ćelija. Smatra se da je zapravo ova regulatorna uloga GST presudna

za pojavu rezistencije na primenjenu terapiju i posledičnu dalju progresiju karcinoma prostate (Singh S. 2015). Naime, pokazano je da su GST uključene u nastanak rezistencije na hormonsku terapiju, kao i u aberantnu proliferaciju tumorskih ćelija karcinoma prostate. Sa daljom progresijom karcinoma prostate dolazi do pojave smanjene osetljivosti karcinoma na androgene, androgeni receptori postaju delimično ili u potpunosti rezistentni, te dolazi do razvoja kastraciono rezistentne faze bolesti. Uloga androgenih receptora je već poznata, ali značajno mesto zauzima identifikacija regulatornih gena važnih za ovaj proces i za razumevanje mehanizama karcinogeneze prostate (Hokaiwado N. i sar, 2008). Upravo je za GSTP1 enzim pokazano da može imati važnu ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija prostate u ovoj fazi bolesti (Hokaiwado N. i sar, 2008). Različita istraživanja su vršena u cilju otkrivanja inhibitora GST. Tokom 2015. godine kroz procese fotooksidacije vršena je inhibicija GSTP1 serijom inhibitora trioksana GSTP1, koji su dalje poslužili kao osnova za razvoj novih lekova u prevazilaženju hemorezistencije (Brautigam M. i sar, 2015).

Zbog ovih specifičnih funkcija GST enzima oni sve više predstavljaju mete novih terapijskih pristupa, u smislu njihove inhibicije (Laborde E. 2010). Jedan od najviše ispitivanih GST inhibitora je etakraplatin, koji predstavlja novu supstancu koja u osnovi ima cisplatinu zajedno sa dve etakrinske kiseline koje služe kao ligandi koje dovode do ireverzibilne inhibicije enzimske aktivnosti GSTP1-1, i time direktno poboljšavaju dejstvo hemoterapije, utičući na smanjenje rezistenciju cisplatine (Li S. i sar, 2017). Različita ispitivanja poslednjih godina idu u prilog daljeg otkrivanja inhibitora GST, koji bi doveli do jačanja antitumorske efikasnosti.

U zaključku, uloga citosolne familije glutathion transferaza u regulaciji redoks homeostaze sa posebnom ulogom u ciklusu glutathionilacije/deglutathionilacije, koje pre svega imaju GSTO1 i GSTP1 enzimi, može biti potencijalni mehanizam delovanja u procesu adaptacije karcinoma prostate na oksidativni stres. Naši rezultati efekata oba varijantna *GSTO1**A/A i *GSTO2**G/G genotipa na rizik za karcinom prostate imaju potencijal da

poboljšaju razvoj biomarkera u polju urološke onkologije. Takođe, pokazan je protektivni efekat *GSTP1* haplotipa, koji obuhvata dva povezana *GSTP1 SNP* polimorfizma, i može se dovesti u vezu sa efikasnijom zaštitom protiv karcinogenih komponenti u podložnosti za nastanak ovog karcinoma. Uzimajući u obzir i rezultate efekta novog *GSTP1* polimorfizma na ukupno preživljavanje pacijenata sa karcinomom prostate, bilo bi i značajno ispitati potencijalnu vezu sa specifičnim preživljavanjem u većoj kohorti. Takođe, buduća funkcionalna istraživanja i veza između GST polimorfizama i HIF-1 α regulacije može obezbediti bolje rezultate i novu terapijsku šansu za pacijente sa karcinomom prostate.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- *GSTM1* i *GSTT1* delecioni polimorfizmi nisu pokazali modulirajući efekat u riziku za nastanak karcinoma prostate.
- Nosioци bar jednog od varijantnih *GSTP1**Val (rs1138272) ili *GSTP1**Val (rs1695) alela su bili u povećanom riziku za razvoj ovog karcinoma u poređenju sa nosiocima referentnih alela. Šta više, pokazano je da prisustvo *GSTP1**C haplotipa (*GSTP1**Val rs1695 + *GSTP1**Val rs1138272) značajno povećava ovaj rizik.
- Homozigotni nosioци oba varijantna *GSTO1**A/A i *GSTO2**G/G genotipa su bili u povećanom riziku za nastanak karcinoma prostate. Pored toga, prisustvo *H2* haplotipa (*GSTO1**A/*GSTO2**G) je potvrdilo udruženost sa povećanim rizikom za karcinom.
- Polimorfizmi glutation transferaza su pokazali kumulativni modulirajući efekat u riziku za nastanak karcinoma prostate. Naime, analiza kumulativnog efekta rizičnih GST genotipova (*GSTM1*-aktivni, *GSTT1*-nulti, *GSTP1**Val rs1695 i *GSTP1**Val rs1138272) je pokazala 3,65 puta veći rizik kod nosilaca dva rizična genotipa do oko 12 puta kod nosilaca sva četiri rizična genotipa, što upućuje na njihov sinergistički efekat u riziku za nastanak karcinoma prostate.
- Prognostički značaj *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTO1* i *GSTO2* polimorfizama nije pronađen u našoj kohorti bolesnika sa karcinomom prostate.

- Kraće preživljavanje je dobijeno kod nosilaca *GSTP1**T/T (rs1138272) genotipa u poređenju sa nosiocima bar jednog referentnog alela. Pored toga, prisustvo *GSTP1**T/T genotipa je predstavljalo četiri puta veći rizik za mortalitet kod ovih bolesnika.
- Efekti brojnih polimorfnih gena za glutathion transferase, posebno *GSTP1* i *GSTO* polimorfizama upućuju na značajnu ulogu interakcija gena u podložnosti za nastanak karcinoma prostate. Ova studija je takođe ukazala na značajnu prognostičku ulogu *GSTP1* rs1138272 polimorfizma.
- Uloga citosolne familije glutathion transferaza u regulaciji redoks homeostaze sa posebnom ulogom u ciklusu glutathionilacije/deglutathionilacije, koje pre svega imaju *GSTO1* i *GSTP1* enzimi, može biti potencijalni mehanizam delovanja u procesu adaptacije karcinoma prostate na oksidativni stres.
- Na osnovu značajnih efekata oba varijantna *GSTO1**A/A i *GSTO2**G/G genotipa, koji su pokazali povećani rizik za nastanak karcinoma prostate, određivanje polimorfizama ovih gena ima potencijal za razvoj novih genetskih biomarkera u polju urološke onkologije.

LITERATURA

- Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996;107:229–233.
- Acevedo CA, Quinones LA, Catalan J, Caceres DD, Fulla JA, Roco AM. Impact of CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms in overall and specific prostate cancer survival. *Urol Oncol.* 2014;32:280-90.
- Ada TG, Ada AO, Kunak SC, Alpar S, Gulhan M, Iscan M. Association between glutathione S-transferase omega 1 A140D polymorphism in the Turkish population and susceptibility to non-small cell lung cancer. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2013;64:61-7.
- Adolfsson J. Watchful waiting and active surveillance: the current position. *BJU Int.* 2008;102:10-4.
- Agalliu I, Lin DW, Salinas CA, Feng Z, Stanford JL. Polymorphisms in the glutathione S-transferase M1, T1, P1 genes and prostate cancer prognosis. *Prostate* 2006;66:1535-41.
- 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;272:10004–10012.
- Amin Al Olama A, Dadaev T, Hazelett DJ, Li Q, Leongamornlert D, Saunders EJ, et al. Multiple novel prostate cancer susceptibility signals identified by fine-mapping of known risk loci among Europeans. *Hum Mol Genet.* 2015;24:5589-602.

- Andonova IE, Justenhoven C, Winter S, Hamann U, Baisch C, Rabstein S, et al. No evidence for glutathione S-transferases GSTA2, GSTM2, GSTO1, GSTO2, and GSTZ1 in breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121:497-502.
- Arlen PM, Bianco F, Dahut W, D'Amico A, Figg W, Freedland S, et al. Prostate Specific Antigen Working Group guidelines on prostate specific antigen doubling time. *J Urol.* 2008;179:2181-5.
- Arriazu R, Pozuelo JM, Martín R, Rodríguez R, Santamaría L. Quantitative and immunohistochemical evaluation of PCNA, androgen receptors, apoptosis, and Glutathione-S-Transferase P1 on preneoplastic changes induced by cadmium and zinc chloride in the rat ventral prostate. *The Prostate.* 2005;63:347–357.
- Baig FA, Hamid A, Mirza T, Syed S. Ductal and Acinar Adenocarcinoma of Prostate: Morphological and Immunohistochemical Characterization. *Oman Med J.* 2015;30:162-6.
- Beckendorf V, Guerif S, Prise E, Cosset J, Bougnoux A, Chauvet B, et al. 70 Gy versus 80 Gy in localized prostate cancer: 5-year results of GETUG 06 randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;80:1056-63.
- Bhindi B, Wallis CJD, Nayan M, Farrell AM, Trost LW, Hamilton RJ, et al. The Association Between Vasectomy and Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med,* 2017;177: 1273-1286.
- Bill-Axelson A, Holmberg L, Garmo H, Taari K, Busch C, Nordling S, et al. Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Prostate Cancer - 29-Year Follow-up. *N Engl J Med.* 2018;379:2319-2329.

- Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:3267-88.
- Boldrini L, Bartoletti R, Giordano M, Manassero F, Selli C, Panichi M, et al. C-MYC, HIF-1 α , ERG, TKT, and GSTP1: an Axis in Prostate Cancer? *Pathol Oncol Res*. 2019;25:1423-1429.
- Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am J Pathol*. 1999;155:641-7.
- Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho S, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004;101:2371-490.
- Brautigam M, Teusch N, Schenk T, Sheikh M, Aricioglu R, Borowski S, et al. Selective inhibitors of glutathione transferase P1 with trioxane structure as anticancer agents. *ChemMedChem*. 2015;10:629-39.
- Cai Q, Wu T, Zhang W, Guo X, Shang Z, Jiang N, Tian J, Niu Y. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferases P1 (GSTP1) Ile105Val and prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol*. 2013;34:3913–3922.
- Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:3367-71.
- Carter HB, Pearson J, Metter E, Brant L, Chan D, Andres R, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA*. 1992;267:2215-20.

- Castro E, Goh C, Leongamornlert D, Saunders E, Tymrakiewicz M, Dadaev T, et al. Effect of BRCA Mutations on Metastatic Relapse and Cause-specific Survival After Radical Treatment for Localised Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2015;68:186-93.
- Catalona WJ, Han M. Definitive Therapy for Localized Prostate Cancer: An Overview. In Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AV, Peters CA, editors. *Campbell-Walsh Urology.* Philadelphia: Elsevier, 10th ed; 2012; p. 2771-2788..
- Catalona WJ, Partin A, Slawin K, Brawer M, Flanigan R, Patel A, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA.* 1998;279:1542-7.
- Chang WH, Lee CC, Yen YH, Chen HL. Oxidative damage in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer co-exposed to phthalates and to trace elements. *Environ Int.* 2018;121:1179–1184.
- Chen P, Zhang W, Wang X, Zhao K, Singh ND, Zhuo L, et al. Lycopene and Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:1260.
- Chodak GW, Schoenberg HW. Early detection of prostate cancer by routine screening. *JAMA.* 1984;252:3261-4.
- Cornu JN, Audet-Walsh E, Drouin S, Bigot P, Valeri A, Fournier G, et al. Correlation between prostate volume and single nucleotide polymorphisms implicated in the steroid pathway. *World J Urol.* 2017;35:293–298.

- Cotignola J, Leonardi DB, Shhabbi A, Acuna AD, Sterna MC, Navone N, et al. Glutathione-S-transferase (GST) polymorphisms are associated with relapse after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013;16:28-34.
- Cowell IG, Dixon KH, PembleSE, Ketterer B, Taylor JB. The structure of the human glutathioneS-transferase pi gene. *Biochem J.* 1988;255:79–83.
- Custodio HM, Broberg K, Wennberg M, Jansson JH, Vessby B, Hallmans G, et al. Polymorphisms in glutathione-related genes affect methylmercury retention. *Arch Environ Health.* 2004;59:588–595.
- Dennis LK, Dawson DV, Resnick MI. Vasectomy and the risk of prostate cancer: a meta-analysis examining vasectomy status, age at vasectomy, and time since vasectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2002;5:193-203.
- Di Francesco S, Caruso R, Giambuzzi G, Ferri D, Militello A, Toniato E. Metabolic Alterations, Aggressive Hormone-Naïve Prostate Cancer and Cardiovascular Disease: A Complex Relationship. *Medicina (Kaunas).* 2019;55:62.
- Dickerman BA, Markt SC, Koskenvuo M, Pukkala E, Mucci LA, Kaprio J. Alcohol intake, drinking patterns, and prostate cancer risk and mortality: a 30-year prospective cohort study of Finnish twins. *Cancer Causes Control.* 2016;27:1049-58.
- Ding F, Li JP, Zhang Y, Qi GH, Song ZC, Yu YH. Comprehensive Analysis of the Association Between the rs1138272 Polymorphism of the GSTP1 Gene and Cancer Susceptibility. *Front Physiol.* 2018;9:1897.

- Djukic T, Simic T, Radic T, Matic M, Pljesa-Ercegovac M, Suvakov S, et al. GSTO1*C/GSTO2*G haplotype is associated with risk of transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Int Urol Nephrol*. 2015;47:625–30.
- Dong SC, Sha HH, Xu XY, Hu TM, Lou R, Li H. Glutathione S-transferase π : a potential role in antitumor therapy. *Drug des Devel Ther*. 2018;12:3535-3547.
- Donovan J, Hamdy F, Neal D, Peters T, Oliver S, Brindle L, et al. Prostate Testing for Cancer and Treatment (ProtecT) feasibility study. *Health Technol Assess*. 2003;7:1-88.
- Drost FH, Osses D, Nieboer D, Steyerberg E, Bangma C, Roobol M, et al. Prostate MRI, with or without MRI-targeted biopsy, and systematic biopsy for detecting prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;4:CD012663.
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem*. 2001;276:3319-23.
- EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2020. ISBN 978-94-92671-07-3.
- Epstein IJ, Allsbrook Jr WC, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1228-42.
- Esposito K, Chiodini P, Capuano A, Bellastella B, Maiorino MI, Parretta E, et al. Effect of metabolic syndrome and its components on prostate cancer risk: meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2013;36:132-9.

- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018;103:356-387.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:359-86.
- Fernandez L, Galán Y, Jiménez R, Gutiérrez A, Guerra M, Pereda C, et al. Sexual behaviour, history of sexually transmitted diseases, and the risk of prostate cancer: a case-control study in Cuba. *Int J Epidemiol*. 2005;34:193-7.
- Fossati N, Willemse P, Broeck T, Bergh R, Yuan C, Briers E, et al. The Benefits and Harms of Different Extents of Lymph Node Dissection During Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol*. 2017;72:84-109.
- Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, et al. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA*. 2005;294:433–439.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:1752-61.
- Ge B, Song Y, Zhang Y, Liu X, Wen Y, Guo X. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) null polymorphisms and the risk of hypertension: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2015;10:0118897.

- Gerber GS, Brendler CB. Rectal and Prostate Examination in the Male. In Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AV, Peters CA, editors. Campbell-Walsh Urology. Philadelphia: Elsevier, 11th ed; 2016; p 11.
- Goodrich JM, Basu N. Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. *Toxicol InVitro*. 2012;26:630–635.
- Gosselaar C, Roobol M, Roemeling S, Schroder F. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur Urol*. 2008;54:581-8.
- Gundacker C, Wittmann KJ, Kukuckova M, Komarnicki G, Hikkel I, Gencik M. Genetic background of lead and mercury metabolism in a group of medical students in Austria. *Environ Res*. 2009;109:786–796.
- Guzman JA, Sharma P, Smith LA, Buie JD, de Riese WT. Histological changes of the peripheral zone in small and large prostates and possible clinical implications. *Res Rep Urol*. 2019;11:77-81.
- Haiquan L, Chen I, Shimoda LA, Park Y, Zhang C, Tran L, et al. Chemotherapy-Induced Ca²⁺ Release Stimulates Breast Cancer Stem Cell Enrichment. *Cell Rep*. 2021;34:108605.
- Halpern JA, Shoag JE, Mittal S, Oromendia C, Ballman K, Hershman D, et al: Prognostic significance of digital rectal examination and prostate specific antigen in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Arm. *J Urol*. 2017;197:363-368.

- Hamdy FC, Donovan J, Lane J, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375:1415-1424.
- Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*. 2000;61:154–166.
- Hemminki, K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol*, 2012;30:143-8.
- Hokaiwado N, Takeshita F, Naiki-Ito A, Asamoto M, Ochiya T, Shirai T. Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29:1134–38.
- Holt SK, Salinas CA, Stanford JL. Vasectomy and the risk of prostate cancer. *J Urol*. 2008;180:2565-8.
- Huang GZ, Shan W, Zeng L, Huang LG. The GSTP1 A1578G polymorphism and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: Results from an updated meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2013;12:2481–2491.
- Huang Y, Li ZZ, Huang YL, Song HJ, Wang YJ. Value of free/total prostate-specific antigen (f/t PSA) ratios for prostate cancer detection in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/mL: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:0249.
- Huncharek M, Haddock KS, Reid R, Kupelnick B. Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *Am J Public Health*. 2010;100:693-701.

- Islami F, Moreira DM, Boffetta P, Freedland SJ. A systematic review and meta-analysis of tobacco use and prostate cancer mortality and incidence in prospective cohort studies. *Eur Urol.* 2014;66:1054-64.
- Jansson KF, Akre O, Garmo H, Bill-Axelsson A, Adolfsson J, Stattin P, et al. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *Eur Urol.* 2012;62:656-61.
- Jayadevappa R, Chhatre S, Johnson JC, Malkowicz SB. Association between ethnicity and prostate cancer outcomes across hospital and surgeon volume groups. *Health Policy.* 2011;99:97-106.
- Jeon D, Park HJ, Kim HS. Protein S-glutathionylation induced by hypoxia increases hypoxia-inducible factor-1 α in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495:212-216.
- Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:1499-507.
- Key TJ. Nutrition, hormones and prostate cancer risk: results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Recent Results Cancer Res.* 2014;202:39-46.
- Khurana N, Sikka SC. Targeting Crosstalk between Nrf-2, NF-B and Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Cancers.* 2018;10:352.
- Kupelian PA, Mahadevan A, Reddy CA, Reuther AM, Klein EA. Use of different definitions of biochemical failure after external beam radiotherapy changes conclusions

about relative treatment efficacy for localized prostate cancer. *Urology*. 2006;68:593–598.

- Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ*. 2010;17:1373–1380.
- Lacorte LM, Rinaldi JC, Justulin LA, Delella FK, Moroz A, Felisbino SL. Cadmium exposure inhibits MMP2 and MMP9 activities in the prostate and testis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;457:538–541.
- Lavender NA, Benford ML, VanCleave T, Brock GN, Kittles RA, Moore JH, et al. Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and prostate cancer risk among Men of African Descent: A case-control study. *BMC Cancer*. 2009;9:397.
- Lee EK, Thrasher B. Management of Biochemical Recurrence after Definitive Therapy for Prostate Cancer. In Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AV, Peters CA, editors. *Campbell-Walsh Urology*. Philadelphia: Elsevier, 11th ed; 2016; p. 2770-2785.
- Lesseur C, Gilbert-Diamond D, Andrew AS, Ekstrom RM, Li Z, Kelsey KT, et al. A case-control study of polymorphisms in xenobiotic and arsenic metabolism genes and arsenic-related bladder cancer in New Hampshire. *Toxicol Lett*. 2012;210:100-6.
- Li S, Li C, Jin S, Liu J, Xue X, Eltahan AS. Overcoming resistance to cisplatin by inhibition of glutathione S-transferases (GSTs) with ethacraplatin micelles in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2017;144:119-129.
- Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr*. 2007;137:2171-84.

- Lippi G, Mattiuzzi C. Fried food and prostate cancer risk: systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66:587-9.
- Liu D, Liu Y, Ran L, Shang H, Li D. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and prostate cancer risk in Asians: A systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013;34:2539–2544.
- Malik SS, Kazmi Z, Fatima I, Shabbir R, Perveen S, Masood N. Genetic Polymorphism of GSTM1 and GSTT1 and Risk of Prostatic Carcinoma—A Meta-analysis of 7,281 Prostate Cancer Cases and 9,082 Healthy Controls. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17:2629–2635.
- Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases- structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem.* 1988;23:283-337.
- Marahatta SB, Punyarit P, Bhudisawasdi V, Paupairoj A, Wongkham S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase omega gene and risk of cancer. *Cancer Lett.* 2006;236:276-81.
- Marcos R, Martínez V, Hernández A, Creus A, Sekaran C, Tokunaga H, et al. Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic: Role of GST polymorphisms. *J Occup Environ Med.* 2006;48:334–341.
- Martignano F, Gurioli G, Salvi S, Calistri D, Costantini M, Gunelli R. GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Dis Markers.* 2016; 2016:4358292.

- Masoudi M, Saadat I, Omidvari S, Saadat M. Association between N142D genetic polymorphism of GSTO2 and susceptibility to colorectal cancer. *Mol Biol Rep.* 2011;38:4309-13.
- Masoudi M, Saadat I, Omidvari S, Saadat M. Genetic polymorphisms of GSTO2, GSTM1, and GSTT1 and risk of gastric cancer. *Mol Biol Rep.* 2009 ;36:781-4.
- Matic MG, Coric V, Savic-Radojevic A, Bulat P, Pljesa-Ercegovac M, Dragicevic D, et al. Does occupational exposure to solvents and pesticides in association with glutathione S-transferase A1, M1, P1, and T1 polymorphisms increase the risk of bladder cancer? The Belgrade case-control study. *PLoS ONE.* 2014;9:99448.
- McBride RB. Obesity and aggressive prostate cancer: Bias and Biomarkers. New York: Columbia University; 2012.
- Moustafa AE. Involvement of human papillomavirus infections in prostate cancer progression. *Med Hypotheses.* 2008;71:209–11.
- Moyer AM, Salavaggione OE, Wu TY, Moon I, Ecklo BW, Hildebrandt M, et al. Glutathione s-transferase p1: Gene sequence variation and functional genomic studies. *Cancer Res.* 2008;68:4791–4801.
- Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol.* 1991;30:133-40.
- Mukherjee B, Salavaggione OE, Pelleymounter LL, Moon I, Eckloff BW, Schaid DJ, et al. Glutathione S-transferase omega 1 and omega 2 pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos.* 2006;34:1237–1246.

- Nock NL, Liu X, Cicek MS, Li L, Macarie F, Rybicki BA, et al. Polymorphisms in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and conjugation genes, interactions with smoking and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:756-61.
- Nyame YA, Murphy AB, Bowen DK, Jordan G, Batai K, Dixon M, et al. Associations between serum vitamin D and adverse pathology in men undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol.* 2016;34:1345-9.
- Okotie OT, Roehl K, Han M, Loeb S, Gashti S, Catalona W. Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology.* 2007;70:1117-20.
- Oskina NA, Ārmolenko NA, Boyarskih UA, Lazarev AF, Petrova VD, Ganov DI, et al. Associations between SNPs within antioxidant genes and the risk of prostate cancer in the Siberian region of Russia. *Pathol Oncol Res.* 2014;20:635–640.
- Page EC, Bancroft EK, Brook MN, Assel M, Hassan Al Battat M, Thomas S, et al. Interim Results from the IMPACT Study: Evidence for Prostate-specific Antigen Screening in BRCA2 Mutation Carriers. *Eur Urol.* 2019;76:831-842.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108.
- Pejčić T, Hadži- Đokić J, Aćimović M, Bašić D. Histologija i fiziologija prostate. Hiperplazija prostate. Epidemiologija, etiologija, patofiziologija, klinička slika, prirodni tok, dijagnoza i medikamentozno lečenje benigne hiperplazije prostate. U Hadži- Đokić JB, Aćimović MŽ, Bašić DT, urednici. *Odabrana poglavlja urologije.* Beograd: Zavod za udžbenike; 2020. p.314-350.
- Pejčić T, Hadži-Đokić J, Bašić D. *Prostata.* Beograd: Elit Medica; 2014.

- Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones.* 2016;48:228-238.
- Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Matic M, Coric V, Djukic T, Radic T, et al. Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors. *Int J Mol Sci.* 2018;19:3785.
- Pongstaporn W, Pakakasama S, Singuansin S, Hongeng S, Petmitr S. Polymorphism of glutathione S-transferase Omega gene: association with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135:673-8.
- Pongstaporn W, Rochanawutanon M, Wilailak S, Linasamita V, Weerakiat S, Petmitr, S. Genetic alterations in chromosome 10q24.3 and glutathione S-transferase omega 2 gene polymorphism in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006;25:107–14.
- Popiolek M, Rider JR, Andren O, Andersson S, Holmberg L, Adami H, et al. Natural history of early, localized prostate cancer: a final report from three decades of follow-up. *Eur Urol.* 2013;63:428.
- Porter CR. Ultrasound for prostate biopsy. In: Fulgham PF, Gilbert BR, editors. *Practical urological ultrasound.* New York: Springer; 2013.
- Powell IJ, Fischer AB. Minireview: the molecular and genomic basis for prostate cancer disparities. *Mol Endocrinol.* 2013;27:879-91.
- Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:443-53.

- Radic T, Coric V, Pljesa-Ercegovac M, Basta-Jovanovic G, Radojevic-Skodric S, Dragicevic D, et al. Concomitance of Polymorphisms in Glutathione Transferase Omega Genes Is Associated with Risk of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Tohoku J Exp Med.* 2018;246:35-44.
- Ramkumar K, Samanta S, Kyani A, Yang S, Tamura S, Ziemke E, et al. Mechanistic evaluation and transcriptional signature of a glutathione S-transferase omega 1 inhibitor. *Nat Commun.* 2016;7:13084.
- Ramos CG, Roehl KA, Antenor J, Humphrey P, Catalona W. Percent carcinoma in prostatectomy specimen is associated with risk of recurrence after radical prostatectomy in patients with pathologically organ confined prostate cancer. *J Urol.* 2004;172:137-40.
- Ranasinghe WK, Xiao L, Kovac S, Chang M, Michiels C, Bolton D, et al. The role of hypoxia-inducible factor 1 α in determining the properties of castrate-resistant prostate cancers. *PloS One.* 2013;8:54251.
- Reuter S, Gupta, SC, Chaturvedi MM, Aggarwal, BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49:1603–1616.
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M. editors. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005.* Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2008.
- Roach M, Hanks G, Thames H, Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;65:965-74.

- Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:944-60.
- Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100:170-83.
- Roehl KA, Han M, Ramos CG, Antenor JA, Catalona WJ. Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *J Urol.* 2004;172:910–914.
- Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad SH. Glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTM1,GSTT1, GSTP1) and prostate cancer: A case-control study in Tehran, Iran. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011;14:105–113.
- Sarwar S, Adil MA, Nyamath P, Ishaq M. Biomarkers of Prostatic Cancer: An Attempt to Categorize Patients into Prostatic Carcinoma, Benign Prostatic Hyperplasia, or Prostatitis Based on Serum Prostate Specific Antigen, Prostatic Acid Phosphatase, Calcium, and Phosphorus. *Prostate Cancer* 2017;2017:5687212.
- Schmid HP, McNeal J, Stamey T. Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer.* 1993;71:2031-40.
- Schoonen WM, Salinas CA, Kiemeny LA, Stanford JL. Alcohol consumption and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Int J Cancer.* 2005;113:133-40.

- Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, Benlloch S, Ahmed M, Saunders EJ, et al. Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nat Genet.* 2018;50:928-936.
- Shariat SF, Roehrborn CG. Using biopsy to detect prostate cancer. *Rev Urol.* 2008;10:262-80.
- Shiota M, Yokomizo A, Fujimoto N, Naito S. Androgen receptor cofactors in prostate cancer: potential therapeutic targets of castration-resistant prostate cancer. *Curr cancer Drug Targets.* 2011;11:870-81.
- Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat rev Urol.* 2009;6:281-9.
- Singh S. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75:1–15.
- Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell; 2009.
- Sritharan J, MacLeod JS, McLeod CB, Peter A, Demers PA. Prostate cancer risk by occupation in the Occupational Disease Surveillance System (ODSS) in Ontario, Canada. *Health Promot Chronic Dis Prev Can.* 2019;39:178–186.
- Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med,* 1987;317:909-16.

- Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham A, Dotan A, Bianco F, Lilja H, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol*. 2006;24:3973-8.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021.
- Sweeney C, Farrow DC, Schwartz SM, Eaton DL, Checkoway H, Vaughan TL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:449-54.
- Tabrez S, Priyadarshini M, Priyamvada S, Khan MS, Na A, Zaidi SK. Gene-environment interactions in heavy metal and pesticide carcinogenesis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;760:1–9.
- Tan X, Chen M. Association between glutathione S-transferases P1 Ile105Val polymorphism and susceptibility to esophageal cancer: Evidence from 20 case-control studies. *Mol Biol Rep*. 2015;42:399–408.
- Taylor ML, Mainous AG, Wells BJ. Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis. *Fam Med*. 2013;37:506-12.
- Thévenin AF, Zony CL, Bahnson BJ, Colman RF. GST pi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2. *Protein Sci*. 2011;20:834–848.
- Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 2002;62:5196–5203.

- Thompson I, Pauler D, Goodman P, Tangen C, Lucia M, Parnes H, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004;350:2239-46.
- Toussi, A, Stewart-Merrill S, Boorjian SA, Psutka SP, Thompson RH, Frank I, et al. Standardizing the Definition of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy- What Prostate Specific Antigen Cut Point Best Predicts a Durable Increase and Subsequent Systemic Progression? *J Urol*. 2016;195:1754-9.
- Van den Broeck, T, Motter N, Lam T. Prognostic Value of Biochemical Recurrence Following Treatment with Curative Intent for Prostate Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol*. 2019;75:967-87.
- Vergis R, Corbishley CM, Norman AR, Bartlett J, Jhavar S, Borre M, et al. Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9:342-51.
- Viani GA, Stefano EJ, Afonso S. Higher-than-conventional radiation doses in localized prostate cancer treatment: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;74:1405-18.
- Waalkes MP, Rehm S. Cadmium and prostate cancer. *J Toxicol Environ Health*. 1994; 43:251–269.
- Wang J, Jiang J, Zhao Y, Gajalakshmi V, Kuriki K, Suzuki S, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: A case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol*. 2011;35:66–72.

- Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate*. 1981;2:89-96.
- Wang XX, Jia HT, Yang H, Luo MH, Sun T. Overexpression of Glutathione S-transferase P1 Inhibits the Viability and Motility of Prostate Cancer via Targeting MYC and Inactivating the MEK/ERK1/2 Pathways. *Oncol Res*. 2017.
- Wang Y, Spitz MR, Schabath MB, Ali-Osman F, Mata H, Wu X. Association between glutathione S-transferase p1 polymorphisms and lung cancer risk in Caucasians: A case-control study. *Lung Cancer*. 2003;40:25–32.
- Wang YH, Yeh SD, Shen KH, Shen CH, Juang GD, Hsu LI, et al. A significantly joint effect between arsenic and occupational exposures and risk genotypes/diplotypes of CYP2E1, GSTO1 and GSTO2 on risk of urothelial carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;241:111-8.
- Wei B, Zhou Y, Xu Z, Ruan J, Cheng H, Zhu M, et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism and prostate cancer risk: Evidence from a meta-analysis. *PloS ONE*. 2013;8:71640.
- Whitbread AK, Masoumi A, Tetlow N, Schmuck E, Coggan M, Board PG. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods Enzymol*. 2005;401:78-99.
- Wu I, Modlin CS. Disparities in prostate cancer in African-American men: what primary care physicians can do. *Cleveland Clin J Med*. 2012;79:313-20.
- Xie P, Liang Y, Liang G, Liu B. Association between GSTP1 Ile105Val polymorphism and glioma risk: A systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35:493–499.

- Xu R, Hu J. The role of JNK in prostate cancer progression and therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother.* 2020;121:109679.
- Xu YT, Wang J, Yin R, Qiu MT, Xu L, Wang J, et al. Genetic polymorphisms in Glutathione S-transferase Omega (GSTO) and cancer risk: a meta-analysis of 20 studies. *Sci Rep.* 2014;4:6578.
- Xu Z, Ma T, Zhou J, Gao W, Li Y, Yu S, et al. Nuclear receptor ERR α contributes to castration-resistant growth of prostate cancer via its regulation of intratumoral androgen biosynthesis. *Theranostics.* 2020;10:4201-4216.
- Yan F, Wang R, Geng L. The 341C/T polymorphism in the GSTP1 gene and lung cancer risk: A meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2016; 15.
- Zhang M, Wang K, Chen L, Yin B, Song Y. Is phytoestrogen intake associated with decreased risk of prostate cancer? A systematic review of epidemiological studies based on 17,546 cases. *Andrology.* 2016;4:745-56.
- Zhang Y, Pitchiaya S, Cieslik M, Niknafs YS, Tien J, Hosono Y, et al. Analysis of the androgen receptor-regulated lncRNA landscape identifies a role for ARLNC1 in prostate cancer progression. *Nat Genet.* 2018;50:814-824.
- Zhang Y, Yuan Y, Chen Y, Wang Z, Li F, Zhao Q. Association between GSTP1 Ile105Val polymorphism and urinary system cancer risk: Evidence from 51 studies. *OncoTargets Ther.* 2016;9:3565–69.
- Zhao J, Stockwll T, Roemer A, Chikritzhs T. Is alcohol consumption a risk factor for prostate cancer? A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2016;16:845.

- Zhou CF, Ma T, Zhou DC, Shen T, Zhu QX. Association of glutathione S-transferase pi (GSTP1) Ile105Val polymorphism with the risk of skin cancer: A meta-analysis. *Arch Dermatol Res.* 2015;307:505–513.
- Zhou M. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate. *Mod Pathol.* 2018;31:S71-79.
- Zietman AL, Bae K, Slater J, Shipley W, Efstathiou J, Coen J, et al. Randomized trial comparing conventional-dose with high-dose conformal radiation therapy in early-stage adenocarcinoma of the prostate: long-term results from proton radiation oncology group/american college of radiology 95-09. *J Clin Oncol.* 2010;28:1106-11.

SPIŠAK SKRAĆENICA

Akt	Protein kinaza B
Apaf-1	engl. <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
CI	interval poverenja
EDTA	etilen diamino tetra-sirćetna kiselina
ERK	kinaza regulisana ekstracelularnim signalima (engl. <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>)
GSH	glutation
GST	glutation transferaza
GSTM1	glutation transferaza mi 1
GSTO1	glutation transferaza omega 1
GSTO2	glutation transferaza omega 2
GSTP1	glutation transferaza pi 1
HIF	hipoksija inducibilni faktor (engl. <i>hypoxia-inducible factor</i>)
HR	<i>Hazard ratio</i>
IL-1 β	interleukin-1 β
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
LD	neravnoteža povezanosti (eng. <i>linkage disequilibrium</i>)

MAPK	mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
NF- κ B	jedarni faktor kappa lakih lanaca aktiviranih B limfocita (eng. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
OR	odnos šansi
PCR	reakcija lančanog umnožavanja
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TGF- β	transformišući faktor rasta beta (engl. <i>transforming growth factor beta</i>)

BIOGRAFIJA

Veljko Šantrić je rođen 28. avgusta 1985. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2004. godine, a diplomirao je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,62 (devet, šestdeset dva).

Tokom studija je bio demonstrator na predmetu Histologija sa embriologijom, kao i član udruženja za međunarodnu razmenu studenata. Veljko Šantrić je bio stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije (2005-2010. godine), kao i grada Beograda (2007-2009. godine).

2013. godine završio je specijalističke akademske studije, iz oblasti Citologija, histochemija, elektronska mikroskopija i embriologija, tokom kojih je učestvovao u projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (br. projekta 41002).

Na klinici za Urologiju se zaposlio 2011. godine, a 2018. je položio specijalistički ispit iz urologije. U zvanje kliničkog asistenta iz oblasti hirurgija-urologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabran je u martu 2019. godine.

Tokom perioda specijalizacije i kao specijalista je učestvovao u brojnim domaćim i inostranim kongresima, Član je Evropske asocijacije urologa, kao i udruženja urologa Srbije.

Od 2017. godine učestvuje kao istraživač u onkološkim studijama Kliničkog centra Srbije o tumorima mokraćne bešike (WO29636), kao i tumora bubrega (WO39210).

Posедуje aktivno znanje engleskog i francuskog jezika.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Вељко Шантрић

Број индекса РН 02/12 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Повезаност ризика и прогнозе болесника са карциномом простате лечених радикалном простатектомијом и зрачењем са полиморфизмима гена за глутатион трансферазе

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 15.06.2021.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Вељко Шантрић

Број индекса RH 02/12

Студијски програм Реконструктивна хирургија

Наслов рада Повезаност ризика и прогнозе болесника са карциномом простате лечених радикалном простатектомијом и зрачењем са полиморфизмима гена за глутатион трансферазе

Ментор Проф. др Дејан Драгичевић

Коментор Проф. др Ана Савић-Радојевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 15.06.2021.

Вељко Шантрић

Изјава о коришћењу

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

Повезаност ризика и прогнозе болесника са карциномом простате лечених радикалном простатектомијом и зрачењем са полиморфизмима гена за глутатион трансферазе

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CCBY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CCBY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 15.06.2021.

