

Broj 2 • septembar 2022. N° 2 • September 2022.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**

Trends in **Molecular Biology**

55

GODINA • YEARS

Beogradska škola molekularne biologije
Belgrade School of Molecular Biology



Beograd • Belgrade • 2022.
IMGGI • IMGGE

Pedesetogodišnjica osnivanja studijskog programa molekularna biologija i fiziologija Gordana Matić	8	50th anniversary of the molecular biology and physiology study program
TRPV1: Ciljno mesto dejstva lekova u terapiji različitih stanja Branislava Medić Brkić, Katarina Savić Vujović, Dragana Srebro, Sonja Vučković	15	TRPV1: A Promising drug target for the treatment of various conditions
Geni-modifikatori β -talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi Milena Ugrin	32	Gene modifiers in β -thalassemia syndromes – a new therapy approach
Novi uvid u genetiku naslednih perifernih neuropatija Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević	51	Genetics of inherited peripheral neuropathies: renewed data
Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate Zorana Dobrijević, Suzana Matijašević-Joković, Ana Branković, Ana Djordjević, Milica Popović i Goran Brajušković	63	Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer
Uticaj tumorske mikrosredine na razvoj i progresiju maligniteta Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Šelemetjev	75	The effects of tumor microenvironment on malignancy formation and progression
Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnom karcinomu Jovana Despotović	90	Role of hsa-miR-93-5p in colorectal cancer Jovana Despotović
Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona Marijana B. Živković	104	Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives
Molekularna dijagnostika glioblastoma – klinički uticaji <i>IDH</i> mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti <i>MGMT</i> gena Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović	125	Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of <i>IDH</i> mutations and epigenetic silencing of <i>MGMT</i>
Molekularni profil timoma Jelena Perić	143	Molecular profile of thymoma
Ekspresija i funkcija insulina u centralnom nervnom sistemu Tamara Dakić, Predrag Vujović	155	Insulin expression and action in the central nervous system
Neuroprotektivni potencijal progesterona Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić	168	Neuroprotective progesterone potential
Uloga dehidroepiandrosterona u moždanoj ishemiji/reperfuziji Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović	186	Effect of dehydroepiandrosterone on cerebral ischemia/reperfusion
Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze Neda Đorđević	206	Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties
Dihidroalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac	223	Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals
Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel	238	Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis
Bioinformatički alati za analizu mikroRNK Katarina Zeljić	255	Bioinformatics tools for the analysis of microRNA
Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević	275	Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome

Predgovor

Uspostaviti tradiciju je mnogo teže nego realizovati inicijativu. Pokazalo se da je prvi broj tematskog zbornika **Trendovi u molekularnoj biologiji 1** pobudio interesovanje naučne zajednice u Srbiji, tako da drugi broj nije bilo teško sastaviti. Broj poglavlja u tematskom zborniku **Trendovi u molekularnoj biologiji 2** je premašio očekivanja. Kao da je Tematski zbornik simbolično postao - Ko je ko u molekularnoj biologiji u Srbiji. I ponovo se pokazalo da se naučnici u našoj zemlji bave aktuelnim istraživačkim temama i aktivno doprinose napretku molekularne biologije na mnogim poljima. I mladi molekularni biolozi su prikazom svojih doktorskih teza pokazali da prate svetske trendove i savremene naučne pristupe.

Posebnost ovog broja je što se objavljuje u vreme kada obeležavamo jubilej, pedesetogodišnjicu Beogradske škole molekularne biologije, o čemu svedoči tekst u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Pre više godina na jednom naučnom skupu se govorilo o tome kako saznanja iz molekularne biologije prožimaju sve naučne oblasti koje se bave živim organizmima i kako se može predvideti da će njena primena obeležiti novi vek. Iz auditorijuma je stigao komentar: „Proći će i vaše“. Vreme svedoči da je era molekularne biologije tek počela.

„I šta ćemo sad?“

Sonja Pavlović

Iz recenzija Tematskog zbornika

Trendovi u molekularnoj biologiji

Drugi broj tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ predstavlja nastavak prikazivanja i objavljivanja najznačajnijih naučnih radova proisteklih iz doktorskih disertacija mladih naučnika Srbije, kao i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u svetu u oblasti molekularne biologije, u protekloj godini, u kojima su naši naučnici dali svoj doprinos. U ovom broju, prikazano je 18 naučnih radova, od kojih je 12 iz oblasti biomedicine, koji su posvećeni rezultatima ostvarenim u oblasti molekularne biologije retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Ovi rezultati su od ogromnog značaja za unapređenje dijagnostike i terapije bolesti.

Rezultati koje su naši naučnici ostvarili u oblasti molekularne biologije biljaka prikazani su kroz tri rada, a akcenat u njima je na mogućnosti primene tih rezultata u oblasti ekologije, hortikulture i unapređenja zdravlja ljudi (potraga za ekološki prihvatljivim bioherbicidima, modifikacija boje cveta, biološka aktivnost prirodnih supstanci).

Dva rada su posvećena naprednim metodama u oblasti molekularne biologije i prikazana su u posebnom poglavlju, što smatram veoma važnim.

Posebno bih istakla poglavlje u kojem je prikazan jedan od najznačajnijih naučnih rezultata u svetu u protekloj godini (otkiće receptora za temperaturu i dodir), za koji je dodeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2021. godine. Uvodno poglavlje ovog tematskog zbornika posvećeno je značajnom jubileju – pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, i u njemu je prikazan razvojni put studijskog programa Molekularna biologija i fiziologija na Univerzitetu u Beogradu – Biološkom fakultetu.

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ nastavlja svoju misiju naučne avangarde započetu prošlogodišnjim brojem. Prikazivanjem najkvalitetnijih i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u oblasti molekularne biologije u protekloj godini u kojima su naši mladi naučnici dali svoj ogromni doprinos, prenose se informacije širem krugu istraživača i zaposlenih u različitim oblastima (medicina, farmacija, poljoprivreda), čime se otvaraju mogućnosti za saradnju, a samim tim za primenu rezultata, kao i za nova istraživanja.

Svojom koncepcijom i odabirom radova „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ prate napredak u oblasti molekularne biologije i ne samo da prenose najznačajnije naučne rezultate, već i inspirišu i podstiču nova istraživanja i šire interesovanje za ovu veoma značajnu naučnu oblast. Ovaj zbornik opravdava svoj naziv i nadam se da će se nastaviti trend njegovog objavljivanja i narednih godina.

Dr Svetlana Radović, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Monografija/Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je drugi broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 8 predstavlja revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 7 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Posebno je značajno poglavlje u kome je prikazan doprinos naših istraživača u oblasti kojoj je dodeljena Nobelova nagrada iz medicine za 2021. godinu (receptori za temperaturu i dodir).

Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi u svetu mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji. Ovaj Tematski zbornik je svedočanstvo o značajnim postignućima molekularnih biologa u Srbiji koji su doneli napredak našoj medicini i drugim naučnim oblastima.

Monografija/Zbornik je izuzetno zanimljivo koncipiran sa sadržajem koji je na visokom naučnom nivou i koje je značajan izvor informacija za veliki broj naučnika u Srbiji čija se istraživanja više ne mogu zamisliti bez molekularne biologije. Primeri primenljivosti rezultata istraživanja u praksi (medicinskoj i drugima) je poseban kvalitet ovog Zbornika.

Prvi broj Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1“ je doživeo veliko interesovanje. Interesovanje autora da objave svoj doprinos svetskoj nauci u broju 2 govori da je ovakav sadržaj bio neophodan našoj naučnoj javnosti. Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine i drugih oblasti (biotehnologija, poljoprivreda, farmacija) nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije

**Dr Vesna Škodrić Trifunović, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ sadrži naučne rezultate koji su prepoznati na svetskom nivou, a koje su istraživači iz Srbije ostvarili u prethodnoj godini iz ove oblasti. Zbornik je sačinjen od 18 poglavlja, preglednih radova, grupisanih u pet celina. Prva celina je posvećena važnom jubileju, pedesetogodišnjici osnivanja Beogradske škole molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, dok druga sadrži prikaz rezultata naših istraživača iz oblasti fiziologije i medicine za koju je u 2021. godini dodeljena Nobelova nagrada. Najveći broj poglavlja je u okviru treće celine koja se bavi biomedicinom i to molekularnom biologijom retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Preostale dve celine su posvećene molekularnoj biologiji biljaka i naprednim metodama molekularne biologije. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 8 poglavlja u okviru biomedicine i molekularne biologije biljaka predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija.

Značaj ovog Zbornika je višestruk. Najpre, već drugu godinu za redom se objavljuju najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti koja su proizašla iz rada istraživača iz Srbije i dostupna su široj javnosti na maternjem jeziku. Takođe, svoje radove su napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (5) i fakulteta (5) iz Srbije, što ohrabruje da će se u našoj zemlji i dalje nastaviti sa istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu.

„Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je Tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji u prethodnoj godini. Korišćenjem najnovijih metodoloških pristupa u ovoj oblasti, ali i bioinformatičkih i drugih softverskih alata, postignut je značajan napredak u dijagnozi i primeni novih strategija lečenja mnogih bolesti, forenzičkim analizama, razvoju novih lekova. Ovaj sveobuhvatni prikaz istraživanja, koja se aktivno sprovode u naučnim institutima i na fakultetima u Srbiji, doprinosi saznanjima o značaju koji molekularna biologija ima kako u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi, farmaciji, tako i u razvoju biotehnologije, očuvanju životne sredine i biodiverziteta.

Poseban doprinos Zbornika se ogleda u tome što se u njemu nalaze aktuelni podaci o dostupnosti navedenih savremenih metodologija, čime se otvaraju realne mogućnosti za uspostavljanje novih saradnji među istraživačima, kao i u uspostavljanju inter- i multi-disciplinarnosti i daljem razvoju nauke u Srbiji.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu



JUBILEJ

ANNIVERSARY



PEDESETOGODIŠNJICA OSNIVANJA STUDIJSKOG PROGRAMA MOLEKULARNA BIOLOGIJA I FIZIOLOGIJA

Gordana Matić

Redovni profesor u penziji Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Naučni savetnik u penziji Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

E-mails: gormatic@ibiss.bg.ac.rs; gormatic@bio.bg.ac.rs; gordanammatic@gmail.com

50th ANNIVERSARY OF THE MOLECULAR BIOLOGY AND PHYSIOLOGY STUDY PROGRAM

Gordana Matic

Full professor, retired Faculty of Biology University of Belgrade

Principal Research Fellow, retired Institute for Biological Research "Siniša Stanković"

E-mails: gormatic@ibiss.bg.ac.rs; gormatic@bio.bg.ac.rs; gordanammatic@gmail.com



Davne 1972. godine na tadašnjem Odseku za biološke nauke Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu osnovana je nova studijska grupa – Molekularna biologija i fiziologija, čiji pedeseto-godišnji jubilej slavimo 2022. godine. Osnivač ovog studijskog programa bio je akademik Dušan Kanazir, osnivač i tadašnji šef Katedre za biohemiju koja je osnivanjem novog studijskog programa preimenovana u Katedru za biohemiju i molekularnu biologiju. Akademik Kanazir bio je vizionar i dobar poznavalac naučnih prilika na velikim i značajanim univerzitetima u svetu. Prateći vrlo brzi razvoj molekularne biologije kao nove naučne discipline koja doživljava procvat 1953. godine čuvenim otkrićem dvolančane zavojnice DNK kao nosioca genetičkih informacija i njihovog prenosioca kroz generacije, profesor Kanazir uočio je potrebu da se i na našem univerzitetu osavremeni nastava biologije i obogati najnovijim naučnim dostignućima koja su ukazivala da će se istraživanja u biologiji sve više orijentisati ka subćelijskom i molekularnom nivou proučavanja bioloških procesa. Kao izuzetno progresivan, kreativan i posvećen profesor, akademik Kanazir se svesrdno založio za modernizaciju biološke nastave na našem fakultetu, koja je podrazumevala reforme nastavnog programa biologije kao i organizacije nastavnog procesa. Tokom transformacije Odseka za biološke nauke Prirodno-matematičkog fakulteta, koja se odigrala 1972. i 1973. godine, došlo je, na inicijativu profesora Dušana Kanazira, i do transformacije Fiziološkog zavoda. Uz podršku profesora Vojislava Petrovića, tadašnjeg dekana Prirodno-matematičkog fakulteta, profesora Radoslava Anđusa, tadašnjeg upravnika Fiziološkog zavoda, profesora Zvonka Damjanovića i profesorke Mire Pašić, formirana je studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, u vreme kada je svega nekoliko univerziteta u Evropi imalo takve studije.

Prva generacija studenata osnovnih studija molekularne biologije upisana je školske 1972/73 godine. Upisano je 36 studenata, ali do kraja prve školske godine broj studenata se smanjio na 21 i ostao nepromenjen do samog kraja studija. Tih 21 bili su oni koji su zaintrigirani, privučeni i "inficirani" molekularnom biologijom nastavili da se njome bave sve do današnjih dana. Kao kuriozitet, valja istaći činjenicu, da je Rumunska vlada poslala svog najboljeg studenta medicine, našeg dragog kolegu i druga Oktavijana Popeskua, da u Beogradu studira molekularnu biologiju. Danas je Oktavijan ugledan naučnik svetskog renomea, član Rumunske akademije nauka i direktor Biološkog instituta u Bukureštu.

Na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju profesor Kanazir je 1961. godine imao samo jednog saradnika u oblasti molekularne biologije. To je bila asistentkinja dr Ana Savić, draga i poštovana profesorka koja nas je, nažalost, nedavno napustila, ne dočekavši da sa nama proslavi ovaj veliki jubilej. Godine 1970. izabran je i drugi asistent, dr Dragutin Savić. Dr Ana Savić je izučavala molekularne mehanizme razvića na modelu embrionalnog razvića morskog ježa i usavršavala se na Moskovskom univerzitetu za molekularnu biologiju, kao i na Univerzitetu Harvard u SAD. Kada je akademik Kanazir 1985. godine zbog poslova u Akademiji morao da se povuče sa funkcije šefa Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju, zamenila ga je profesorka Ana Savić i obavljala funkciju šefa Katedre je sve do 1998. kada je na to mesto izabran profesor Ljubiša Topisirović. Dr Dragutin Savić bavio se istraživanjima u oblasti molekularne genetike, a usavršavao se na univerzitetu Džon Hopkins u SAD i na Karolinska univerzitetu u Švedskoj. Nedostatak nastavničkog kadra na našoj katedri nadomestili su istraživači iz Laboratorije za biologiju tadašnjeg Instituta za nuklearne nauke „Boris Kidrič” u Vinči. Pre dolaska na Prirodno-matematički fakultet, profesor Kanazir je u toj laboratoriji formirao Vinčansku grupu biohemičara, radiobiologa, molekularnih biologa i genetičara – grupu darovitih i predanih saradnika sa kojima je nastavio da sarađuje i posle angažovanja na Prirodno-matematičkom fakultetu. Oni su mu pomogli u prvim i najtežim naporima, da se organizuje nastava iz biohemije na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju našeg fakulteta, kao i u organizovanju i izvođenju praktičnih vežbi u Institutu u Vinči, jer na Fakultetu u to doba nisu postojali uslovi za adekvatne praktične vežbe iz biohemije

i molekularne biologije. Vinčanska grupa posebno je zaslužna za razvoj molekularne biologije u našoj sredini, za pravovremeno orijentisanje naših kadrova prema izuzetno propulzivnoj naučnoj oblasti od posebne važnosti za razvoj bioloških i medicinskih nauka u celini.

Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju vremenom se širila angažovanjem već afirmisanih istraživača, među kojima su bili dr Radomir Crkvenjakov, dr Ljubiša Topisirović i dr Radmila Đorđević-Marković. Dalji rast katedre, kako u pogledu broja nastavničkog kadra, tako i u pogledu zastupljenosti različitih oblasti istraživanja, usledio je osamdesetih i devedesetih godina prošlog veka angažovanjem dr Branke Kovačić Milivojević, dr Sabere Ruždijić, dr Ivana Bruknera, dr Svetlane Radović, dr Đorđa Fire, dr Jelene Brkljačić, dr Stanke Romac, dr Olivera Stojkovića, dr Gorana Jovanovića, akademika dr Milene Stevanović i moje malenkosti. Tada mlađi saradnici, među kojima su bili dr Dušanka Savić Pavićević, dr Goran Brajušković, dr Branko Jovčić, dr Jelena Lozo, dr Dušan Keckarević, dr Milica Keckarević Marković, dr Miljana Kecmanović, sada su u visokim nastavnim zvanjima. Predvođeni profesorom Đorđem Firom kao šefom katedre, oni danas održavaju nastavnu i naučnu delatnost na našoj katedri na visokom nivou, uz pomoć nekolicine starijih kolega, dvojice mladih docenata, dr Gorana Vukotića i dr Jovana Pešovića, i brojnih naučnih saradnika koji pored naučno-istraživačkih poslova pružaju nesebičnu pomoć i u održavanju praktične nastave.

Posebno značajna novina u organizaciji nastave na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju bila je otvorenost za učestvovanje istaknutih naučnika iz brojnih naučnih instituta u procesu nastave, kao i istaknutih profesora sa drugih fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ideja vodilja bila je, a ostala je i do danas, da znanje iz određenih oblasti prenose studentima oni ljudi koji se tim oblastima bave u sopstvenim istraživanjima. Studenti su, dakle, dobijali nova saznanja "iz prve ruke", od ljudi koji su vrlo dobro poznavali sve probleme, izazove i perspektive naučnih tema o kojima su govorili studentima. Ti naučnici i profesori izlagali su pred studentima naučne činjenice i koncepte direktno iz svojih naučnih istraživanja i polja nauke koja su neposredno pratili i veoma dobro poznavali. Pomenućemo samo neke od njih. Profesor Mirko Simić, iz Instituta za imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu godinama je studentima molekularne biologije predavao imunologiju, stavljajući akcenat na molekularne mehanizme imunoregulacije; profesor Vladimir Glišin, iz Centra za multidisciplinarne studije, držao je nastavu na značajnom i veoma intigantnom predmetu Molekularna biologija razvića i diferencijacije; hematologiju je na izuzetno zanimljiv način predavao dr Pendić sa Medicinskog fakulteta; profesori Vladislav Varagić sa Medicinskog fakulteta i Miroslav Gašić sa Hemijskog fakulteta predavali su farmakologiju i organsku hemiju po programima koji su bili idealno prilagođeni studijama molekularne biologije; profesor Vladimir Kanjuh sa Medicinskog fakulteta, a kasnije dr Bogomir Dimitrijević iz Instituta "Vinča" uvodili su studente u tajne biologije maligne ćelije, a Humanu genetiku predavao je dr Branko Garžičić iz Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Programska reforma se sastojala u tome što su u nastavni program uvedene biomatematika sa statistikom i fizička hemija, kao potpuno novi obavezni predmeti, a sadržaji neorganske i organske hemije, kao i hemije makromolekula su značajno prošireni. Na prvoj godini studenti su slušali i fiziku kao obavezan predmet. Tako su, zapravo, studije molekularne biologije započinjale sticanjem vrlo solidnog znanja iz svih osnovnih prirodnih nauka, što je kasnije predstavljalo odličnu osnovu za razumevanje molekularnih procesa na kojima se zasniva održavanje i funkcionisanje živih organizama, kao i za razumevanje instrumentalnih metoda koje se koriste u molekularnobiološkim istraživanjima. Na drugoj godini nastava iz biohemije je proširena i podeljena na dva predmeta: Dinamičku biohemiju koju je predavao profesor Dušan Kanazir i Instrumentalne biohemijske metode koje je uveo tada mladi docent Radomir Crkvenjakov koji se upravo vratio u Beograd sa doktorskom diplomom sa Harvarda. Pored toga uveden je predmet Osnovi molekularne biologije koji su studenti nestrpljivo iščekivali prethodnih godinu dana. Uz beleške sa inspirativnih preda-

vanja tada docentkinje dr Ane Savić, studenti su koristili i strane knjige. Upravo izašlo prvo izdanje Votsonove Molekularne biologije gena imalo je status "svete knjige". Na drugoj godini učila se i citologija i histologija, a redukovani sadržaji taksonomskih i morfoloških bioloških disciplina objedinjeni su u zajednički predmet nazvan Opšta biologija, koji je kasnije podeljen na Opštu i sistematsku zoologiju i Botaniku. Genetici profesora Marinkovića pridodat je još jedan predmet: Evolucionarna i humana genetika. Fiziološki predmeti su, takođe, modifikovani. Uz Opštu fiziologiju profesora Radoslava Anđusa, program je obuhvatao i Uporednu fiziologiju profesora Vojislava Petrovića, a poseban značaj počeo se pridavati biofizici. Treća i četvrta godina studija donosile su niz interesantnih i izazovnih, usko stručnih predmeta među kojima su bili: Humana genetika, Biologija maligne ćelije, Biologija i hemija virusa, Imunologija i imunohemija, Hematologija i biohemija krvi, Biokibernetika, Osnovi farmakologije, Endokrinologija, Neurofiziologija sa neurohemijom, Biljna fiziologija. Neki od ovih predmeta bili su izborni, što je, takođe, bila novina u organizaciji nastave. Uz obavezne i nekoliko izbornih predmeta studenti su mogli da se usmere ka biomedicini, molekularnoj biologiji biljaka ili ka drugim oblastima biologije.

Takva suštinska reforma nastave bila je suočena sa brojnim poteškoćama i otporima na fakultetu, ali je istovremeno proces reformisanja naišao i na puno razumevanje, odobravanje i nesebičnu podršku niza uglednih naučnika i nastavnika sa drugih fakulteta i instituta. Punu podršku Fakultet je dobio iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, uz čije je aktivno učešće i pomoć studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija mogla da funkcioniše, u početku sa dosta poteškoća i nedostataka, a kasnije sve uspešnije. Posete različitim laboratorijama ovih i drugih instituta, razgovori sa istraživačima i uvid u njihove eksperimente pružali su studentima mogućnost da razumeju šta to znači "baviti se naukom" i, osetivši entuzijazam i stvaralačku atmosferu koja je vladala u tim laboratorijama, taj im se "posao" i te kako dopadao. Motivisani izazovima nove, uzbudljive i dinamične nauke kakva je tada bila, a i danas ostala molekularna biologiju, prionuli bi na knjige i ispite kako bi se što pre i što bolje pripremili za naučni rad.

Najveće poteškoće bile su vezane za organizovanje praktične nastave, s obzirom na to da na Fakultetu tada nije bilo odgovarajuće opremljenih laboratorija za vežbe iz molekularne biologije. Te teškoće su, međutim, tokom prvih nekoliko godina uspešno prevaziđene tako što su organizovane radne posete studenata Institutu za biologiju mora u Dobroti pored Kotora. Profesorka Ana Savić, uz pomoć dr Sabere Ruždijić, dr Nevenke Bajković i nekih postdiplomaca, a kasnije i profesor Anđus sa svojim saradnicima, organizovali su jednomesečne boravke celih generacija studenata i rad u laboratorijama ovog instituta. Nisu to bile "obične" studentske vežbe, već pravi eksperimentalni rad koji je podrazumevao ozbiljnu pripremu za eksperiment, pažljivo izvođenje eksperimenta i detaljnu analizu rezultata. Sve se odvijalo u neobaveznoj, opuštenoj i stvaralačkoj atmosferi u laboratoriji sa velikom terasom nad morem, ali ozbiljnost pristupa eksperimentalnom radu ni u jednom momentu nije se dovela u pitanje. Studenti su izgarali u laboratoriji "od jutra do mraka", žurili ujutru da što pre vide rezultate sa scintilacionog brojača ili da postave nove uzorke u ultracentrifugu, a sve "pauze" u toku dana koristili su za obradu i analizu rezultata koje je trebalo na kraju predstaviti i diskutovati sa svim profesorima i studentima na redovnim seminarima na terasi. Kotor je bio naš Cold Spring Harbor – kultno mesto koje je zauvek vezalo mnoge studente za molekularnu biologiju.

Neki profesori negovali su saradnju sa inostranim naučnicima i univerzitetskim institucijama. Zahvaljujući tome, studenti su neretko imali priliku da direktno upoznaju neka od velikih imena molekularne biologije koji su dolazili u Beograd, posećivali naš fakultet i institute i držali zanimljiva predavanja. Studenti, razume se, te prilike nisu propuštali. Iako pažljivi slušaoci, ponekad nisu mogli sve da isprate i najbolje razumeju, ali su bez izuzetka izlazili sa tih predavanja zadivljeni i obogaćeni dodatnim znanjem i entuzijazmom.

Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju na našem Fakultetu i dalje se razvija i raste, i održava vrlo produktivne veze sa institutima, pre svega sa Institutom za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Institutom za biološka istraživanja "Siniša Stanković" i Institutom za nuklearne nauke "Vinča", i zajedno sa pomenutim ustanovama predstavlja rasadnik novih znanja i novih tehnologija. Saradnja između ovih ustanova najbolje je došla do izražaja prilikom organizovanja doktorskih studija koje su na našem univerzitetu uvedene 2006. godine. Doktorski program Molekularna biologija osmišljen je tako da studentima omogući da sistematizuju i unaprede postojeća znanja stečena na osnovnim studijama, da im pruži nova znanja i da podstakne njihovu kreativnost i motivaciju. Kao predavači, u programu su učestvovali naši najbolji molekularni biolozi koji su sa mnogo truda, entuzijazma, dobre volje i iskustva činili jedan složan i uspešan tim koji je imao jedan cilj: da doktorski program Molekularna biologija bude što kvalitetniji i korisniji za naše buduće mlade naučnike. Prošavši kroz nekoliko akreditacija program se usavršavao, postajao sve bolji, a interesovanje studenata za ovaj program bilo je uvek na zavidnom nivou. Najnovija reforma programa koja je sada u toku donela je i najveće promene. Sada se program odvija kroz dva podmodula: Molekularna biomedicina i Molekularna genetika i genomika, a cilj je da se sadržaji modernizuju i usaglasa sa najnovijim tokovima svetske molekularne biologije.

Sa ciljem unapređenja molekularne biologije kao nauke i struke i njene afirmacije u domaćoj i međunarodnoj naučnoj zajednici osnovano je Srpsko društvo za molekularnu biologiju. Društvo okuplja ne samo molekularne biologe, već i naučnike, stručnjake i studente iz srodnih nauka čija profesionalna interesovanja zalaze u oblast molekularne biologije. Svoje aktivnosti Društvo usmerava ka podsticanju komunikacije između naučnika u zemlji i inostranstvu, unapređenju nastavne delatnosti u oblasti molekularne biologije, popularizaciji molekularne biologije i razvoju naučnog podmlatka. Osnivačka skupština Srpskog društva za molekularnu biologiju (MolBioS-a) održana je 8. aprila 2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i tom prilikom izabrani su i prvi organi društva. Među brojnim dosadašnjim aktivnostima Društva posebno treba istaći organizaciju Prvog kongresa molekularnih biologa Srbije, CoMBoS-a, koji je održan septembra 2017. godine, kao i osnivanje Studentske sekcije MolBioS-a.

Program Prvog kongresa molekularnih biologa Srbije sa međunarodnim učešćem uključio je širok spektar fascinantnih tema iz molekularne biologije i srodnih oblasti i bio je posvećen stimulanju radoznalosti, komunikacije i saradnje, posebno među mladim istraživačima. Predavači su bili istaknuti naučnici iz naše zemlje i inostranstva, među kojima su bili i naši molekularni biolozi koji su ostvarili zapažene karijere u inostranstvu. Svi oni su doprineli ostvarenju našeg cilja da molekularnim biolozima i naučnicima iz srodnih oblasti pružimo priliku da razmene ideje i budu inspirisani intrigantnim predavanjima renomiranih naučnika i priznatih eksperata.

Danas smo posebno ponosni na rad Studentske sekcije našeg društva. Ona je osnovana na inicijativu samih studenata Molekularne biologije koju su zdušno podržali svi organi Društva. Ambicije i aktivnosti studenata koji vode Studentsku sekciju uveliko prevazilaze ono što smo u početku mogli da očekujemo. Naše mlade kolege uspele su da organizuju čitav niz odličnih predavanja za koja su angažovali ne samo naše istaknute molekularne biologe već i neka od najistaknutijih svetskih imena, među kojima neke Nobelovce, pa čak i velikog Brusa Alberta. Pored toga organizovali su niz radionica, studentske laboratorijske prakse koje su privukle ogromnu pažnju aktuelnih studenata molekularne biologije, radionice za srednjoškolce i "ZOOM kafice" sa našim mladim "molekularcima" koji razvijaju svoje karijere u svetu.

Naša molekularnobiološka zajednica nije velika, odliv kvalitetnih naučnika, posebno mladih, je nedopustivo veliki. Ipak, ono čime se možemo pohvaliti i na šta možemo biti ponosni je orgoman entuzijazam, ljubav prema našoj prelepoj nauci i zajedništvo koje dolazi do izražaja naročito onda kada odlučimo da napravimo

neke veće iskorake. Nadajmo se boljim vremenima i situaciji kada će naši najbolji studenti i doktoranti odlučivati da ostanu u Srbiji i ovde izgrade svoje naučne karijere na opšte zadovoljstvo i korist ne samo naše zajednice već i društva u celini.



Profesor Kanazir sa najbližim saradnicima, Beograd, 1986.godine.

Prvi red, s leva: profesorka Ana Savić, akademik Dušan Kanazir, profesorka Radmila Đorđević Marković;
drugi red, s leva: profesor Ljubiša Topisirović, profesor Dragutin Savić, profesor Radomir Crkvenjakov.

**NOBELOVA NAGRADA
ZA FIZIOLOGIJU I MEDICINU 2021:
RECEPTORI ZA TEMPERATURE I DODIR**

**THE NOBEL PRIZE
IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2021:
RECEPTORS FOR TEMPERATURE AND TOUCH**



TRPV1: Ciljno mesto dejstva lekova u terapiji različitih stanja

Branislava Medić Brkić¹, Katarina Savić Vujović¹, Dragana Srebro¹, Sonja Vučković¹

¹Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju,

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

Kontakt: brankicamedic@gmail.com

Apstrakt

Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu za 2021. dodeljena je naučnicima koji su identifikovali receptore za temperaturu i dodir. Da bi sprovedi ovo ispitivanje, istraživači su koristili kapsaicin, jedinjenje koje čili paprici daje toplotu, kako bi otkrili receptore koji omogućavaju ljudima da osećaju "gorući" ukus čilija. Pokazano je da se *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1), koji predstavlja jonski kanal prisutan na senzornim neuronima, otvara u prisustvu kapsaicina ili toplote, propuštajući naelektrisane jone kalcijuma u ćeliju. Takav priliv kalcijuma pokreće električne signale koji se šalju u mozak da upozore na toplotu. TRPV1 se nalazi u somatosenzornom sistemu i služi kao multimodalni senzor različitih štetnih stimulusa.

Brojne farmakološke i genetičke studije su potvrdile TRPV1 kao terapijsku metu u nekoliko prethodnih modela hroničnog bola, uključujući maligni, neuropatski, postoperativni i mišićno-skeletni bol. Pored toga, ekspresija TRPV1 se takođe primećuje na ne-neuronskim lokalizacijama, kao što su epitel bešike i pluća, ćelije kohlee u uhu. Stoga, lekovi koji mogu da modulišu aktivnost kanala TRPV1 mogu biti korisni za lečenje različitih stanja u rasponu od hroničnog bola do gubitka sluha. Iako je utvrđeno da antagonisti TRPV1 mogu predstavljati važan dodatak terapiji bola, njihova klinička upotreba je i dalje ograničena značajnim neželjenim efektima, kao što je hipertermija.

U ovom radu ćemo opisati najvažnije uloge TRPV1 u fiziološkim i patofiziološkim procesima i predstaviti najperspektivnije lekove koji deluju preko TRPV1.

Ključne reči: Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2021., TRPV1 jonski kanal, bol, inflamacija, maligne i kardiovaskularne bolesti, metabolizam

TRPV1: A Promising drug target for the treatment of various conditions

Branislava Medić Brkić¹, Katarina Savić Vujović¹, Dragana Srebro¹, Sonja Vučković¹

¹Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology,

Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: brankicamedic@gmail.com

Abstract

The 2021. Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to scientists who have identified receptors for temperature and touch. In order to conduct this examination, researchers used capsaicin, the compound that gives chili peppers their heat, to discover receptor proteins that allow people to feel chili's burn. It is shown that transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), which represents an ion channel present on sensory neurons, opens when it encounters capsaicin or heat, allowing charged calcium ions into the cell. That flood of calcium triggers electrical signals that are sent to the brain to warn of heat. TRPV1 is found in the somatosensory system and serves as a multimodal sensor of different noxious stimuli.

Numerous pharmacological and genetic studies have validated TRPV1 as a therapeutic target in several preclinical models of chronic pain, including cancer, neuropathic, postoperative and musculoskeletal pain. Additionally, expression of TRPV1 is also observed in non-neuronal sites such as the epithelium of bladder and lungs, cells of the cochlea. Therefore, drugs which could modulate TRPV1 channel activity could be useful for the treatment of conditions ranging from chronic pain to hearing loss. While antagonists of TRPV1 were found to be a valuable addition to therapy of pain, their clinical use has still been limited by significant side effects, such as hyperthermia.

In this review, we will describe the most important roles of TRPV1 in physiological and pathophysiological processes and present the most promising TRPV1-targeted drugs.

Key words: Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021, TRPV1 ion channel, pain, inflammation, malignant and cardiovascular diseases, metabolism

Uvod

Pitanje kako osećamo fizički svet oko nas putem somatskih senzacija fascinira i intrigira brojne naučnike već vekovima. Stoga i ne iznenađuje činjenica da su istraživanja u vezi sa molekularnim i ćelijskim mehanizmima na kojima počivaju naša čula više puta privlačila pažnju Nobelovog komiteta za fiziologiju i medicinu. Sluh (1961), vid (1967) i miris (2004) su svi ranije prepoznati. Takođe, čula temperature i dodira spadaju među najosnovnije fiziološke funkcije kod životinja i ljudi.

Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2021. dodeljena je dvojici naučnika – *David Julius*-u i *Ardem Patapoutian*-u za njihovo istraživanje o receptorskim kanalima odgovornim za percepciju dodira i temperature. Ovo polje istraživanja sada je značajno pojašnjeno otkrićem *transient receptor potential* (TRP) i PIEZO kanala, i naknadnim ispitivanjima njihovih mnogobrojnih uloga u percepciji temperature, dodira, bola, pritiska i položaja tela.

Poreklo rada ovih naučnika može se pratiti do još jednog para nobelovaca – *Joseph Erlanger*-a i *Herbert Gasser*-a koji su 1944. godine dobili Nobelovu nagradu za rad na formiranju akcionih potencijala u različitim tipovima perifernih nervnih vlakana. Periferne neurone koje su tada opisali, smatrali su odgovornim za proces prenošenja osećaja bola, ali je pitanje kako neuron prevodi potencijalno štetnu fizičku silu, kao što je termodinamička energija ili pritisak, u akcioni potencijal ostalo nerazjašnjeno (1).

Devedesetih godina prošlog veka, *David Julius* je pokušao da odgovori na ovo pitanje iskorišćavajući neobičnu karakteristiku nekih jedinjenja za koje se smatra da imaju temperaturu. Kapsaicin, odgovoran za gorući osećaj povezan sa jedenjem čilija, je možda najpoznatija od svih ispitanih jedinjenja. Prilikom ovog istraživanja, *Julius* i kolege sa Kalifornija Univerziteta u San Francisku, SAD su transfekcijom uneli hiljade klonova komplementarnih DNK (cDNK) iz ganglija dorzalnog korena u embrionalnim ćelijama bubrega i pratili promene u intracelularnim koncentracijama kalcijuma izazvane kapsaicinom (2). Rezultat ovih testova bila je identifikacija jonskog kanala prolaznog receptorskog potencijala (TRP) koji je prvi identifikovan u fotoreceptorima jedne vrste vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Oni su pokazali da je kanal, kasnije nazvan TRPV1, bio jedinstveno eksprimiran u termosenzornim neuronima i da reaguje i na kapsaicin i na toplotu.

Julius i, nezavisno, *Patapoutian*, počeli su da istražuju senzorna svojstva dodatnih članova porodice TRP kod sisara. Od tada je utvrđeno da TRP kanali podržavaju različite senzorne funkcije u prirodi. Neke zmije koriste npr. TRPA1 kanal kao infracrveni detektor, dok su kamile i neke veverice razvile varijantu TRPV1 koja im omogućava da izdrže značajno povišene temperature okoline (3).

Deceniju nakon što je *Julius* prvi put opisao TRPV1, *Patapoutian* i njegovi saradnici u *Scripps Research Institute* (La Jolla, CA, USA) krenuli su na slično putovanje sa ciljem da identifikuju mehaničke senzore koji omogućavaju neuronima da reaguju na fizički dodir. Prvo su identifikovali ćelijsku liniju mišjeg neuroblastoma koja je bila osetljiva na mehaničku silu i, pretpostavljajući da je katjonski kanal verovatno odgovoran, napravili su uži spisak od 72 poznata kanala ili proteina nepoznate funkcije koji su obogaćeni u ćelijskoj liniji. *Patapoutian*-ov tim je prilikom svojih eksperimenata koristio malu interferirajuću RNK (siRNA), da bi identifikovao elektrofiziološke odgovore na stimulaciju pritiska. Zatim su eksprimirali kanal u embrionalnim bubrežnim ćelijama, pokazujući da on daje osetljivost na mehaničku silu. Nakon svih ovih eksperimenata 2010. godine, *Patapoutian*-ov tim je prijavio identifikaciju prvog mehanosenzitivnog jonskog kanala kod sisara, koji su nazvali PIEZO1 prema grčkom terminu (*"piezien"*) za pritisak (4).

Ardem Patapoutian je ubrzo shvatio da kičmenjaci poseduju i drugi, homologni kanal osetljiv na dodir, PIEZO2, i fokusirao je napore svoje laboratorije na razumevanje njihovih uloga u posredovanju veoma

složenih somatosenzacija u *in vivo* modelima. Tako su npr. Piezo1 nokautirani embrioni miša umirali veoma rano zbog defekata u vaskularnom remodelovanju (5), dok su nasuprot tome, Piezo2 nokaut miševi preživljivali. Fenotipska analiza je otkrila ozbiljan deficit u osećaju dodira i manji uticaj na odgovor na štetne mehaničke stimuluse (6). Ovi miševi takođe pokazuju oštećenu kontrolu mokraćne bešike, dok ljudi sa mutacijama u PIEZO2 kanalu nemaju osećaj punjenja bešike i prijavljuju atipične navike tokom uriniranja (7).

Interakcija između dva PIEZO kanala otkrivena je u veoma značajnoj studiji iz 2018. godine o molekularnoj osnovi barorefleksa: mehanizmu koji održava krvni pritisak na skoro konstantnim nivoima. *Patapoutian* i saradnici su izvršili uslovnu ablaciju PIEZO1 i PIEZO2 u specifičnim senzornim ganglijama, što je rezultiralo ukidanjem barorefleksa i povećanom varijabilnošću krvnog pritiska (8).

Nedavna pandemija COVID-19 dovela je u prvi plan dalju primenu *Julius* - ovog i *Patapoutian*-ovog opsežnog istraživanja o osećaju temperature. Pojedinci koji su izgubili čulo mirisa i ukusa, poremećaje poznate kao anosmija i ageuzija, često prijavljuju ozbiljnu nezainteresovanost za hranu zbog nemogućnosti da u potpunosti percipiraju njen ukus. Sličan fenomen je povezan sa starenjem, pri čemu može doći do pojave pothranjenosti i kaheksije. Ova stanja nisu neuobičajena, ali su bila relativno potcenjena, čak i među medicinskim radnicima. To se promenilo od 2020. godine, skoro preko noći, kada je gubitak mirisa i ukusa prepoznat kao najčešći simptom takozvanog „dugog COVID-a“. Aktivacija TRP kanala kroz pažljivu modulaciju hrane sa začinima i temperaturom izgleda kao efikasna strategija za borbu protiv lošeg apetita povezanog sa starenjem i hemosenzornim poremećajima i kod ljudi i kod životinja (9, 10).

Iz ovih otkrića proizišlo je mnoštvo mogućnosti za dalja ispitivanja u pretkliničkim i kliničkim modelima. U ovom radu ćemo opisati najvažnije uloge TRPV1 u fiziološkim i patofiziološkim procesima i predstaviti najperspektivnije lekove koji deluju preko TRPV1.

TRP kanali: kratak pregled

TRP kanali su, kako smo već naveli, prvobitno otkriveni u slepom soju *Drosophila*. Kada su bile izložene produženom intenzivnom svetlu, ove voćne mušice pokazale su prolazni priliv kalcijuma u svoje fotoreceptorske ćelije. Ovo osnovno otkriće otvorilo je put otkriću prvih TRP kanala sisara, nazvanih „kanonski“ (TRPC) zbog njihove homologije sa kanalom *Drosophila* (11).

TRP kanali sisara se sastoje od 28 članova i podeljeni su u šest potfamilija: TRPC (kanonski), TRPV (vaniloid), TRPM (melastatin), TRPP (policistin), TRPML (mukolipin) i TRPA (ankirin) na osnovu njihove homologije aminokiselinskih sekvenci (12). Potfamilije mukolipina i policistina su nazvane po bolestima sa kojima su povezane - mukolipidozi i autozomno dominantnoj policističnoj bolesti bubrega (ADPKD). Potfamilija vaniloida dobila je ime po vaniloidnom (kapsaicinskom) receptoru TRPV1. Prvi melastatinski kanal (TRPM1) otkriven je kao protein prisutan u benignim nevusima, a odsutan u malignom melanomu (13). Od danas, potfamilija ankirina ima samo jednog člana, TRPA1, koji je bogat ankirinskim ponovcima na svom N-kraju.

Važno je istaći da su TRP kanali važni posrednici senzornih signala sa izraženim efektima na ćelijske funkcije i signalne puteve. Zaista, mutacije u genima koji kodiraju TRP kanale uzrok su nekoliko naslednih bolesti kod ljudi (tzv. „TRP kanalopatije“) koje utiču na kardiovaskularni, bubrežni, skeletni i nervni sistem. TRP kanali su takođe obećavajuće mete za otkrivanje lekova. Zaista, brojni moćni antagonisti TRPV1, TRPV3 i TRPA1 već su ušli u klinička ispitivanja kao novi analgetički agensi. Nedavno su polja istraživanja proširena na nove oblasti, kao što su astma, maligne bolesti, anksioznost, hipertrofija srca, kao i gojaznost i metabolički poremećaji. Bolje razumevanje funkcija TRP kanala u fiziološkim i patofiziološkim procesima trebalo bi da dovede do otkrića novih lekova za navedene bolesti i stanja (14).

TRPV1 kanal – Struktura, agonisti i antagonisti, mehanizmi delovanja

Otkako je TRPV1 otkriven poslednjih godina 20. veka (2), uloženi su opsežni naponi da se otkriju strukturni i funkcionalni detalji ovog polimodalnog proteina. Danas je jedan od najbolje opisanih članova TRP porodice jonskih kanala.

Za ovaj jonski kanal opisano je nekoliko agonista i antagonista egzogene i endogene prirode (Tabela 1.). Bez obzira na to, detaljni mehanizmi i opis mesta vezivanja su poznati samo za nekolicinu ovih jedinjenja.

TRPV1 je uglavnom zastupljen u neuronima trigeminalnih ganglija (TG) i neuronima malog prečnika unutar senzornih ganglija. Prvo je objavljeno da je polimodalan, reagujući na stimulse različite prirode kao što su toplota ($>43^{\circ}\text{C}$) i kapsaicin, jedinjenje prisutno u ljutim čili papričicama koje funkcioniše kao hemijski agonist kanala, izazivajući bol kod životinja i ljudi. Ubrzo nakon toga, pokazalo se da se TRPV1 takođe aktivira niskim ekstracelularnim pH ($\text{pH} \leq 5,9$). Važno je uzeti u obzir da kada je nekoliko stimulusa prisutno zajedno, aktivacija TRPV1 je potencirana (15). TRPV1 se u prisustvu ovih stimulusa otvara propuštajući naelektrisane jone kalcijuma u ćeliju. Takav priliv kalcijuma pokreće električne signale koji se šalju dalje u mozak da upozore na potencijalno štetne stimulse.

Poslednjih godina istraživačkog polja TRPV1 doživeo je rast, poboljšan ključnim podacima koje pružaju strukturne informacije visoke rezolucije putem krioelektronske mikroskopije kao najboljeg alata za strukturnu analizu nekoliko članova porodice TRP kanala. Krioelektronska mikroskopija (krio-EM) je strukturna biološka metoda koja se koristi za određivanje 3D strukture biomakromolekula. Nakon godina razvoja, krio-EM je postigao velika dostignuća, što je dovelo do revolucije u strukturnoj biologiji.

Jasno je, ipak, da je još potrebno raditi, kako bi se fini mehanizmi delovanja detaljno razjasnili. Primer onoga što možemo naučiti iz proučavanja kako agonisti utiču na funkciju TRPV1 je da smo otkrili da je lipoprotein-a (LPA), molekul koji pokazuje povećane nivoe tokom određenih inflamatornih procesa i bolesti, široko povezan sa stvaranjem bola i da se vezuje za C- terminalna mesta TRPV1, indukujući drugačije konformaciono stanje od onog uočenog u prisustvu kapsaicina (16).

Bol i TRPV1 kanal

TRPV1 kanali su eksprimirani u senzornim ganglijama i, kako smo već naveli, aktiviraju se kapsaicinom, toplotom i kiselim uslovima sredine. Aktivacija dovodi do priliva jona kalcijuma i natrijuma, što indukuje intracelularnu aktivnost koja je pretežno zavisna od kalcijuma. Iako tačan mehanizam delovanja ostaje nejasan, čini se da aktivacija TRPV1 kanala kapsaicinom modulira signalizaciju fosfoinozitola i promoviše vazodilataciju i akumulaciju proinflamatornih molekula. Ovi faktori naknadno senzibiliziraju primarne aferentne neurone i proizvode hiperalgeziju. Produžena izloženost kapsaicinu, obrnuto, „defunkcionalizuje“ TRPV1 kanale, u kojima se, prema nekim teorijama javlja mitohondrijalna disfunkcija koja remeti nocicepciju (17, 18).

Dakle, desenzibilizacija kapsaicinom ima jasan terapijski potencijal. Receptor za kapsaicin je identifikovan kao TRPV1 i akumulirani dokazi sugerišu ključnu ulogu TRPV1 u osećaju bola (19). Prvo, TRPV1 se aktivira višestrukim, već nabrojanim, bolnim stimulusima. Drugo, miševi sa nedostatkom TRPV1 pokazuju smanjenu termalnu hiperalgeziju kao odgovor na inflamatorne medijatore kao što su bradikinin i/ili NGF (20-22). Pored toga, oleoiletanolamid, endogeni agonist TRPV1 (23), indukuje ponašanje povezano sa visceralnim bolom kod miševa koje je inhibirano antagonistom TRPV1 kapsazepinom i odsutno je kod životinja bez TRPV1 (24). Farmakološka modulacija bola često je predmet ispitivanjima u brojnim pretkliničkim, posebno

Endogeni agonisti	Endogeni antagonisti	Egzogeni agonisti	Egzogeni antagonisti
Anandamid	Resolvin D2	Kapsaicin	Kapsazepin
N-arahidonoildopamin		Resiniferatokin	Jodo-resiniferatoksin
N-oleoildopamin		Piperin	Johimbin
12- i 15- hidroperoksieikozatetraenska kiselina		2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB)	ABT-102, AMG-517, AZD-1386, DWP- 05195, GRC-6211, JTS-653, MK-2295, PHE377, SB-705498
5- i 15- hidroksieikozatetraenska kiselina		“Ornithoctonus huvena” toksin	AG489, AG505
Leukotrien B4		Gingerol	Thapsigargin
9- i 13-hidroksi- oktadekadienska kiselina (ODE)		Evodiamin	
Oleoiletanolamid		Kanabidiol	
Palmitoiletanolamid		Kanabigerol	
Lizofosfatidna kiselina		Poligodial	
		Vanilotoksin	

Tabela 1. Endogeni i egzogeni ligandi TRPV1 kanala (prilagođeno prema referenci br. 11)

animalnim *in vivo* modelima (25-27). Tako je, farmakološka blokada TRPV1 ili ispitivanje na nokdaun životinjama pokazalo analgetičku aktivnost u različitim prekliničkim modelima bola, uključujući artritis (28) i kancerski bol (29).

Pomalo neočekivano, studije genotipizacije do sada nisu uspele da identifikuju bilo kakav polimorfizam TRPV1 povezan sa neuropatskim bolom, iako su varijante TRPV1 bile u korelaciji sa izmenjenom somatosenzornom funkcijom kod pacijenata sa neuropatskim bolom (30). Čini se da genotip TRPV1 Ile585Ile smanjuje rizik od razvoja osteoartritisa kolena (31). Ipak, nisu sve varijante TRPV1 bezopasne. Na primer, u velikoj evropskoj studiji, pokazano je da šest SNP gena TRPV1 daje veći rizik od hroničnog kašlja (32).

Kada su u pitanju farmakološki agensi koji su do sada ispitivani za različita bolna stanja, najviše informacija imamo upravo o primeni kapsaicina. Kapsaicin, formulisan kao krema (gel, losion) za lokalnu upotrebu ili transdermalni flaster, efikasan je za lečenje bolova usled manjih napreznja mišića ili grčeva i bolova u zglobovima usled osteoartritisa. Kreme koje sadrže kapsaicin se decenijama koriste za lečenje hroničnih bolnih stanja kao što je dijabetička neuropatija (33). Uprkos njihovoj popularnosti, kontrolisane kliničke studije nisu pronašle dokaze da ove kreme imaju veću analgetičku moć od placeba (34). Flaster je dostupan kao proizvod niske koncentracije (npr. 0,025%, 0,075% i 0,25%) i visoke koncentracije (npr. 8%). Godine 2009., kapsaicin je odobrila Američka uprava za hranu i lekove (FDA) za lečenje neuropatskog bola povezanog sa postherpetičkom neuralgijom (Kapsaicin 8% flaster; *Kutenza*[™]). Takođe, jedna nedavna studija je objavila da se 8% -ti flaster kapsaicina pokazao superiornijim u pogledu otklanjanja jedne vrste perifernog neuropatskog bola (35).

Ipak, čini se da postoji izvesna nesigurnost u pogledu terapijske efikasnosti kapsaicina u cilju upravljanja bolom, pa je došlo je do daljeg razvoja selektivnih analoga kapsaicina.

Trenutno je u toku ili je završeno nekoliko malih kliničkih studija kako bi se utvrdila efikasnost kapsaicina za lečenje drugih vrsta bola (bol uzrokovan oštećenjem nerava, bol nerava nakon operacije i drugi) i drugih stanja kao što je rinitis (36). Samo nekoliko njih je do sada prijavilo svoje rezultate. Na primer, nedavno je pokazano (kliničko ispitivanje NCT02288156; <https://www.clinicaltrials.gov>) da je 0,01 mM kapsaicin sprej za nos efikasan u lečenju idiopatskog rinitisa (37). Pored toga, umereno ublažavanje bola nakon jednog 30-minutnog tretmana kapsaicinom (kapsaicin 8% flaster naspram placebo flastera; NCT01533428; <https://www.clinicaltrials.gov>) prijavljeno je kod pacijenata sa bolnom dijabetičkom perifernom neuropatijom (38). *Brown* i saradnici prijavili da jedna 30-minutna aplikacija 8% flastera kapsaicina pruža olakšanje bola tokom čak 12 nedelja kod pacijenata sa distalnom senzornom polineuropatijom povezanom sa HIV-om (NCT00321672; <https://www.clinicaltrials.gov>) (39).

Drugi agens, resiniferatoksin predstavlja ultrapotentan agonist TRPV1 sa znatno većom selektivnošću i efikasnošću od kapsaicina. Lokalna primena resiniferatoksina izaziva reverzibilnu analgeziju, a injekcija proizvodi ireverzibilnu analgeziju kroz visoko selektivnu neuronsku citotoksičnost (40). Intraartikularna primena resiniferatoksina je pokazala dugotrajan analgetički efekat i funkcionalno poboljšanje kod eksperimentalnog modela osteoartritisa kod pasa (41). Intratekalna injekcija je izazvala dugotrajnu supresiju bola na životinjskim modelima, a u ovom trenutku je u toku je kliničko ispitivanje intratekalne primene resiniferatoksina kod izraženih malignih bolova (42).

Uopšteno govoreći, ispitivanja lekova koji bi delovali preko TRPV1 receptora za ublažavanje bola, posebno je značajno za poboljšanje terapijskih efekata i smanjenje neželjenih efekata opioidnih analgetika. Tako je pokazano da kombinacije lekova ili razvoj lekova sa dvostrukim dejstvom koji istovremeno ciljaju na μ -opioidne i TRPV1 receptore mogu ublažiti toleranciju na opioide i hiperalgeziju izazvanu opioidima (43).

Dodatno je, agonist TRPV1, MRD-652, nedavno pokazao obećavajuće rezultate na miševima u terapiji malignog bola, dok se resiniferatoksin, pokazao efikasnim u ublažavanju bolova kod pasa sa karcinomom kostiju. Klinička ispitivanja prve generacije ovih lekova na ljudima bila su uglavnom neuspešna. Neka su čak ranije prekinuta zbog opasnih neželjenih efekata, uključujući povrede od opekotina zbog narušene percepcije toplote. Međutim, lek druge generacije, mavatrep, nedavno se pokazao efikasnim protiv osteoartritičnog bola sa prihvatljivim neželjenim efektima (44).

Antagonisti TRPV1 su takođe procenjeni kao potencijalni analgetički agensi sa tekućim kliničkim ispitivanjima, ali neželjeni efekti su uključivali indukovanu hipertermiju i oštećenu termosenzaciju. Dakle, ono što se do sada pokazalo kao glavna prekretnica u kliničkim ispitivanjima jeste poremećaj percepcije toplote, čime bi se pacijenti doveli u opasnost od pojave opekotina, zbog čega su studije uglavnom i obustavljane (11).

Potencijalan alternativni pristup za zaobilaženje neželjenih efekata lekova koji bi delovali preko TRPV1 je ciljanje TRPV1 u obolela, ali ne i zdrava tkiva (14, 34). Ipak, tek će neka buduća istraživanja pokazati koliko su ovakva shvatanja realna i efikasna u kliničkim uslovima.

Inflamacija i TRPV1 kanal

Nedavne studije sve više pokazuju da se jonski kanali mogu koristiti kao potencijalne mete za modulaciju imunološkog odgovora i za lečenje inflamatornih poremećaja i različitih maligniteta. Delovanje urođenih i adaptivnih imunih ćelija je strogo regulisano jonskim signalima koje obezbeđuje mreža različitih jonskih kanala. TRPV1 kanal je, kako je nedavno pokazano, eksprimiran na ćelijama imunog sistema, povezan sa bolom i upalom, ali i aberantno eksprimiran u nekoliko tipova tumora. TRPV1 kanal nije uključen samo u signalizaciju kalcijuma koja je fundamentalna za mnoge ćelijske procese, već takođe učestvuje u interakcijama između ćelije i okruženja koje značajno utiče na ponašanje ćelije. Stoga, TRPV1 pruža potencijalnu vezu između procesa upale, maligniteta i imuniteta i nudi nove mogućnosti lečenja. Ipak, u mnogim slučajevima, rezultati u vezi sa TRPV1 su kontradiktorni i potrebno ih je dodatno razjasniti (45).

Tako su npr. skorije studije o ulozi TRPV1 u procesu upale iznenađujuće pokazale da farmakološka ili genetska ablacija TRPV1 kanala zapravo može pogoršati simptome inflamacije.

Feng i saradnici su pokazali da nedostatak TRPV1 kanala dovodi do inflamacije kože u modelu alergijskog kontaktnog dermatitis kod miševa. Autori su pokazali da je nedostatak TRPV1 povezan sa pojačanom regulacijom ekspresije proinflamatornih citokina kao što su TNF- α , IL-1b i IL-6 (46).

Kod pacova kojima je ubrizgan lipopolisaharid (LPS), blokada TRPV1 je snižavala arterijski krvni pritisak i nivoe supstance P, norepinefrina i epinefrina, što je rezultiralo smanjenjem stope preživljavanja 24 i 48 h nakon primene LPS (47). Ipak, u svetlu novijih studija, takav efekat bi mogao biti rezultat uticaja na jedan drugi kanal - TRPA1, a ne na TRPV1 (48).

Takođe, u modelu upale bubrega i jetre izazvane LPS-om, TRPV1 nokaut miševi su pokazali značajno veću infiltraciju neutrofila, viši nivo TNF- α , IL-1b i IL-6 citokina u serumu, snažniji inflamatorni odgovor i naknadno pojačano oštećenje organa tokom endotoksičnog šoka (49). Ovo ukazuje da TRPV1 zapravo može imati zaštitnu i antiinflamatornu ulogu.

Takođe, *Clark* i saradnici (50) su pokazali da genetska delecija TRPV1 u mišjem modelu peritonealne sepsa izazvane LPS-om dovodi do pojačane hipotenzije, hipotermije i edema jetre, što ukazuje da je TRPV1 uključen u regulaciju odgovora na sepsu i da ima sveukupnu zaštitnu ulogu.

Takođe, pokazalo se da primena agonista TRPV1 smanjuje upalu. *Bryant* i saradnici (51) su pokazali da injekcija kapsaicina smanjuje smrtnost pacova u modelu abdominalne sepse. Miševi sa upalom kostiju izazvanom LPS-om, lečeni kapsaicinom, pokazali su smanjenu proizvodnju prostaglandina E i kasniju resorpciju kostiju (52). Prisustvo kapsaicina u kulturi ćelija pre stimulacije LPS smanjilo je proizvodnju citokina i hemokina, ekspresiju molekula adhezije i aktivaciju NF- κ B, ali je povećalo proizvodnju azotnog oksida (NO) i fosforilaciju endotelne sintaze azot oksida (eNOS). Autori sugerišu da je aktivacija TRPV1 u endotelnim ćelijama povezana sa aktivacijom eNOS/NO puta i posledičnom supresijom inflamacije (53).

Dakle, poznato je od ranije da TRPV1 može imati proinflamatornu ulogu, ali sve više dokaza upućuje i na njegovu antiinflamatornu i zaštitnu ulogu. Važno je istaći da je uključivanje TRPV1 u proces inflamacije regulisan na nekoliko nivoa, počevši od ekspresije gena do post-transkripcionih modifikacija. Ovaj proces je takođe povezan sa mnogim regulatornim proteinima i višestrukim inflamatornim medijatorima, što bi moglo prikriti pravu ulogu TRPV1 u samoj inflamaciji. Štaviše, TRPV1 se može eksprimirati na različitim podtipovima ćelija kao što su primarni senzorni nervi ili imune ćelije i interakcija između njih može oblikovati konačni ishod aktivacije TRPV1.

Maligne bolesti i TRPV1

Nekoliko studija se do sada bavilo aktivacijom TRPV1 u terapiji protiv karcinoma korišćenjem Ca^{2+} signalizacije. Pokazalo se da aktivacija TRPV1 kapsaicinom (150 mM) značajno smanjuje proliferaciju i indukuje apoptozu agresivne ćelijske linije karcinoma dojke (SUM149PT) (54). S druge strane, *Pecze* i saradnici (55) su pokazali da uprkos prisustvu ekspresije proteina TRPV1 u ćelijskim linijama dojke (MCF7, MDA-MB-231, BT-474) i karcinoma prostate (PC-3, Du 145, LNCaP), primena kapsaicina od 50 mM nije pokazala nikakav citotoksični efekat. Takva odstupanja mogu delimično biti rezultat složenosti ćelijskih signalnih puteva posredovanih i integrisanih TRPV1, ali i drugih faktora koji utiču na funkcionisanje TRPV1. Štaviše, sam kapsaicin može delovati i drugim mehanizmima, a ne samo putem signalnog puta kalcijuma zavisnog od TRPV1. Na primer, *Hwang* i saradnici (56) su pokazali da je ko-kancerogeno dejstvo kapsaicina u kancerogenezi kože povezano sa aktivacijom EGFR/Akt puta, a ne sa Ca^{2+} signalizacijom preko TRPV1. Slično tome, *Bao* i saradnici (57) su pokazali da u ćelijama osteosarkoma MG63 tretman kapsaicinom povećava fosforilaciju AMPK i p53 na način nezavisan od TRPV1. Takođe, *Pramanik* i dr. (58) su otkrili da kapsaicin inhibira b-katenin/TCF-1 signalizaciju u malignim ćelijama.

Takođe, i ko-ekspresija sa drugim jonskim kanalima može imati značajne fiziološke efekte. *Weng* i saradnici (59) su pokazali da regulacija povezanosti između TRPA1 i TRPV1 transmembranskim proteinom Tmem100 ima značajan uticaj na percepciju bola. Autori su otkrili da bliska povezanost između TRPA1 i TRPV1 dovodi do TRPV1 zavisne inhibicije TRPA1, dok je u prisustvu Tmem TRPA1-V1 povezanost bila slabija. Takvi rezultati ukazuju da se delovanje TRPV1 u mnogim slučajevima ne može razmatrati odvojeno od TRPA1.

Nekoliko studija je pokazalo da primena hemoterapije zajedno sa aktivatorom TRPV1 — kapsaicinom, dovodi do sinergističkog efekta koji dovodi do povećane apoptoze i supresije migracije tumorskih ćelija. Studije *Deveci* i saradnika su pokazali da je aktivacija TRPV1 povezana sa značajno višim nivoom apoptoze u ćelijskoj liniji humanog karcinoma dojke MCF-7 nego u ćelijama tretiranim samo lekom - 5-fluorouracilom (60). Slično, *Nur* i saradnici su otkrili da je apoptotički efekat leka cisplatina poboljšan aktivacijom TRPV1 u ćelijskoj liniji MCF-7 (61). Mehanizam kojim aktivacija TRPV1 kanala poboljšava rezultate hemoterapije tek treba da se utvrdi. Spekuliše se da aktivacija TRP kanala i njihovo naknadno otvaranje omogućavaju direktnu permeaciju malih citotoksičnih lekova kroz pore (62). To je u skladu sa studijama *Hofmann-a* i saradnika

koji supokazali da je TRPV1 uključen u unos anandamida, endogenog kanabinoida i agonista TRPV1 uključenog u tumor-angiogenezu (63). Autori sugeriraju da bi TRPV1 mogao stvoriti pore koje omogućavaju prolaz malih molekula. *Ortega-Guerrero* je izvršio simulaciju koja pokazuje veliku verovatnoću prodiranja doksorubicina kroz TRPV1, ali samo kada je kanal proširen (64). Na osnovu ovih rezultata, autori su implicirali da TRPV1 kanal može poslužiti kao put za sisteme za isporuku lekova za terapiju malignih bolesti. Uprkos ovim obećavajućim rezultatima, ne možemo isključiti da postoji drugi, nepoznati mehanizam uključen u transport hemoterapeutskih agenasa.

Imunološki sistem i TRPV1

Nedavno je otkriveno da je TRPV1 eksprimiran u ćelijama urođenog i adaptivnog imunog sistema uključujući makrofage, dendritične ćelije, T limfocite, NK ćelije (65, 66). Činilo se da je TRPV1 navodni modulator funkcionisanja imunih ćelija jer je uključen i u signalizaciju kalcijuma i u transdukciju spoljašnjih stimulansa kao što su temperatura ili pH. Međutim, podaci o njegovoj tačnoj ulozi u imunološkom sistemu nisu dobro utvrđeni i, u mnogim slučajevima, rezultati su kontradiktorni.

Prijavljeno je da je TRPV1 uključen u odbrambeni mehanizam povezan sa makrofagima. Pokazalo se da tretman kapsazepinom, antagonistom TRPV1, značajno smanjuje proizvodnju proinflammatory citokina kao što su IL-6, IL-1b i IL-18 i ciklooksigenaze 2 (COX-2) u LPS-stimulisanim makrofagima kod miševa (67). Podaci ukazuju da je TRPV1 uključen u aktivnost makrofaga i da se potencijalni antagonist TRPV1 može koristiti za suzbijanje inflamatornih odgovora i za lečenje sepse. Takođe, aktivacija TRPV1 evodiaminom (0,5 mM) ili kapsaicinom (10 mM) u primarnim makrofagima kod miševa je bila povezana sa smanjenjem proizvodnje proinflammatory citokina kao što su MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) i IL-6 (68). Ukidanje TRPV1 u mišjem modelu izazvalo je oštećenje odgovarajućeg odbrambenog mehanizma povezanog sa makrofagima što je dovelo do sistemske upale. *Nevius* i saradnici su pokazali da makrofagi u limfnim čvorovima pankreasa reaguju na oralno primenjen kapsaicin i pojačavaju ekspresiju antiinflammatory citokina kao što je IL-10 (69). Zanimljivo je da je povećanje populacije makrofaga kapsaicinom povezano sa smanjenjem proliferacije autoreaktivnih T ćelija. Autori su takođe pokazali da kapsaicin nije inhibirao proliferaciju T ćelija kod nokaut TRPV1 miševa.

Svakako će tek buduća istraživanja u vezi sa ovom tematikom razjasniti mnoge postojeće nedoumice.

Kardiovaskularni sistem i TRPV1

Poslednjih godina raste broj istraživanja u vezi sa potencijalnim efektima koje bi preko TRPV1 kanala mogli imati uticaj na kardiovaskularni sistem. Tako se zna da kapsaicin pored antimikrobnih, antikancerogenih i antinociceptivnih, poseduje i vazodilatatorna svojstva (36).

Nekoliko korisnih kardiovaskularnih efekata kapsaicina takođe je otkriveno na različitim životinjskim modelima. Međutim, postoji malo ili nimalo kliničkih dokaza koji podržavaju ideju da kapsaicin može biti od pomoći u lečenju kardiovaskularnih bolesti kod ljudi. Naročito, njegova primena u obliku flastera (*Kutenza™*) je kontraindиковana kod pacijenata koji imaju hipertenziju jer može povećati krvni pritisak, bilo tokom ili neposredno nakon lečenja (<https://www.kutenza.com>).

Međutim, sve veći broj dokaza otkriva vazokonstriktorni potencijal kapsaicina koji deluje preko vaskularnog TRPV1 kanala i sugerise da nepotrebna velika potrošnja kapsaicina može izazvati ozbiljne posledice, uključujući vazospazam i infarkt miokarda kod ljudi sa pridruženim bolestima ili poznatim faktorima rizika, posebno u prisustvu proinflammatory medijatora. Dakle, poznato je da postoji ravnoteža između vazodi-

latatornog (preko endotela) i vaskonstriktornog (preko vaskularnih glatkih mišića) efekata kapsaicina na kardiovaskularni sistem. Posebno, postojanje gojaznosti u kombinaciji sa povišenim kolesterolom, može da promoviše značajnu endotelnu disfunkciju i preokrene ravnotežu ka masivnim konstrikcijama glatkih mišića izazvanim kapsaicinom (70-72).

Dodatna istraživanja u vezi sa TRPV1 kanalom i kardiovaskularnim sistemom, postoje u vezi sa procesom ateroskleroze. Tako je pokazano da aktivacija TRPV1 može regulisati metabolizam lipida, smanjiti stvaranje penastih ćelija, zaštititi endotelne ćelije, inhibirati proliferaciju ćelija glatkih mišića i inhibirati inflamaciju i oksidativni stres. Ukratko, aktivacija TRPV1 može poboljšati aterosklerozu kroz različite mehanizme, ali je njegova klinička primena fokusirana uglavnom na analgeziju. Iako kapsaicin može aktivirati TRPV1 kanale i smanjiti skladištenje lipida i formiranje ateroskleroze, njegova hronična toksičnost ograničava njegovu kliničku primenu (73).

Stoga, iako prepoznavamo korisnu ulogu kapsaicina, predlažemo da hranu/suplemente koji sadrže kapsaicin treba umereno da konzumiraju pacijenti sa poznatim kardiovaskularnim oboljenjima, a posebno oni koji imaju bilo kakva proinflamatorna stanja. Većina dostupnih podataka o efektima kapsaicina na kardiovaskularni sistem je proizašla iz studija na životinjama. Stoga, postoji hitna potreba za velikim dvostruko slepim kliničkim ispitivanjima kako bi se utvrdilo da li je kapsaicin koristan za pacijente koji imaju kardiovaskularne bolesti.

Metabolizam i TRPV1

Skorije studije pokazuju da jonski kanal TRPV1 može imati uticaja i na energetske homeostazu. Kontrola energetske homeostaze je važna za održavanje normalne telesne težine. Tako, TRPV1 može biti uključen u energetske homeostazu, kako u kontroli unosa hrane tako i u potrošnji energije. Na periferiji, moguće je da TRPV1 može uticati na apetit kroz kontrolu nivoa hormona regulatora apetita ili kroz modulaciju gastrointestinalne vagalne aferentne signalizacije. Dalje, TRPV1 može povećati potrošnju energije kroz proizvodnju toplote. Dodatak ishrani sa agonistima TRPV1, kao što je kapsaicin, dao je oprečne rezultate (neke studije ukazuju na smanjenje unosa hrane i povećanje potrošnje energije, dok su druge dale suprotne rezultate). Ipak, sve je očiglednije da TRPV1 često neregulisan u gojaznosti i da doprinosi njenom razvoju. Mehanizmi iza ove disregulacije su trenutno nepoznati, ali interakcije sa drugim sistemima, kao što su endokanabinoidni sistemi, mogu biti izmenjene i stoga igraju važnu ulogu u ovim procesima. Skorije studije ukazuju da su TRPV1 kanali uključeni i u proces lučenja insulina. Stoga, uzevši sve navedeno u obzir, TRPV1 može biti značajna meta za lekove za mršavljenja i dijabetes (74). Međutim, potrebna su dalja istraživanja da bi se u potpunosti razjasnila uloga TRPV1 u svim navedenim procesima.

Zaključak

Istraživanja u vezi sa jonskim kanalom TRPV1 poslednjih godina dobijaju na sve većem značaju, a posebno nakon dobijanja Nobelove nagrade za medicinu i fiziologiju prošle godine u vezi sa efektima koji se ostvaruju upravo preko ovog značajnog proteina. Nema sumnje da bi signalizacija zasnovana na TRPV1 mogla učestvovati u regulaciji brojnih ćelijskih funkcija kako u zdravom, tako i u bolesti izmenjenom organizmu. TRPV1 je prisutan na periferiji što ga čini lako dostupnom metom u poređenju sa lekovima koji ciljaju isključivo centralni nervni sistem. Ipak, postoje i brojne prepreke koje se moraju savladati na ovom istraživačkom putu u vezi sa TRPV1.

Prvo, TRPV1 pokazuje šarenoliku prirodu u pogledu njegovog izražavanja i aktivacije. U mnogim slučajevima, rezultati u vezi sa njegovim efektima na nivou terapije bola, inflamacije, autoimunih bolesti, malignih

nih, kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti pokazuju kontradiktorne rezultate. Dizajn eksperimenta, kao i analiza rezultata, zahtevaju stoga veći oprez. Važno je uzeti u obzir razlike koje proizilaze iz tipa studije (*in vitro* naspram *in vivo*), tipa ćelija i naknadnog nivoa ekspresije, primenjenih doza lekova, sinergističkog ili antagonističkog uticaja endogenih agonista ili tačkastih mutacija koji mogu da modulišu aktivnost kanala.

Drugo, TRPV1 je u interakciji sa drugim sistemima i deli puteve koje obično koriste drugi signalni molekuli. Stoga, bez jasnog razumevanja interakcije TRPV1 sa drugim sistemima, malo je verovatno da će lekovi koji deluju preko TRPV1 pokazivati uniformne i pouzdane rezultate.

Štaviše, tačni molekularni putevi u koje je uključen TRPV1 nisu dobro shvaćeni i stoga je potrebno preduzeti dalja ispitivanja u tom smislu. Takođe, treba koristiti specifičnije aktivatore i blokatore jonskog kanala TRPV1 kako bi se preciznije procenila njegova funkcija i izbegli sporedni efekti.

Najzad, potrebno je istaći da su studije o ulozi TRPV1 kanala složene i zahtevne i da će tek godine istraživanja koje su pred nama pružiti pravi uvid u značaj pojedinih terapijskih opcija i njihove kliničke relevantnosti.

Zahvalnica:

Ovaj rad je podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Srbije (Projekt br: ON175023).

Literatura:

1. Logan DW. Hot to touch: the story of the 2021 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Dis Model Mech* 2021;14 (10): dmm049352. doi:10.1242/dmm.049352
2. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-824.
3. Laursen, WJ, Schneider ER, Merriman DK, Bagriantsev SN and Gracheva EO. (2016). Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113: 11342-11347.
4. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010; 330: 55-60.
5. Ranade SS, Qiu Z, Woo SH, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM et al. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111: 10347-10352.
6. Ranade SS, Woo SH, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M et al. Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature* 2014; 516: 121-125.
7. Marshall KL, Saade D, Ghitani N, Coombs AM, Szczot M, Keller J et al. PIEZO2 in sensory neurons and urothelial cells coordinates urination. *Nature* 2020; 588: 290-295.
8. Zeng WZ, Marshall KL, Min S, Daou I, Chapleau MW, Abboud FM et al. PIEZO2 mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. *Science* 2018; 362: 464-467.
9. Aschenbrenner K, Hummel C, Teszmer K, Krone F, Ishimaru T, Seo HS et al. The influence of olfactory loss on dietary behaviors. *Laryngoscope* 2008;118: 135-144.
10. Zhang Y, Zhang D, Qin C. Animal models and experimental medicine and the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021-TRPV and PIEZO receptors for temperature and touch sensation. *Animal Model Exp Med* 2021;4 (4): 297-299.
11. Kaneko Y, Szallasi A. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol* 2014;171 (10): 2474-507.
12. Nelson PL, Beck A, Chen H. Transient receptor proteins illuminated: current views on TRPs and disease. *Vet J* 2011;187: 153-164.
13. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, et al. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 1998;58: 1515-1520.
14. Iftinca M, Defaye M, Altier C. TRPV1-Targeted Drugs in Development for Human Pain Conditions. *Drugs* 2021;81 (1): 7-27.
15. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21: 531-543.
16. Benítez-Angeles M, Morales-Lázaro SL, Juárez-González E, Rosenbaum T. TRPV1: Structure, Endogenous Agonists, and Mechanisms. *Int J Mol Sci* 2020;21 (10): 3421.
17. Chen R, Coppes OJM, Urman RD. Receptor and Molecular Targets for the Development of Novel Opioid and Non-Opioid Analgesic Therapies. *Pain Physician* 2021;24 (2): 153-163.
18. Banerjee S, McCormack S. Capsaicin for Acute or Chronic Non-Cancer Pain: A Review of Guidelines [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2020.
19. Gomtsyan A, Faltynek C, editors. Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery: Targeting Pain and Other Pathological Disorders. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2010.
20. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000;405: 183-187.
21. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288: 306-313.
22. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 2001;411: 957-962.
23. Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 2003;278: 30429-30434.
24. Wang P, Yan Z, Zhong J, Chen J, Ni Y, Li L et al. Transient receptor potential vanilloid 1 activation enhances gut glucagon-like peptide-1 secretion and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 2012;61: 2155-2165.

25. Vujović KS, Vučković S, Vasović D, Medić B, Knežević N, Prostran M. Additive and antagonistic antinociceptive interactions between magnesium sulfate and ketamine in the rat formalin test. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2017;77 (2): 137–146.
26. Vučković SM, Savić Vujović KR, Srebro DP, Medić BM, Stojanović RM, Vučetić CS, Divac N, Prostran MS. The antinociceptive efficacy of morphine-ketamine-magnesium combination is influenced by the order of medication administration. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19 (17): 3286–94.
27. Savic Vujovic KR, Vuckovic S, Srebro D, Medic B, Stojanovic R, Vucetic C, Prostran M. A synergistic interaction between magnesium sulphate and ketamine on the inhibition of acute nociception in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19 (13): 2503–9.
28. Joshi SK, Honore P. The role of TRPV1 receptors in osteoarthritic pain. In: Gomtsyan A, Faltynek C, editors. *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery. Targeting Pain and Other Pathological Disorders*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2010. pp. 175–190.
29. Jimenez-Andrade JM, Mantyh P. TRPV1 and bone cancer pain. In: Gomtsyan A, Faltynek C, editors. *Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery. Targeting Pain and Other Pathological Disorders*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2010. pp. 191–205.
30. Binder A, May D, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, et al. Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS One* 2010;6: e17387.
31. Valdes AM, De Wilde G, Doherty SA, Lories RJ, Vaughn FL, Laslett LL, et al. The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70: 1556–1561.
32. Smit LA, Kogevinas M, Antó JM, Bouzigon E, González JR, Le Moual N, et al. Transient receptor potential genes, smoking, occupational exposures and cough in adults. *Respir Res* 2012;13: 26.
33. Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* 2008;24: 142–154.
34. Szallasi A, Sheta M. Targeting TRPV1 for pain relief: limits, losers and laurels. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21: 1351–1369.
35. Cruccu G, Nurmikko TJ, Ernault E, Riaz FK, McBride WT, Haanpää M. Superiority of capsaicin 8% patch versus oral pregabalin on dynamic mechanical allodynia in patients with peripheral neuropathic pain. *Eur J Pain* 2018;22 (4): 700–706.
36. Munjuluri S, Wilkerson DA, Sooch G, Chen X, White FA, Obukhov AG. Capsaicin and TRPV1 Channels in the Cardiovascular System: The Role of Inflammation. *Cells* 2021;11 (1): 18.
37. Van Gerven L, Steelant B, Cools L, Callebaut I, Backaert W, de Hoon J et al. Low-dose capsaicin (0.01 mM) nasal spray is equally effective as the current standard treatment for idiopathic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2021;147: 397–400.
38. Simpson DM, Robinson-Papp J, Van J, Stoker M, Jacobs H, Snijder RJ et al. Capsaicin 8% Patch in Painful Diabetic Peripheral Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Pain* 2017;18: 42–53.
39. Brown S, Simpson DM, Moyle G, Brew BJ, Schifitto G, Larbalestier N et al. NGX-4010, a capsaicin 8% patch, for the treatment of painful HIV-associated distal sensory polyneuropathy: Integrated analysis of two phase III, randomized, controlled trials. *AIDS Res Ther* 2013;10: 5.
40. Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Furuse S, Namiki A. SB366791, a TRPV1 antagonist, potentiates analgesic effects of systemic morphine in a murine model of bone cancer pain. *Br J Anaesth* 2009;102: 251–258.
41. Nguyen TL, Nam YS, Lee SY, Kim HC, Jang CG. Effects of capsazepine, a transient receptor potential vanilloid type 1 antagonist, on morphine-induced antinociception, tolerance, and dependence in mice. *Br J Anaesth* 2010;105: 668–674.
42. Bao Y, Gao Y, Yang L, Kong X, Yu J, Hou W et al. The mechanism of μ -opioid receptor (MOR)-TRPV1 crosstalk in TRPV1 activation involves morphine anti-nociception, tolerance and dependence. *Channels* 2015;9: 235–243.
43. Wang X, Bao C, Li Z, Yue L, Hu L. Side Effects of Opioids Are Ameliorated by Regulating TRPV1 Receptors. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19 (4): 2387.
44. Koivisto AP, Belvisi MG, Gaudet R, Szallasi A. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat Rev Drug Discov* 2021: 10.1038/s41573-021-00268-4.
45. Bujak JK, Kosmala D, Szopa IM, Majchrzak K, Bednarczyk P. Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel. *Front Oncol* 2019;9: 1087.

46. Feng J, Yang P, Mack MR et al. Sensory TRP channels contribute differentially to skin inflammation and persistent itch. *Nat Commun* 2017; 8: 980.
47. Wang Y, Novotny M, Quaiserová-Mocko V, Swain GM, Wang DH. TRPV1-mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294: R1517–23.
48. Kistner K, Siklosi N, Babes A, Khalil M, Selescu T, Zimmermann K et al. Systemic desensitization through TRPA1 channels by capsazepine and mustard oil - a novel strategy against inflammation and pain. *Sci Rep* 2016;6: 28621.
49. Wang Y, Wang DH. TRPV1 ablation aggravates inflammatory responses and organ damage during endotoxic shock. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20: 1008–15.
50. Clark N, Keeble J, Fernandes ES, Starr A, Liang L, Sugden D et al. The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin. *FASEB J* 2007;21: 3747–55.
51. Bryant P, Shumate M, Yumet G, Lang CH, Vary TC, Cooney RN. Capsaicin-sensitive nerves regulate the metabolic response to abdominal sepsis. *J Surg Res* 2003;112: 152–61.
52. Kobayashi M, Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T et al. Capsaicin, a TRPV1 ligand, suppresses bone resorption by inhibiting the prostaglandin E production of osteoblasts, and attenuates the inflammatory bone loss induced by lipopolysaccharide. *ISRN Pharmacol* 2012;2012: 439860.
53. Wang Y, Cui L, Xu H, Liu S, Zhu F, Yan F, et al. TRPV1 agonism inhibits endothelial cell inflammation via activation of eNOS/NO pathway. *Atherosclerosis* 2017;260: 13–9.
54. Weber LV, Al-Refae K, Wölk G, Bonatz G, Altmüller J, Becker C et al. Expression and functionality of TRPV1 in breast cancer cells. *Breast Cancer* 2016;8: 243–52.
55. Pecze L, Jósavay K, Blum W, Petrovics G, Vizler C, Oláh Z, et al. Activation of endogenous TRPV1 fails to induce overstimulation-based cytotoxicity in breast and prostate cancer cells but not in pain-sensing neurons. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863: 2054–64.
56. Hwang MK, Bode AM, Byun S, Song NR, Lee HJ, Lee KW et al. Cocarcinogenic effect of capsaicin involves activation of EGFR signaling but not TRPV1. *Cancer Res* 2010; 70: 6859–69.
57. Bao Z, Dai X, Wang P, Tao Y, Chai D. Capsaicin induces cytotoxicity in human osteosarcoma MG63 cells through TRPV1-dependent and -independent pathways. *Cell Cycle* 2019;18: 1379–92.
58. Pramanik KC, Fofaria NM, Gupta P, Ranjan A, Kim SH, Srivastava SK. Inhibition of β -catenin signaling suppresses pancreatic tumor growth by disrupting nuclear β -catenin/TCF-1 complex: critical role of STAT-3. *Oncotarget* 2015;6: 11561–74.
59. Weng HJ, Patel KN, Jeske NA, Bierbower SM, Zou W, Tiwari V, et al. Tmem100 is a regulator of TRPA1-TRPV1 complex and contributes to persistent pain. *Neuron* 2015; 85: 833–46.
60. Deveci HA, Nazıroglu M, Nur G. 5-Fluorouracil-induced mitochondrial oxidative cytotoxicity and apoptosis are increased in MCF-7 human breast cancer cells by TRPV1 channel activation but not *Hypericum perforatum* treatment. *Mol Cell Biochem* 2018;439: 189–98.
61. Nur G, Nazıroglu M, Deveci HA. Synergic prooxidant, apoptotic and TRPV1 channel activator effects of alpha-lipoic acid and cisplatin in MCF7 breast cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res* 2017;37: 569–77.
62. Nabissi M, Morelli MB, Santoni M, Santoni G. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis* 2013;34: 48–57.
63. Hofmann NA, Barth S, Waldeck-Weiermair M, Klec C, Strunk D, Malli R et al. TRPV1 mediates cellular uptake of anandamide and thus promotes endothelial cell proliferation and network-formation. *Biol Open* 2014;3: 1164–72.
64. Ortega-Guerrero A, Espinosa-Duran JM, Velasco-Medina J. TRPV1 channel as a target for cancer therapy using CNT-based drug delivery systems. *Eur Biophys J* 2016; 45: 423–33.
65. Majhi RK, Sahoo SS, Yadav M, Pratheek BM, Chattopadhyay S, Goswami C. Functional expression of TRPV channels in T cells and their implications in immune regulation. *FEBS J* 2015;282: 2661–81.
66. Assas BM, Wakid MH, Zakai HA, Miyan JA, Pennock JL. Transient receptor potential vanilloid 1 expression and function in splenic dendritic cells: a potential role in immune homeostasis. *Immunology* 2016;147: 292–304.
67. Ninomiya Y, Tanuma SI, Tsukimoto M. Differences in the effects of four TRPV1 channel antagonists on lipopolysaccharide-induced cytokine production and COX-2 expression in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;484: 668–74.

68. Zhao JF, Ching LC, Kou YR, Lin SJ, Wei J, Shyue SK, et al. Activation of TRPV1 prevents OxLDL-induced lipid accumulation and TNF- α -induced inflammation in macrophages: role of liver X receptor α . *Mediators Inflamm* 2013;2013: 925171.
69. Nevius E, Srivastava PK, Basu S. Oral ingestion of Capsaicin, the pungent component of chili pepper, enhances a discreet population of macrophages and confers protection from autoimmune diabetes. *Mucosal Immunol* 2012;5: 76–86.
70. Mudau M., Genis A., Lochner A., Strijdom H. Endothelial dysfunction: The early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 2012;23: 222–231.
71. Jensen H.A., Mehta J.L. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2016;14: 1021–1033.
72. Gimbrone MA, Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118: 620–636.
73. Zhang C, Ye L, Zhang Q, Wu F, Wang L. The role of TRPV1 channels in atherosclerosis. *Channels (Austin)* 2020;14(1): 141–150.
74. Christie S, Wittert GA, Li H, Page AJ. Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9: 420.

**BIOMEDICINA
MOLEKULARNA BIOLOGIJA RETKIH BOLESTI**

**BIOMEDICINE
MOLECULAR BIOLOGY OF RARE DISEASES**



Geni-modifikatori β -talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi

Milena Ugrin

Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija
Kontakt: milena.ugrin@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

β -talasemijski sindromi predstavljaju veoma heterogenu grupu naslednih oboljenja hemoglobina koje odlikuje poremećena sinteza β -globinskog lanca. Kliničke manifestacije β -talasemijskih sindroma variraju od asimptomatskog do teškog oblika ovih oboljenja koje odlikuje zavisnost pacijenata od čestih transfuzija. Velika fenotipska varijabilnost karakteristična za β -talasemije koja se najčešće ne može objasniti samo različitim alelskim varijantama unutar β -globinskog gena, usmerila je istraživanja ka genima modifikatorima ovih sindroma. Naime, smatra se da bilo koji faktor koji dovodi do smanjenja disbalansa između α - i β -globinskih lanaca predstavlja potencijalno važan modifikator β -talasemijskih sindroma. Tako, sinteza fetalnog hemoglobina i u adultnom dobu, delimično ublažava kliničku sliku jer se nedostatak funkcionalnog β -globinskog lanca kompenzuje viškom fetalnih, γ -globinskih lanaca. Brojne GWAS studije ukazale su na postojanje varijanti i van β -globinskog genskog lokusa koje utiču na ekspresiju γ -globinskih ili stabilnost α -globinskih lanaca, a samim tim i na fenotip β -talasemijskih sindroma (*HBS1-MYB*, *BCL11A*, *AHSP*, *FoP*, *KLF1*).

Do skora, transplantacija kosne srži je bio jedini vid terapije β -talasemijskih sindroma, međutim usled visoke stope morbiditeta i mortaliteta ove vrste terapije, alternativne strategije kao što su genska terapija i razvoj indukovanih pluripotentnih stem ćelija se ubrzano razvijaju.

Cilj genske terapije β -talasemijskih sindroma je indukcija produkcije β - ili γ -globinskih lanaca kao i smanjenje α/β disbalansa u eritrocitima. Za transfer gena u genskoj terapiji koriste se različite vrste vektora, kako ne-virusni, tako i virusni. Napredak na polju razvoja različitih vrsta vektora, transdukcije humanih stem i progenitor ćelija, kao i različitih metoda editovanja samih gena, daje nadu da će u bliskoj budućnosti genska terapija biti terapija izbora za β -talasemijske sindrome.

Ključne reči: β -talasemijski sindromi, sekundarni geni modifikatori, genska terapija, iPSC

Gene modifiers in β -thalassemia syndromes – a new therapy approach

Milena Ugrin

Laboratory for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering

University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: milena.ugrin@imgge.bg.ac.rs

Abstract

The β -thalassemia syndromes are heterogeneous hereditary hemoglobin disorders, characterized by defect in β -globin chain synthesis. Clinical manifestations of β -thalassemia vary from severe, transfusion-dependent thalassemia major to mild, asymptomatic thalassemia trait. This phenotypic variability characteristic for β -thalassemia that usually cannot be explained only by variations affecting β -globin gene, swayed researchers toward identifying genetic modifiers for these disorders. Namely, any factor that reduces the imbalance between α - and β -globin polypeptide chains is considered to be an important modifier of this disorder. Specifically, production of fetal hemoglobin through adulthood could ameliorate the severity of β -thalassemia phenotype since γ -globin polypeptide chains compensate for the lack of the functional β -globin ones. GWAS studies have shown that regions outside of the β -globin gene cluster are also implicated in γ -globin gene expression regulation and α -globin chain stability, and hence, play an important role in β -thalassemia phenotype (*HBS1-MYB*, *BCL11A*, *AHSP*, *FoP*, *KLF1*).

Until recently, a definitive cure for β -thalassemia could only be achieved through bone marrow transplantation. However, since its significant risk of morbidity and mortality, an alternative strategies, such as gene therapy and development of induced pluripotent stem cells have been explored. The goal of β -thalassemia gene therapy is the induction of β - or γ -globin polypeptide chains, as well as the reduction of α/β -chain disbalance in erythrocytes. Various types of vectors have been considered for gene transfer, including non-viral and viral. Recent improvements in vector biology and development, human stem cell transduction, as well as the availability of new gene-editing methodology, pave the way towards introduction of gene therapy as a go-to therapy for β -thalassemia syndromes.

Keywords: β -thalassemia syndromes, secondary gene modifiers, gene therapy, iPSC

Hemoglobinopatije

Hemoglobinopatije predstavljaju heterogenu grupu naslednih anemija i posledica su mutacija u genima koji kodiraju globinske polipeptidne subjedinice molekula hemoglobina. Ova oboljenja obuhvataju kvalitativne i kvantitativne poremećaje.

Kvalitativne hemoglobinopatije, koji se najčešće nazivaju hemoglobinskim varijantama ili strukturnim hemoglobinopatijama, posledica su varijacija u aminokiselinskoj sekvenci molekula hemoglobina. Karakterišu se prisustvom normalne količine mutiranih globinskih polipeptida, koji doprinose formiranju molekula hemoglobina izmenjenih fizičkih i hemijskih svojstava.

Kvantitativni hemoglobinski poremećaji posledica su odsustva ili smanjene sinteze jednog ili više polipeptidnih lanaca i označavaju se terminom "talasemije". Talasemije se obično klasifikuju prema tipu globinskog lanca koji nedostaje i uključuje dva najčešća oblika ovog oboljenja - α -talasemiju i β -talasemiju. Pored ova dva oblika talasemijskih poremećaja, treba napomenuti da su definisane i druge vrste talasemija kao što su δ -, $\delta\beta$ - i $\gamma\delta\beta$ -talasemije.

U praksi, međutim, granica između kvalitativnih i kvantitativnih hemoglobinopatija nije tako stroga. Naime, pokazano je da postoje hemoglobinske varijante (Hb E, Hb Lepore, Hb Constant Spring) čiji se izmenjeni polipeptidi sintetišu i u smanjenoj meri, te stoga predstavljaju talasemijski poremećaj. Usled ovakvih otkrića uveden je pojam "talasemijski sindromi" koji obuhvata sve nasledne anemije koje se karakterišu defektom u sintezi jednog ili više globinskih lanaca hemoglobinskog tetramera (1).

β -talasemijski sindromi

β -talasemijski sindromi su jedni od najčešćih autozomalno recesivnih naslednih oboljenja, sa visokom učestalošću u populacijama Mediterana, Bliskog istoka, Centralne Azije, Indijskog podkontinenta i Dalekog istoka (2). Karakterišu se odsustvom (β^0 -talasemije) ili smanjenom sintezom (β^+ -talasemije) β -globinskog lanca adultnog hemoglobina (HbA; $\alpha_2\beta_2$). Rezultat ove izmenjene sinteze globinskih lanaca je smanjena produkcija funkcionalnog tetramernog hemoglobina što dovodi do hipohromije (smanjen udeo hemoglobina u eritrocitima) i mikrocitoze (smanjena veličina eritrocita). Takođe, višak slobodnih α -globinskih lanaca precipitira u prekursorima eritrocita u kosnoj srži, kao i u crvenim krvnim zrnima u cirkulaciji što rezultira kraćim životnim vekom samih eritrocita a samim tim vodi ka neefikasnoj eritropoezi i hemolitičkoj anemiji (3).

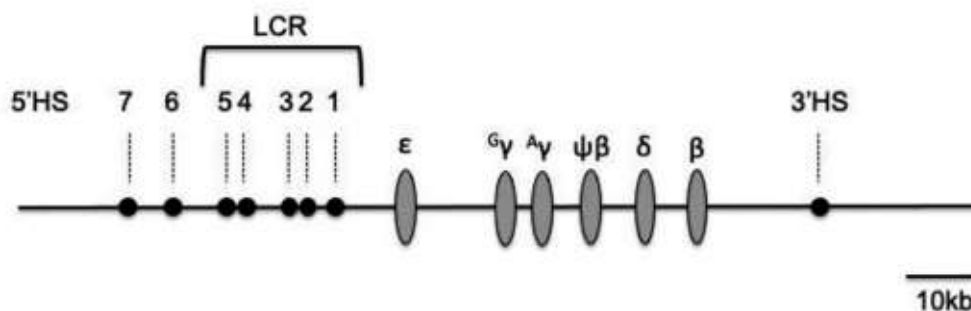
Kliničke manifestacije anemije izazvane β -talasemijama variraju od talasemije major, teškog oblika ovog oboljenja koje se karakteriše kontinuiranom potrebom za transfuzijom krvi, do blage, neprogresivne talasemije minor. Talasemija intermedija predstavlja srednje težak poremećaj kod kog ne dolazi do značajnog smanjenja sinteze odgovarajućeg globinskog lanca i karakteriše se velikom fenotipskom varijabilnošću (4).

β -globinski genski lokus

Adultni β -globinski gen (*HBB*) lociran je u okviru β -globinskog genskog lokusa smeštenog na terminalnom delu kraćeg kraka hromozoma 11 (11p15.5) i proteže se preko 70 kb. Ovaj klaster globinskih gena, pored *HBB* gena, sadrži jedan pseudogen ($\psi\beta$ pseudogen) kao i još četiri funkcionalna globinska gena: ϵ gen, koji kodira embrionalni globinski lanac, gene $\zeta\gamma$ (*HBG2*) i $\zeta\gamma$ (*HBG1*), koji kodiraju fetalne, γ -globinske lanace i δ -globinski gen (*HBD*) koji kodira istoimeni adultni globinski lanac. Redosled ovih pet funkcionalnih globinskih gena u klasteru β -globinskih gena odgovara radosledu njihove ekspresije tokom ontogenetskog razvića (5).

Uzvodno od β -globinskog lokusa, na udaljenosti 6-20 kb od ϵ -globinskog gena, nalazi se LCR (eng. *Locus Control Region*), regulatorni region koji sadrži 5 DNAza 1 hipersenzitivnih mesta (HS) (Slika 1). Zajedno sa 5' i 3' HS, LCR igra odlučujuću ulogu u ekspresiji svih β -globinskih gena održavajući hromatin u otvorenom stanju, sa jedne strane, i delujući kao veoma jak enhanser transkripcije globinskih gena, s druge strane. Uloga pojedinačnih hipersenzitivnih mesta još uvek nije u potpunosti poznata, mada su istraživanja pokazala da su HS2 i HS3 veoma važni u procesima transkripcije, te da delecija nekog od ovih hipersenzitivnih mesta dovodi do smanjene transkripcije za oko 30% (4, 6).

Tokom fetalnog razvića i prvih šest meseci života čoveka, u okviru β -globinskog genskog lokusa dolazi do veoma složenog obrasca geneske ekspresije koji se naziva hemoglobinski "switch". Naime, tokom ranog razvića dolazi do povećane ekspresije embrionalnog globinskog gena, a kasnije, tokom fetalnog razvića, aktiviraju se geni neophodni za sintezu γ -globinskih polipeptidnih lanaca (*HBG1*; *HBG2*). Ovi γ -globinski lanci, zajedno sa α -globinskim lancima, formiraju tetramer fetalnog hemoglobina (HbF; $\alpha_2\gamma_2$). Ubrzo nakon rođenja dolazi do molekulskog "switch"-a, odnosno dolazi do prestanka sinteze γ -globinskih lanaca i početka produkcije β -globinskih lanaca a fetalni hemoglobin biva zamenjen adultnim, HbA hemoglobinom (7, 8).



Slika 1. Struktura β -globinskog genskog klastera.

Geni modifikatori β -talasemijskih sindroma

β -talasemija je uzrokovana jednom od preko od 300 tačkastih mutacija ili, ređe, delecija koje pogađaju sam *HBB* gen ili okolne sekvence (9). Međutim, genotipska varijabilnost u datom lokusu često nije dovoljna da bi objasnila veliku fenotipsku varijabilnost koja se javlja kod pacijenata sa istim genotipom (10). Ovakva klinička varijabilnost karakteristična za β -talasemijske sindrome usmerila je istraživače ka proučavanju genetičkih modifikatora datih oboljenja što bi potencijano moglo dovesti do razvoja specifičnih i delotvornijih terapijskih pristupa (11). Genetički modifikatori mogu delovati na tri nivoa: primarni, sekundarni i tercijarni.

Primarni modifikatori se obično odnose na vrstu mutacije koja pogađa sam β -globinski gen. Lokacija mutacija u različitim funkcionalnim regionima gena određuje težinu kliničke slike, pa su tako mutacije i podeljenje na mutacije koje utiču na transkripciju β -globinskog gena (promotorske i 5' UTR mutacije), mutacije koje utiču na obradu β -globinske iRNK (mutacije koje menjaju mesta iskrajanja, mutacije koje kreiraju alternativna mesta iskrajanja, 3' UTR mutacije) i mutacije koje utiču na iRNK translaciju ("nonsense", "frameshift", mutacije inicijacionog kodona) (2). Mutacije koje utiču na transkripciju uglavnom rezultuju min-

imalnim deficitom β -globinskog lanca i reflektuju se u relativno blagom fenotipu. Tako mutacija C>T na poziciji -101 uzvodno od početka transkripcije β -globinskog gena dovodi do veoma blagog deficita β -globina, u tolikoj meri da je asimptomatski kod heterozigota sa normalnim nivoom HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) (4). Mutacije koje utiču na obradu β -globinske iRNK pogađaju kako donorsko i akceptorsko mesto u intronima, tako i konsenzusne sekvence koje okružuju ova mesta. Mutacije koje dovode do promene u sekvenci donorskog i akceptorskog mesta iskrajanja onemogućavaju sintezu funkcionalne iRNK tako da se β -globinski lanci uopšte ne sintetišu i dolazi do β^0 -talasemije. S druge strane, mutacije koje pogađaju konsenzus sekvence koje se nalaze oko donorskog i akceptorskog mesta iskrajanja smanjuju efikasnost normalnog iskrajanja od 70% do 95% i dovode do β^+ -talasemije (5). Drugi tip mutacija u okviru ovih konsenzus sekvenci favorizuje obradu na "pogrešnim" tj. kriptičnim mestima iskrajanja. Iskrajanje iRNK na ovim mestima dovodi do produkcije nefunkcionalne iRNK što rezultira fenotipom β^+ -talasemije. Do blaže kliničke slike β -talasemije dovode i mutacije u okviru CAP regiona, kao i mutacije koje utiču na poliadenilaciju (12). Mutacije koje narušavaju translaciju iRNK bilo u fazi inicijacije ili elongacije, povezane su sa fenotipom β^0 -talasemije. Većina ovih poremećaja rezultat su uvođenja novog terminacionog kodona usled promene okvira čitanja ili kao posledica *nonsense* mutacija i gotovo kod svih dolazi do terminacije u okviru prvog ili drugog egzona (13).

Sekundarni modifikatori uključuju varijante u genima koji utiču na balans α/β -globinskih lanaca kao što su α - i γ -globinski geni, kao i varijante u genima uključenim u ekspresiju γ -globinskih gena (*HBS1-MYB*, *BCL11A*, *KLF1*, *C1orf77*) i stabilnost α -globinskih lanaca (*AHSP*). Ovi modifikatori obuhvataju gene kako u okviru globinskih genskih lokusa, tako i van njih. Poslednjih godina brojna istraživanja su usmerena ka proučavanju sekundarnih genskih modifikatora kao faktora koji dovode do blaže kliničke slike β -talasemijskih sindroma. Naime, nastavak sinteze fetalnih, γ -globinskih polipeptida, a samim tim i fetalnog hemoglobina (HbF) kod adulta, delimično ublažava kliničku sliku β -talasemijskih sindroma jer se nedostatak funkcionalnog β -globinskog lanca kompenzuje viškom γ -globinskih lanaca. Ova činjenica je iskorišćena pri razmatranju sekundarnih modifikatora kao potencijalnih targeta genske terapije β -talasemijskih sindroma (14).

Tercijarni modifikatori predstavljaju varijante u genima koje utiču na komplikacije izazvane β -talasemijskim sindromima kao što su hiperbilirubinemija, progresivna osteoporoza i osteopenija, trombofilija, kardiopatije i bubrežna oboljenja (15-17). Hiperbilirubinemija i sklonost ka nastajanju kamena u žuči je uobičajena komplikacija kod pacijenata sa β -talasemijom i rezultat je ubrzane hemolize eritrocita pri čemu je bilirubin produkt razlaganja hemoglobina. Proučavanja su pokazala da su nivoi bilirubina i pojavljivanje kamena u žuči kod β -talasemija povezani sa polimorfnom varijantom (7 TA ponovaka) u promotorskom regionu gena za uridin-difosfat – glukoniltransferazu 1A (*UGT1A*), što se još naziva i Žilberov sindrom. Pokazano je da je (TA)⁷ varijanta povezana sa povišenim nivoom bilirubina i kod anemije srpastih ćelija i drugih hemolitičkih anemija (18-20).

Progresivna osteoporoza i osteopenija je još jedna uobičajena komplikacija koja se sreće kod mlađih pacijenata sa β -talasemijom (21). Lokusi za koje se pretpostavlja da čine genetičku osnovu formiranja koštane mase uključuju gen za receptor za estrogen, gen za receptor vitamina D (*VDR*; vitamin D receptor, eng.), gen za kolagen tipa $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (*COLA1*, *COLA2*) kao i gen za transformišući faktor rasta $\beta 1$ (*TGF β 1*) (13). Talasemija je praćena i hiperkoagulacionim stanjem (22). Genetički faktori rizika za tromboze, kao što su mutacije u genu za Faktor V, Faktor II i metilentetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*), mogu značajno da doprinesu pojavi i oštećenjima nastalim usled pojave trombotičkih insulta a samim tim i fenotipu β -talasemijskih sindroma (23).

Sekundarni geni modifikatori β -talasemijskih sindroma

Geni modifikatori u okviru globinskih genskih lokusa

α -globinski geni

Klaster α -globinskih gena sadrži tri funkcionalna gena: gen ζ , koji kodira ζ -globinske lance i koji se ekspresira u embrionalnom stadijumu razvitka čoveka, i gene α_2 i α_1 (*HBA1* i *HBA2*) koji kodiraju α -globinski polipeptid od početnih faza gestacije i kasnije kroz čitav život. U lokusu α -globinskih gena locirana su i tri pseudogena (pseudo ζ , pseudo α_2 i pseudo α_1 geni), kao i θ -gen, identifikovan na samom 3' kraju lokusa, nepoznate funkcije (24). Iako se sa α -globinskih gena prepisuju identični adultni α -globinski lanci, *HBA2* gen je i do 3 puta aktivniji od *HBA1* gena, te se sa njega sintetiše i više polipeptidnih lanaca (25). Kao i β -talasemije, α -talasemije se odlikuju odsustvom (α^0 -talasemija) ili smanjenom sintezom (α^+ -talasemija) α -globinskih lanaca što dovodi do disbalansa između globinskih peptidnih lanaca. Većina α -talasemija izazvana je velikim delecijama koje obuhvataju jedan ili oba α -globinska gena na istom hromozomu (26).

U mnogim populacijama u kojima je β -talasemija veoma zastupljena, α -talasemija se takođe javlja sa visokom učestalošću što kao rezultat ima konasleđivanje oba ova oboljenja. U takvim slučajevima, homozigoti ili složeni heterozigoti za β -talasemijske varijante će imati blažu kliničku sliku jer će imati i manje nesparenih α -globinskih lanaca. Naime, fenotip β -talasemijskih sindroma zavisi kako od tipa mutacije koja pogađa sam *HBB* gen, tako i od broja funkcionalnih α -globinskih gena. Tako pacijenti kod kojih je detektovana varijanta u *HBB* genu u homozigotnom obliku, a pri tome imaju samo jedan funkcionalni α -globinski gen, prikazuju fenotip β -talasemije intermedije. Suprotno tome, ukoliko pacijent sa heterozigotnom mutacijom u *HBB* genu sintetiše višak α -globinskih lanaca usled duplikacije jednog od *HBA* gena, dolazi do pojave β -talasemije intermedije umesto do očekivane talasemije minor (27).

γ -globinski geni

Kao što je rečeno ranije, nakon ekspresije embrionalnih globinskih gena, γ -globinski geni koji kodiraju polipeptidne lance fetalnog hemoglobina (HbF) se sintetišu tokom perioda gestacije. Ubrzo nakon rođenja, γ -globinski lanci se zamenjuju β -globinskim lancima adultnog hemoglobina (HbA). Ovaj kompleksan proces genske ekspresije globinskih gena je klinički veoma važan obzirom da nastavak ekspresije γ -globinskih gena ili njihova reaktivacija može ublažiti fenotip β -talasemijskih sindroma (7, 8).

Nasledno prisustvo fetalnog hemoglobina (eng. *Hereditary persistence of fetal hemoglobin* - HPFH) je poremećaj koji se manifestuje nastavkom sinteze fetalnih, γ -globinskih polipeptida, a samim tim i fetalnog hemoglobina (1.6-30%) i kod adulta. Opisana su dva glavna tipa HPFH sindroma - pancelularni tip HPFH, koji se karakteriše veoma visokim nivoom sinteze HbF i njegovom uniformnom distribucijom u svim ćelijama crvene loze; i heterocelularni tip HPFH, koji je rezultat genetski determinisanog povećanja broja eritrocita koji sintetišu fetalni hemoglobin (F ćelije) (28, 29). Pancelularni tip HPFH se dalje može podeliti u dve klase i to prvu, koja nastaje kao posledica delecija i drugu, u čijoj osnovi leže tačkaste mutacije.

Delecione forme pancelularnog tipa HPFH posledica su velikih delecija unutar β -globinskog lokusa koje obuhvataju δ - i β -globinske gene i deo intergenskog regiona između γ - i δ -globinskih gena. Objašnjenje koje se može ponuditi za povećanu ekspresiju i pancelularnu distribuciju HbF kod ovih sindroma je činjenica da ovakvi genski rearanžmani dovode udaljene enhansere u blizinu γ -globinskih gena, te da dolazi do interakcije pozitivnih regulatora ovih gena sa dodatnim enhanserom (30, 31).

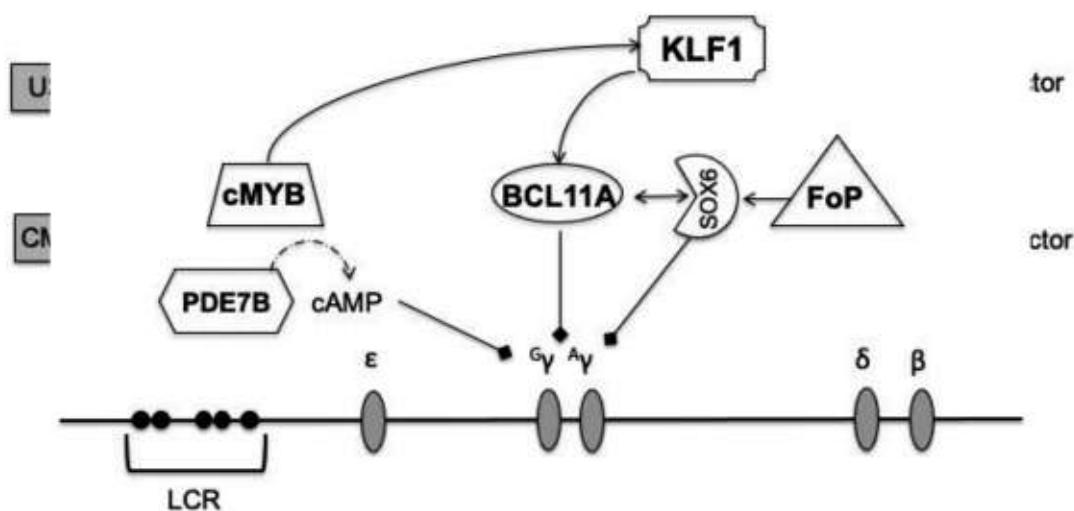
Nedelecione forme HPFH su najčešće rezultat zamene jedne baze u promotorima γ -globinskih gena (28). Ovakve tačkaste mutacije javljaju se u okviru mesta vezivanja transkripcionih faktora i uglavnom su grupisane u tri regiona - oko pozicija -114 do -117, na poziciji -175, i na pozicijama od -195 do -202 nukleotida (32). Region na poziciji -117 je distalni CCAAT blok, koji vezuje opšte CP1 i CDP transkripcione faktore i eritroidno-specifične GATA-1 i NF-E3. Mutacije u ovom regionu dovode do slabije interakcije CCAAT bloka i eritroidno-specifičnih transkripcionih faktora (33). Region u kome se nalazi mutacija g.-175T>C sadrži vezivna mesta za GATA-1 transkripcioni factor, dok mutacije koje pogađaju region od -195 do -202 nukleotida utiču na afinitet vezivanja Sp1 transkripcionog faktora (34).

Heterocelularni tip HPFH često je posledica mutacija van β -globinskog genskog lokusa. Pacijenti koji se karakterišu ovim sindromom sadrže veliki broj F ćelija u adultnom periodu života, dok je nivo HbF je obično znatno niži nego kod pancelularnog tipa HPFH (30). U nekim slučajevima, povišen nivo fetalnog hemoglobina javlja se kod zdravih pojedinaca, dok se kod drugih, povišena sinteza HbF detektuje tek u uslovima eritroidnog stresa karakterističnim za β -talasemijske sindrome (30, 31).

Jedna od najčešćih genetičkih varijanti koja svoj efekat ispoljava u uslovima eritroidnog stresa je i *XmnI*- γ^G (g.-158 C>T) varijanta. Naime, klinička ispitivanja su pokazala da, u uslovima hematopoetskog stresa, kao što je slučaj kod homozigotne β -talasemije i anemije srpastih ćelija, prisustvo *XmnI* polimorfizma dovodi do povećanja ekspresije HbF (35). Međutim, povišen nivo HbF usled prisustva ove varijante je umeren i u nekim slučajevima ne može objasniti veliku fenotipsku varijabilnost β -talasemijskih sindroma (36). Takođe treba pomenuti i HBG1:g.-225_-222delAGCA varijantu, deleciju u promotorskom regionu γ -globinskog gena za koju je pokazano da utiče na ekspresiju ovog fetalnog globinskog gena samo u uslovima eritroidnog stresa (37).

Geni modifikatori van globinskih genskih lokusa

Brojni transkripcioni faktori su uključeni u regulaciju ekspresije γ -globinskih gena (Slika 2).



Slika 2. Transkripcioni faktori uključeni u regulaciju ekspresije γ -globinskih gena. Linijom sa strelicom na kraju označena je pozitivna regulacija (aktivacija). Linije sa kvadratićem na kraju označavaju negativnu regulaciju (represiju). Isprekidana linija označava nejasnu interakciju. Linija sa strelicama na oba kraja označava uzajamnu regulaciju.

HBS1L-MYB intragenski region

Varijante u *HBS1L-MYB* intergenskom regionu doprinose sa više od 20% varijacijama u nivou HbF, detektovanim u zdravim populacijama u Evropi. Većina ovih varijanti javljaju se u okviru segmenta dugog 79 kb i raspoređene su u tri bloka koja su obeležena kao HMIP 1, 2 i 3 (eng. *HBS1L-MYB intergenic polymorphism* – HMIP). Genetičke varijante koje pokazuju najveći efekat na nivo HbF locirane su u okviru 24 kb dugog regiona HMIP 2 bloka. Polimorfizmi za koje je pokazana asocijacija sa nivoom HbF uključuju, između ostalih, polimorfizme rs9399137, rs28384513 i rs4895441 (38, 39).

Mehanizam koji omogućava ovim genetičkim varijantama da utiču na nivo HbF još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali rezultati brojnih studija ukazuju da se ovaj biološki efekat ostvaruje preko regulacije okolnih gena, tj. *HBS1L* i *MYB* gena. Naime, pokazano je da ovaj inergenski region ima ulogu regulatornog elementa na šta ukazuje postojanje mesta vezivanja transkripcionih faktora kao što je GATA-1 (39). Smatra se da ovaj regulatorni region kontroliše ekspresiju *MYB* gena koji kodira eritroidni transkripcioni faktor, što dalje utiče na eritroidnu diferencijaciju i, indirektno, na nivo HbF. Naime, *MYB* transkripcioni faktor igra važnu ulogu u procesima ćelijske proliferacije i diferencijacije i predstavlja negativni regulator ekspresije HbF preko kojeg brojni drugi faktori, kao što su mikro RNK (miR-15a i miR-16-1) mogu uticati na nivo fetalnog hemoglobina (40, 41).

Lokus u kome se nalazi *HBS1L-MYB* intragenski region (6q22–23) sadrži i druge potencijalne gene kandidate koji učestvuju u regulaciji sinteze HbF. Oni uključuju *PDE7B* gen (eng. *Phosphodiesterase 7*), *MAP3K5* gen (eng. *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5*) kao i *PEX7* gen (eng. *Peroxisomal biogenesis factor 7*) (42). Istraživanja su pokazala da se kratki tandemske ponovci u u promotoru *MAP3K5* gena, kao i intronske varijante kako u *MAP3K5*, tako i u *PDE7B* genu mogu dovesti u vezu sa smanjenim HbF nivoom a time i sa težom kliničkom slikom β -talasemijskih sindroma (43). Iako uloga *MAP3K5* proteina kao prenosnika signala kroz citoplazmu, u eritropoezi nije u potpunosti jasna, *PDE7B* gen bi mogao biti uključen u regulaciju fetalnog hemoglobina vezujući se za cAMP kao inhibitor γ -globinske genske ekspresije (44).

BCL11A gen

BCL11A (B-cell CLL/lymphoma 11A) je transkripcioni represor aktivan u B-limfocitima koji se eksprimira i u eritroidnim ćelijama. Ovaj protein sa DNK vezujućim domenom u vidu "cinkanog prstića" (eng. *zinc-finger*) kodiran je od strane istoimenog gena koji se prostire sa preko 102 kb na hromozomu 2p16 (45).

U GWAS studijama ustanovljeno je postojanje veze između genetičkih varijanti u okviru *BCL11A* gena i nivoa HbF u različitim populacijama (46). Tačnije, oko 15% ukupne varijabilnosti u nivou HbF moglo se pripisati polimorfizmima nađenim u drugom intronu *BCL11A* gena, kao što su rs11886868 i rs4671393 (36, 38). Daljim istraživanjima ustanovljeno je da je *BCL11A* represor γ -globinskih gena koji se ne vezuje direktno za promotorski region ovih gena, već za LCR, kao i za intergenski region između γ - i δ -globinskog gena, za koji je već pokazana asocijacija sa γ -globinskom genskom represijom (47, 48). Svoju represorsku ulogu *BCL11A* verovatno ostvaruje u interakciji sa brojnim transkripcionim faktorima kao što su jedarni deacetilazni kompleks (NuRD), eritroidni transkripcioni faktori, GATA-1 i FOG-1, kao i SOX6 za koga je pokazano da deluje kao represor embrionalnih globinskih gena kod miša (49).

Tvrđnja da *BCL11A* deluje kao represor γ -globinskih gena leži i u činjenici da je nivo ekspresije *BCL11A* gena u adultnom stupnju viši u odnosu na nivo ekspresije ovog gena u fetalnom stupnju razvika (49, 50). Kao direktni represor fetalnih globinskih gena, *BCL11A* je prvi genetički i biohemijski potvrđen faktor koji učestvuje u molekulskom "switch"-u globinskih gena. Kao takav, ovaj transkripcioni faktor predstavlja po-

tencijalni terapijski target protein za indukciju HbF (36). Međutim, obzirom da *BCL11A* funkcionira kao transkripcijski faktor i u neeritroidnim ćelijama, novije studije su prepoznale eritroidne *BCL11A* enhansere koji se nalaze u drugom intronu *BCL11A* gena, kao potencijalne targete u genskoj terapiji β -talasemijskih sindroma. Na ovaj način bi promene u sekvenci drugog introna *BCL11A* gena imale uticaj na ekspresiju ovog gena isključivo u eritroidnim ćelijama (51).

GWAS studije pokazale su da varijante u okviru *HBB*, *HSB1L-MYB* i *BCL11A* gena mogu objasniti oko 50% varijacija u nivou HbF, ukazujući na postojanje dodatnih faktora koji utiču na produkciju fetalnih globinskih gena, odnosno sintezu fetalnog hemoglobina (38, 46, 52, 53). Neki od ovih faktora mogu biti regulatori ekspresije β -globinskih gena (*KLF1*), proteini odgovorni za stabilnost α -globinskih gena (*AHSP*) ili faktori uključeni u epigenetičku regulaciju ekspresije fetalnih globinskih gena (*FoP*).

KLF1 gen

Eritroidni Kruppel-Like Faktor, *KLF1* (*EKLF*), ključni je eritroidno-specifični transkripcijski faktor koji se vezuje za CACCC motiv, važan regulatorni element mnogih eritroidnih gena, uključujući *BCL11A* i β -globinski gen (54). Vezivanje *KLF1* transkripcijskog faktora za ove motive ostvaruje se preko tri DNK vezujuća domena koji su neophodni za aktivaciju *KLF1* target gena. *KLF1* također sadrži i prolinom bogat transaktivacioni domen preko koga ovaj transkripcijski faktor vrši specifičnu aktivaciju *HBB*, direktno se vezujući za promotor ovog globinskog gena (55, 56). Ovaj transaktivacioni domen sastoji se od inhibitornog (AK 195-291) i aktivacionog (AK 20-124) domena. Ovaj minimalni aktivacioni region interaguje sa brojnim ćelijskim proteinima uspostavljajući, na taj način, optimalan aktivacioni potencijal. S druge strane, inhibitorni region funkcionira tako što onemogućava efikasno vezivanje DNK vezujućeg domena za specifičnu DNK sekvencu (57).

Mutacije koje utiču na pomenute funkcije *KLF1* transkripcijskog faktora bi potencijalno mogle da utiču i na ekspresiju globinskih gena.

Učestalost *KLF1* varijanti kreće se od 0.0004% to 37% u različitim populacijama (58-60). Ove varijante uključuju kako retke, tako i učestale promene u okviru *KLF1* gena i u zavisnosti od njihove lokalizacije, fenotipa koji izazivaju i uticaja koji imaju na transkripciju, mogu se podeliti u jednu od četiri klase varijanti (61).

Klasu 1 čine varijante koje predstavljaju neutrane polimorfizme kao što je varijanta p.Ser102Pro. Varijante koje pripadaju varijantama klase 2 uključuju „missense“ mutacije u DNK-vezujućem domenu i rezultiraju *KLF1* transkripcijskim faktorom izmenjenog afiniteta vezivanja target sekvenci. Ove varijante doprinose mnogo blažem fenotipu od varijanti klase 3 koje uključuju „frameshift“ i mutacije koje uvode terminacioni kodon. Klasa 4 obuhvata grupu varijanti koje menjaju visoko konzervirana mesta u okviru DNK vezujućeg domena i dovode do veoma patološki ozbiljne kongenitalne diseritropoetske anemije (eng. *Congenital dyserythropoietic anaemia* - CDA). Varijante koje pripadaju klasi 2, 3 i 4 su fatalne u homozigotnom stanju te se sreću isključivo u heterozigotnom obliku (62).

Direktna asocijacija mutacija u okviru *KLF1* gena sa regulacijom sinteze hemoglobina ustanovljena je od strane Borg *et al.* (54) koji su pokazali da tačkasta mutacija u *KLF1* genu (p.K288X) u potpunosti ukida funkciju DNK vezujućeg domena, na taj način onemogućavajući ulogu *KLF1* kao transkripcijskog faktora. Kao posledica, dolazi do smanjene ekspresije *BCL11A* gena, odnosno do smanjene sinteze *BCL11A*, represora fetalnih globinskih gena, što u krajnjem vodi ka povišenom nivou HbF (54, 63). Rezultati studije o prvoj *KLF1* promotorskoj mutaciji također idu u prilog činjenici da je *KLF1* važan regulator nivoa HbF. Naime, pokazano je

da ova *KLF1:g.-148G>A* varijanta dovodi do smanjene transkripcije *KLF1* gena, čime se donekle može objasniti detektovan HPFH fenotip (64, 65).

Studije o *KLF1* mutacijama, otvorile su vrata novim istraživanjima na polju humane eritropoeze. Novootkrivene i funkcionalno okarakterisane genetičke varijante u ovom i drugim genima modifikatorima β -talasemijskih sindroma (*BCL11A*, *HBS1L-MYB*), mogu poslužiti kao meta za gensku terapiju talasemija u budućnosti (54, 66-68).

AHSP

α Hb stabilizujući protein (eng. *α Hb-stabilizing protein* – AHSP) je eritroidno specifičan protein sa važnom ulogom u procesima eritropoeze. Naime, ovaj protein uključen je u savijanje, stabilizaciju i transfer α -globinskih lanaca prilikom formiranja tetramera hemoglobina. AHSP specifično vezuje brojne forme α -globina, uključujući "apo" formu (ne sadrži hem) i α -hemoglobin (α -globin sa hemom). Njegova uloga kao specifičnog molekularnog šaperona koji vezuje α -globinske lance hemoglobina sprečavajući, na taj način, precipitaciju istih, ukazuje da bi izmenjena ekspresija *AHSP* gena ili funkcija samog proteina mogla imati uticaj i na fenotip β -talasemijskih sindroma (69-71). Međutim, rezultati brojnih studija o ulozi *AHSP* kao gena modifikatora β -talasemijskih sindroma su kontradiktorna. Naime, dok su pojedina istraživanja pokazala da je smanjena ekspresija datog gena povezana sa težom kliničkom slikom β -talasemija (72, 73), drugi tvrde da *AHSP* ne predstavlja gen modifikator ovih oboljenja (74, 75). Međutim, postoji mogućnost da retke mutacije koje dovode do gubitka funkcije *AHSP* gena ili različiti epigenetički faktori mogu imati uticaj na fenotip već postojeće β -talasemije (70, 74).

FoP protein

FoP (eng. *Friend of Prmt1*) je mali arginin/glicin bogat protein kodiran od strane *C1orf77* gena. Ovaj protein, kroz interakciju sa proteinom PRMT1, uključen je u regulaciju transkripcije globinskih gena preko histonske metilacije (76). Istraživanja su pokazala da je FoP ključan modulator nivoa HbF jer potpuno ukidanje njegove ekspresije dovodi do povećanog nivoa ekspresije γ -globinskih gena. Iako nije u potpunosti jasno kako FoP reguliše ekspresiju fetalnih globinskih gena, pretpostavlja se da se njihova indukcija vrši kroz modulaciju SOX6, kofaktora *BCL11A* transkripcionog faktora. Rezultati ovakvih istraživanja ukazuju na FoP kao novi potencijalni terapijski target kako β -talasemijskih sindroma, tako i drugih hemoglobinopatija (77).

Genska terapija

Uprkos velikim naporima na polju razvoja terapijskih tretmana β -talasemijskih sindroma, uključujući transfuziju i terapiju određenim lekovima, izlječenje ovih oboljenja do skora je bilo moguće samo prilikom alogene transplantacije hematopoetskih matičnih ćelija (78). Međutim, ova vrsta terapije dostupna je samo malom broju pacijenata sa β -talasemijom i karakteriše se visokom stopom mortaliteta i morbiditeta (79). Kao odgovor nauke na ova ograničenja i potrebom za trajnim rešenjem, proizašla je ideja o transferu terapijskih gena koristeći autologne hematopoetske stem ćelije kao potencijalna terapija β -talasemijskih sindroma.

Hematopetske matične ćelije, kao targeti genskog transfera, izdvajaju se iz koštane srži ili periferne krvi samog pacijenta, podležu *in vitro* genetičkim modifikacijama i, nakon kondicione hemoterapije pacijenta, vraćaju se u "domaćina" (80).

Cilj genske terapije β -talasemijskih sindroma je indukcija produkcije β - ili γ -globinskih lanaca, smanjenje količine slobodnih α -globinskih lanaca, kao i smanjenje α/β disbalansa u eritrocitima (81). Napredak na polju

razvoja različitih vrsta vektora, transdukcije humanih stem i progenitor ćelija, kao i različitih metoda editovanja samih gena, daju nadu da će u skoroj budućnosti genska terapija biti moguća terapija izbora za β -talasemijske syndrome (81).

Za transfer gena u genskoj terapiji koriste se različite vrste vektora, kako virusni, tako i ne-virusni (82).

Ne-virusni vektori

Naznaka da je genska terapija potencijalna terapija i talasemijskih sindroma, proizašla je iz istraživanja o supresor tRNK (83). U datoj studiji, *tRNALys* gen konvertovan je u amber-supresorski gen mesto-specifičnom mutagenезom antikodona. Kao rezultat dobijena je tRNK koja je suprimirala UAG amber mutaciju u RNK β^0 -talasemija usled čega dolazi do produkcije funkcionalnog β -globinskog polipeptida. Uprkos obećavajućim rezultatima ove vrste terapije, ona bi bila ograničena isključivo na β^0 -talasemijske sindrome, a ova supresor tRNK bi uticala na proces terminacije sinteze *wt* proteina što tRNK ne čini dobrim kandidat genima za upotrebu u genskoj terapiji.

Kao mogući pristup genske terapije lečenju hemoglobinskih oboljenja, iskorišćena su i katalitička svojstva ribozoma da vrše izmenu defektne iRNK koja se prepisuje sa mutiranog β -globinskog gena (84). Naime, iskorišćena je mogućnost *trans*-iskrajanja određene grupe ribozoma kako bi se mutirani β -globinski transkript preveo u RNK koja kodira γ -globinske polipeptidne lance. Na ovaj način mutirani adultni globinski gen zamenjuje se genom koji kodira fetalne globinske lance. Ovaj pristup genskoj terapiji, iako perspektivan, ukazao je na postojanje mnogih nedostataka kao što su dugotrajan efekat terapije koja je usmerena na proizvod transkripcije a ne mutirani gen (85).

Za razliku od ne-virusnih vektora, virusni vektori su pokazali veću efikasnost prilikom transfera gena obzirom da ne zahtevaju uslove transfera koji nepovoljno utiču na osetljive hematopoetske matične ćelije, kao što je elektroporacija (86).

Virusni vektori

Retrovirusni vektori

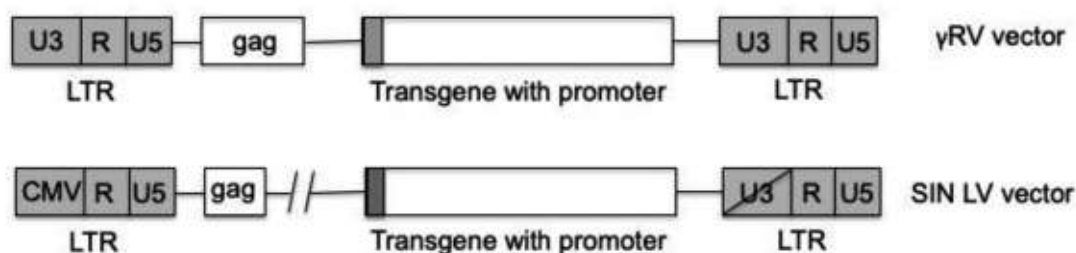
Među prvim virusnim vektorima koji su korišćeni za transfer humanog β -globinskog gena u mišije hematopetske matične ćelije, bili su γ retrovirusi (γ RV). Ovi viralni vektori konstruisani su tako što su genetički elementi neophodni za patogenost i replikaciju zamenjeni željenim transgenom (87).

γ RV vektori sadrže intaktne duge terminalne ponovke (eng. *long terminal repeats* – LTR) koji sadrže U5, R i region U3 velike promotorske aktivnosti koji služi za reverznu transkripciju i inkorporaciju virusnog genetskog materijala u ćeliju domaćina (Slika 3) (86). Prvi pokušaji transfera β -globinskog gena u mišije hematopetske matične ćelije pomoću ovih vektora, rezultirale su niskim nivoom ekspresije datog β -globinskog gena. Uvođenjem LCR regiona u γ RV vektore, prevaziđen je problem smanjene ekspresije transgena ali ne i varijabilnost u nivou ekspresije koja zavisi od mesta insercije transgena (85). Ograničenja γ RV vektora odnose se i na činjenicu da retrovirusni vektori ne mogu inficirati ćelije koje se ne dele, često uzrokuju hematopoetske maligne bolesti zbog neprecizne ugradnje blizu ćelijskih protoonkogeni i ne mogu nositi veliku količinu genetskog materijala (79).

Iako su mnogobrojne modifikacije napravljene u γ -retrovirusnim vektorima, što je rezultiralo poboljšanom genskom ekspresijom, pravi napredak u genskoj terapiji se dogodio upotrebom lentivirusnih vektora.

Lentivirusni vektori

Lentivirusni vektori (LV) pokazuju nekoliko prednosti u odnosu na već pomenute retroviruse. Naime, pokazano je da imaju sposobnost da uđu i integrišu se u ćeliju koja se ne deli, što je za hematopoetske matične ćelije mnogo pogodnije obzirom na to da se ove ćelije češće nalaze u fazi mirovanja. Takođe, LV pokazuju visoku efikasnost transdukcije i mogu nositi veće i kompleksnije transgene kasete koje sadrže introne i regulacione elemente, što je potrebno za visok nivo ekspresije globinskih gena. Lentivirusni vektori imaju sigurniji integracijski profil od retrovirusa jer se najčešće ugrađuju unutar introna gena, na taj način izbegavajući regulatorne elemente blizu mesta početka transkripcije, što rezultira nižom genotoksičnošću i smanjenjem učestalosti insercijske onkogeneze (86, 88). Postizanje većeg nivoa bezbednosti kada je u pitanju integracija transgena pokušana je i dizajniranjem samoinaktivirajućih vektora (eng. *self-inactivating* – SIN). SIN-lentivirusni vektori imaju deleciju u virusnom promotoru/pojačivaču u U3 regionu LTR-a na 3'-kraju. Ta delecija se prilikom transkripcije kopira u 5'-LTR i smanjuje transaktivaciju susednih promotora, što čini vektor sigurnijim za korišćenje u terapijske svrhe (Slika 3) (89).



Slika 3. Genomska organizacija γRV i SIN LV vektora.

Sa pronalaskom LV vektora neophodnih za transfer gena od interesa, istraživanja su okrenuta ka samoj kaseti globinskih gena. Naime, pristupi genskoj terapiji se trenutno mogu svrstati u dve kategorije – insercija celog gena i gensko editovanje.

Genska insercija

Ova vrsta genske terapije podrazumeva inserciju vektora koji sadrži β- i γ-globinske gene, kao i celokupnu regulatornu mašineriju, u autologe hematopoetske stem i progenitor ćelije (eng. *Human Stem and Progenitor Cells*-HSPC) *ex-vivo*, a zatim injektiranje ovako modifikovanih HSPC nazad u pacijenta koji je prethodno podvrgnut procesu mijeloablacije (89-91). Uprkos, naizgled, jednostavnoj proceduri, tehnološki napredak ovog pristupa zabeležen je tek u novije vreme. Naime, vektori koji nose *HBB* gen i njegove regulatorne elemente, uključujući delove LCR-a, od skora mogu biti proizvedeni u većoj količini, sa visokim nivoom čistoće i mogućnošću da transfekuju dovoljno veliki broj matičnih ćelija koje bi dovele do značajnog kliničkog odgovora (92, 93). Novije globinske kasete obično sadrže β-globinski gen sa deletiranim destabilišućim *RsaI* fragmentom lociranim u intronu 2, kao i sekvencama koje okružuju HS LCR-a. Međutim, broj i dužina HS regiona u globinskim kasetama varira obzirom da je teško precizno utvrditi regulatorne regione unutar svakog hipersenzitivnog mesta pojedinačno a pri tom ukinuti potencijalno destabilišuće regione (79).

Editovanje gena koje predstavlja ciljanu izmenu specifičnih target sekvenci u okviru datog gena, predstavlja alternativni pristup modifikacije HSPC u cilju genske terapije. Veliki napredak postignut je nakon uvođenja CRISPR/Cas9 (eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein*) sistema kao metode za precizno editovanje željenih genskih lokusa (94). Kao kandidat gen sa najvećim terapijskim potencijalom u GWAS studijama, proizašao je *BCL11A* gen. Dva novija klinička ispitivanja koja za cilj imaju povećanje nivoa fetalnog hemoglobina, oslanjaju se na ciljani prekid funkcije enhansera lociranog u drugom intronu *BCL11A* gena. Kao posledica uvedenih delecija, dolazi do smanjene *BCL11A* ekspresije u eritroidnim ćelijama a time i povećane ekspresije fetalnih globinskih gena (80). Iako osmišljeno da se putem specifično sintetisanih nukleaza postignu precizne genetičke modifikacije i izbegnu nespecifične integracije, glavni nedostatak modifikacije gena u terapijske svrhe β -talasemijskih sindroma i dalje predstavlja „off-target“ aktivnost samih nukleaza, odnosno mogućnost pojave neželjenih promena u nekom drugom delu genoma (81).

Aktuelni uspeh genske terapije

Prva uspešna genska terapija β -talasemijskih sindroma sprovedena je 2007. godine. Tom prilikom pacijent sa HbE/ β^0 -talasemijom tretiran je eksprimirajućim vektorom koji je sadržao β -globinski gen (β A(T87Q)), 260 bp globinski promotor, HS2, HS3, HS4 i dve kopije izolator sekvenci koji okružuju datu globinsku kasetu. Hb β 87 se ponaša kao fetalni Hb i interferira s polimerizacijom srpastog Hb-a, a funkcioniše normalno kao i HbA i u ekspresiji i u kapacitetu prenošenja kiseonika. Iako je ova terapija bila uspešna u smislu da pacijent nije više zahtevao redovne transfuzije krvi, analizom insercijskih mesta vektora pokazano je da većina terapijskog doprinosa potiče od dominantnog klona u kojem je integrisani vektor izazvao transkripcionu aktivaciju *HMGA2* gena, potencijalnog onkogenog. Mada je pokazano da povećana ekspresija *HMGA2* gena dovodi do pojave uglavnom benignih tumora, ovaj događaj je ukazao na nedostatke lentivirusnog transfera gena koji uključuju efikasnost i preciznost genske insercije (95).

Poslednjih godina, indukovane pluripotentne stem ćelije (eng. *induced pluripotent stem cells*-iPSCs) pokazale su se kao dobri kandidati za transfer gena. iPSC se uz pomoć različitih transkripcionih faktora, generišu iz somatskih ćelija poreklom iz fibroblasta kože, amnionske tečnosti ili horionskih čupica β -talasemijskih pacijenata. Naime, pokazano je da je ugradnja i ekspresija četiri različita gena (*Klf4*, *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*) dovoljna kako bi fibroblasti poreklom iz repa miša dobile karakteristike iPSC ćelija. Fibroblasti miša, homozigota za humani alel za srpastu anemiju (β S/ β S), konvertirane su u iPSC ugradnjom četiri pomenuta gena, a zatim je u njih elektroporacijom ubačena kratka sekvenca DNK β -globinskog gena koja sadrži sekvence potrebne za korekciju mutacije putem homologe rekombinacije. iPSC u kojima je došlo do ispravljanja mutacije izolovane su i gajene u većoj količini i tretirane faktorima rasta i mijeloidnim citokinima kako bi postale HSPC. Takve HSPC su transplantirane nazad u miša kod kog su dovele do izlečenja srpaste anemije (96).

iPSC ćelije su lako dostupne i predstavljaju neograničen izvor matičnih ćelija za gensku manipulaciju. Prednost ovih ćelija kada je reč o genskoj terapiji je mogućnost skrininga i odabira klona koji poseduje sigurnu integraciju transgena, kao i visok nivo njegove ekspresije. Međutim, postoje određene prepreke koje onemogućavaju iPSC ćelijama da budu korišćene u terapijske svrhe. Naime, potrebno je pronaći način kako bi se zaobišla upotreba štetnih onkogenog (kao što je *c-Myc*) kao transkripcionih faktora potrebnih za transformaciju ćelija u iPSC, izbeći upotrebu retrovirusnih vektora kao mehanizma dostave gena koji nose rizik od insercijske mutageneze i razviti pouzdane protokole za diferencijaciju ljudskih iPSC (79, 86, 87).

Zaključak

β -talasemijski sindromi su najviše istražena oboljenja na molekulskom nivou. Samim tim, terapijski protokoli β -talasemijskih sindroma predstavljaju primer potencijalno novih vrsta terapija kod različitih vrsta oboljenja.

Razvoj na polju sekvenciranja genoma, razumevanje genske regulacije *HBB* gena, pristupačnost nukleaza koje se koriste za editovanje gena, kao i tehnološki napredak kada je dizajniranje vektora u pitanju, dovelo je novih kliničkih studija na polju genske terapije β -talasemijskih sindroma. Za razliku od alogenske transplantacije HSC-a koja je do skora bila jedini način izlečenja β -talasemija, genska terapija ne zahteva postojanje odgovarajućeg donora, stoga bi se njenim razvitkom omogućilo dugoročno izlečenje većeg broja obolelih za koje, za sada, postoje samo tretmani koji ublažavaju simptome bolesti, ali ne predstavljaju dugoročno rešenje. Mada dugoročna efikasnost i bezbednosni profil ovog terapijskog pristupa još uvek nisu u potpunosti poznati, prvi rezultati datih kliničkih studija daju nadu da bi genska terapija β -talasemijskih sindroma mogla postati terapija budućnosti ovih oboljenja.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-68/2022-14/200042.

LITERATURA

1. Pavlovic S. Molecular genetics and modern diagnostics of thalassemia syndromes. Serbia: IMGGE, Belgrade, Serbia; 2006. 140 p.
2. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010;12(2):61-76.
3. Tangvarasittichai S. Thalassemia Syndrome. 2011. In: *Advances in the Study of Genetic Disorders* [Internet]. Rijeka: InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-the-study-of-genetic-disorders/thalassemia-syndrome>.
4. Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol*. 2004;124(3):264-74.
5. Thein SL. Beta-thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*. 1998;11(1):91-126.
6. Patrinos GP, de Krom M, de Boer E, Langeveld A, Imam AM, Strouboulis J, et al. Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. *Genes Dev*. 2004;18(12):1495-509.
7. Forget BG. Progress in understanding the hemoglobin switch. *N Engl J Med*. 2011;365(9):852-4.
8. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a011643.
9. Mettananda S. Genetic and Epigenetic Therapies for β -Thalassaemia by Altering the Expression of α -Globin Gene. *Front Genome Ed*. 2021;3:752278.
10. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2005;353(11):1135-46.
11. Lettre G. The search for genetic modifiers of disease severity in the β -hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10).
12. Kazazian HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*. 1990;27(3):209-28.
13. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005;90(5):649-60.
14. Sonja P, Milena U, Maja S. Novel therapy approaches in beta thalassemia syndromes: a role of genetic modifiers. In: Anjana M, editor. *Inherited hemoglobin disorders*. Croatia: InTech; 2015. p. 137-60.
15. Demosthenous C, Vlachaki E, Apostolou C, Eleftheriou P, Kotsiafti A, Vetsiou E, et al. Beta-thalassemia: renal complications and mechanisms: a narrative review. *Hematology*. 2019;24(1):426-38.
16. Kumfu S, Fucharoen S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardiac complications in beta-thalassemia: From mice to men. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(11):1126-35.
17. Ali S, Mumtaz S, Shakir HA, Khan M, Tahir HM, Mughal TA, et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Mol Genet Genomic Med*. 2021;9(12):e1788.
18. Galanello R, Piras S, Barella S, Leoni GB, Cipollina MD, Perseu L, et al. Cholelithiasis and Gilbert's syndrome in homozygous beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 2001;115(4):926-8.
19. Thein SL. Genetic modifiers of the beta-haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 2008;141(3):357-66.
20. Ivanov A, Semenova E. Gilbert's Syndrome, Bilirubin Level and and UGT1A1*28 Genotype in Men of North-West Region of Russia. *J Clin Exp Hepatol*. 2021;11(6):691-9.
21. Yassin MA, Abdel Rahman MO, Hamad AA, Poil AR, Abdelrazek MT, Hussein RM, et al. Denosumab versus zoledronic acid for patients with beta-thalassemia major-induced osteoporosis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(51):e23637.
22. Fayed MA, Abdel-Hady HE, Hafez MM, Salama OS, Al-Tonbary YA. Study of platelet activation, hypercoagulable state, and the association with pulmonary hypertension in children with β -thalassemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2018;11(2):65-74.
23. Brankovic-Sreckovic V, Milic Rasic V, Djordjevic V, Kuzmanovic M, Pavlovic S. Arterial ischemic stroke in a child with beta-thalassemia trait and methylentetrahydrofolate reductase mutation. *J Child Neurol*. 2007;22(2):208-10.
24. Tang Y, Wang Z, Huang Y, Liu DP, Liu G, Shen W, et al. Gene order in human alpha-globin locus is required for their temporal specific expressions. *Genes Cells*. 2006;11(2):123-31.
25. Galanello R, Cao A. Gene test review. Alpha-thalassemia. *Genet Med*. 2011;13(2):83-8.
26. Grosso M, Sessa R, Puzone S, Storino MR, Izzo P. Molecular basis of thalassemia. 2012. In: *Anemia* [Internet]. Rijeka: InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/anemia/molecular-basis-of-thalassemia>.
27. Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood*. 1985;66(4):783-7.

28. Huang XD, Yang XO, Huang RB, Zhang HY, Zhao HL, Zhao YJ, et al. A novel four base-pair deletion within the Agamma-GLOBin gene promoter associated with slight increase of Agamma expression in adult. *Am J Hematol.* 2000;63(1):16-9.
29. Giardina P, Rivella S. Thalassemia syndromes. In: R H, EJ B, LE S, HE H, JI W, J A, editors. *Hematology, basic principles.* 6th edition ed. Philadelphia, USA: Elsevier; 2013.
30. Forget BG. The Thalassemia Syndromes. In: Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al., editors. *Hematology basic principles and practice.* Philadelphia, USA: Churchill Livingstone; 2000.
31. Sankaran VG, Xu J, Byron R, Greisman HA, Fisher C, Weatherall DJ, et al. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *N Engl J Med.* 2011;365(9):807-14.
32. Thein SL. Molecular control of fetal hemoglobin production and the implication for therapy. *Hematology education for European Hematology Association.* 2008;2(1):186-93.
33. Superti-Furga G, Barberis A, Schaffner G, Busslinger M. The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the gamma-globin gene. *EMBO J.* 1988;7(10):3099-107.
34. Doerfler PA, Feng R, Li Y, Palmer LE, Porter SN, Bell HW, et al. Activation of γ -globin gene expression by GATA1 and NF-Y in hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet.* 2021;53(8):1177-86.
35. Kollia P, Kalamaras A, Chassanidis C, Samara M, Vamvakopoulos NK, Radmilovic M, et al. Compound heterozygosity for the Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin and beta-thalassemia or Hb Sabine confirms the functional role of the Agamma -158 C>T mutation in gamma-globin gene transcription. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;41(3):263-4.
36. Sankaran VG, Lettre G, Orkin SH, Hirschhorn JN. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214:47-56.
37. Ugrin M, Stojiljkovic M, Zukic B, Klaassen K, Katsila T, Vasiljevic J, et al. Functional Analysis of an (A) γ -Globin Gene Promoter Variant (HBG1: g.-225_-222delAGCA) Underlines Its Role in Increasing Fetal Hemoglobin Levels Under Erythropoietic Stress. *Hemoglobin.* 2016;40(1):48-52.
38. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11869-74.
39. Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, et al. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood.* 2009;114(6):1254-62.
40. Sankaran VG, Menne TF, Šćepanović D, Vergilio JA, Ji P, Kim J, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1519-24.
41. Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajani refah A, Pourfarzad F, van Ijcken W, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1699-710.
42. Wyszynski DF, Baldwin CT, Cleves MA, Amirault Y, Nolan VG, Farrell JJ, et al. Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2004;50(1):23-33.
43. Tafrahi C, Paizi A, Borg J, Radmilovic M, Bartsakoulia M, Giannopoulou E, et al. Genomic variation in the MAP3K5 gene is associated with β -thalassemia disease severity and hydroxyurea treatment efficacy. *Pharmacogenomics.* 2013;14(5):469-83.
44. Bailey L, Kuroyanagi Y, Franco-Penteado CF, Conran N, Costa FF, Ausenda S, et al. Expression of the gamma-globin gene is sustained by the cAMP-dependent pathway in beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2007;138(3):382-95.
45. Chen Z, Luo HY, Steinberg MH, Chui DH. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;42(2):144-9.
46. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(5):1620-5.
47. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008;322(5909):1839-42.

48. Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Goyenechea B, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis A, et al. The Corfu deltabeta thalassemia deletion disrupts gamma-globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. *Blood*. 2005;105(5):2154-60.
49. Bauer DE, Orkin SH. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23(1):1-8.
50. Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1202:64-8.
51. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science*. 2013;342(6155):253-7.
52. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11346-51.
53. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):R216-23.
54. Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet*. 2010;42(9):801-5.
55. Zhou D, Pawlik KM, Ren J, Sun CW, Townes TM. Differential binding of erythroid Kruppel-like factor to embryonic/fetal globin gene promoters during development. *J Biol Chem*. 2006;281(23):16052-7.
56. Donze D, Townes TM, Bieker JJ. Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*. 1995;270(4):1955-9.
57. Chen X, Bieker JJ. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) contains a multifunctional transcriptional activation domain important for inter- and intramolecular interactions. *EMBO J*. 1996;15(21):5888-96.
58. Möller M, Jöud M, Storry JR, Olsson ML. ErythroGene: a database for in-depth analysis of the extensive variation in 36 blood group systems in the 1000 Genomes Project. *Blood Adv*. 2016;1(3):240-9.
59. Liu D, Zhang X, Yu L, Cai R, Ma X, Zheng C, et al. KLF1 mutations are relatively more common in a thalassemia endemic region and ameliorate the severity of β -thalassemia. *Blood*. 2014;124(5):803-11.
60. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-91.
61. Perkins A, Xu X, Higgs DR, Patrinos GP, Arnaud L, Bieker JJ, et al. Krüppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants. *Blood*. 2016;127(15):1856-62.
62. Fraser NS, Knauth CM, Moussa A, Dean MM, Hyland CA, Perkins AC, et al. Genetic Variants Within the Erythroid Transcription Factor, KLF1, and Reduction of the Expression of Lutheran and Other Blood Group Antigens: Review of the In(Lu) Phenotype. *Transfus Med Rev*. 2019;33(2):111-7.
63. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*. 2010;42(9):742-4.
64. Radmilovic M, Zukic B, Petrovic MS, Bartsakoulia M, Stankovic B, Kotur N, et al. Functional analysis of a novel KLF1 gene promoter variation associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann Hematol*. 2013;92(1):53-8.
65. Tallack MR, Perkins AC. Three fingers on the switch: Krüppel-like factor 1 regulation of γ -globin to β -globin gene switching. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(3):193-200.
66. Satta S, Perseu L, Moi P, Asunis I, Cabriolu A, Maccioni L, et al. Compound heterozygosity for KLF1 mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell protoporphyrin. *Haematologica*. 2011;96(5):767-70.
67. Arnaud L, Saison C, Helias V, Lucien N, Steschenko D, Giarratana MC, et al. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *Am J Hum Genet*. 2010;87(5):721-7.
68. Giardine B, Borg J, Higgs DR, Peterson KR, Philipsen S, Maglott D, et al. Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat Genet*. 2011;43(4):295-301.
69. George E, Ann TJ. Genotype-phenotype diversity of beta-thalassemia in Malaysia: treatment options and emerging therapies. *Med J Malaysia*. 2010;65(4):256-60.

70. dos Santos CO, Zhou S, Secolin R, Wang X, Cunha AF, Higgs DR, et al. Population analysis of the alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene identifies sequence variants that alter expression and function. *Am J Hematol.* 2008;83(2):103-8.
71. Bank A. AHSP: a novel hemoglobin helper. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1746-9.
72. Lai MI, Jiang J, Silver N, Best S, Menzel S, Mijovic A, et al. Alpha-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2006;133(6):675-82.
73. R G, L P, N G, G S. AHSP expression in beta-thalassemia carriers with thalassemia intermedia phenotype. *Blood.* 2003;102(1881a).
74. Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, Sangkla P, Weiss MJ, Higgs DR. Evaluation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with beta thalassemia. *Blood.* 2004;103(9):3296-9.
75. Wang Z, Yu W, Li Y, Shang X, Zhang X, Xiong F, et al. Analysis of alpha-hemoglobin-stabilizing protein (AHSP) gene as a genetic modifier to the phenotype of beta-thalassemia in Southern China. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(2):128-32.
76. Ginder GD. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res.* 2015;165(1):115-25.
77. van Dijk TB, Gillemans N, Pourfarzad F, van Lom K, von Lindern M, Grosveld F, et al. Fetal globin expression is regulated by Friend of Prmt1. *Blood.* 2010;116(20):4349-52.
78. Baronciani D, Angelucci E, Potschger U, Gaziev J, Yesilipek A, Zecca M, et al. Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Hemoglobinopathy Registry, 2000-2010. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(4):536-41.
79. Cao A, Moi P, Galanello R. Recent advances in β -thalassemias. *Pediatr Rep.* 2011;3(2):e17.
80. Brendel C, Williams DA. Current and future gene therapies for hemoglobinopathies. *Curr Opin Hematol.* 2020;27(3):149-54.
81. Soni S. Gene therapies for transfusion dependent β -thalassemia: Current status and critical criteria for success. *Am J Hematol.* 2020;95(9):1099-112.
82. Nienhuis AW, Persons DA. Development of gene therapy for thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11).
83. Temple GF, Dozy AM, Roy KL, Kan YW. Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for beta-thalassaemia. *Nature.* 1982;296(5857):537-40.
84. Lan N, Howrey RP, Lee SW, Smith CA, Sullenger BA. Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science.* 1998;280(5369):1593-6.
85. Weatherall DJ. Gene therapy: repairing haemoglobin disorders with ribozymes. *Curr Biol.* 1998;8(19):R696-8.
86. Chandrakasan S, Malik P. Gene therapy for hemoglobinopathies: the state of the field and the future. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(2):199-216.
87. Raja JV, Rachchh MA, Gokani RH. Recent advances in gene therapy for thalassemia. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(3):194-201.
88. Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood.* 2013;122(9):1556-64.
89. Malik P, Arumugam PI. Gene Therapy for beta-thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:45-50.
90. Cavazzana M, Mavilio F. Gene Therapy for Hemoglobinopathies. *Hum Gene Ther.* 2018;29(10):1106-13.
91. Dong A, Rivella S, Breda L. Gene therapy for hemoglobinopathies: progress and challenges. *Transl Res.* 2013;161(4):293-306.
92. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Ribeil JA, Hongeng S, et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 2018;378(16):1479-93.
93. Negre O, Eggimann AV, Beuzard Y, Ribeil JA, Bourget P, Borwornpinyo S, et al. Gene Therapy of the β -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the β (A(T87Q))-Globin Gene. *Hum Gene Ther.* 2016;27(2):148-65.
94. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823-6.
95. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature.* 2010;467(7313):318-22.

96. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007;318(5858):1920-3.

Novi uvid u genetiku naslednih perifernih neuropatija

Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju,

Centar za forenzičku i primenjenju molekularnu genetiku

Kontakt: milica@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Nasledne periferne neuropatije čini klinički i genetički heterogena grupa bolesti uzrokovanih aksonalnom degeneracijom motornih i senzornih neurona perifernog nervnog sistema. Odlikuju se izrazitom alelskom i lokusnom heterogenošću, a do danas je sa ovom grupom bolesti asocirano više od 1000 mutacija u preko 100 gena. Korišćenjem klasičnih metoda genetičke dijagnostike najveći broj uzročnih mutacija identifikovan je u 4 gena: PMP22, GJB1, MFN2 i MPZ. Najučestaliji tip, CMT1A, uzrokovan je duplikacijom 1,5 Mb u regionu hromozoma 17p11.2 i čini oko 50% svih naslednih perifernih neuropatija. Ovom duplikacijom obuhvaćen je gen PMP22 koji kodira protein mijelinskog omotača. Recipročna delecija ovog regiona asocirana je sa blagom naslednom neuropatijom. Geni GJB1, MFN2 i MPZ se karakterišu širokim spektrom mutacija, a populacione specifičnosti u vidu značajnih odstupanja u zastupljenosti pojedinih mutacija se mogu objasniti efektom osnivača.

Upotrebom masivnog paralelnog sekvenciranja omogućen je napredak u genetičkoj dijagnostici ovih bolesti koji se pre svega ogleda u otkriću novih gena, kao i u otkriću novih mutacija u genima odrađene asociranim sa ovim, ali i sa drugim neurološkim i mišićnim bolestima. Pri tome, verovatnoća za otkrivanje uzročne mutacije koreliše sa pozitivnom porodičnom anamnezom, prisustvom endogamije, ranim početkom i demijelinirajućim oblikom bolesti. Takođe, kod nekih bolesnika je identifikovano i prisustvo strukturnih varijacija koje ne obuhvataju do sada poznate uzroke naslednih perifernih neuropatija, kod kojih je patomehanizam nastanka bolesti i dalje nepoznat.

Ključne reči: Nasledne periferne neuropatije, masivno paralelno sekvenciranje, strukturne varijacije

Genetics of inherited peripheral neuropathies: renewed data

Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević

University of Belgrade – Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology,

Center for Forensic and Applied Molecular Genetics

Correspondence: milica@bio.bg.ac.rs

Abstract

Inherited peripheral neuropathies (IPN) comprise a clinically and genetically heterogeneous group of disorders caused by axonal degeneration of motor and sensory nerves of peripheral nervous system. So far, more than 1000 mutations in more than 100 genes have been found to be associated with IPN. Using standard molecular-genetic diagnostics, vast number of mutations was identified in following genes: PMP22, GJB1, MFN2 and MPZ. The most frequent, CMT1A, is caused by 1,5 Mbp duplication of 17p11.2 and represents approximately 50% of all IPN. The duplication includes myelin sheath protein gene PMP22, whereas reciprocal deletion is associated with a mild hereditary neuropathy termed HNPP. GJB1, MFN2 and MPZ genes harbour various mutations, whose frequencies vary between populations. Significant differences of individual mutation frequencies could be mostly explained by founder effect.

Massive parallel sequencing methodologies (MPS) brought new discoveries. First of all, new genes were found to be associated with IPN. Then, new mutations in well-known genes previously associated with IPN, but also with other neurological and muscular disorders, were found to be disease-causing. Also, some patients were found to carry structural variants involving regions not previously associated with IPN, with pathomechanism of the disease yet to be resolved. Generally, a positive genetic diagnosis was more likely to be reached in cases with positive history of neuropathy and consanguinity, early onset and/or demyelinating neuropathy.

Keywords: Inherited peripheral neuropathy, massive parallel sequencing, structural variants

Periferne neuropatije čini heterogena grupa bolesti uzrokovanih aksonalnom degeneracijom motornih i senzornih nerava perifernog nervnog sistema. Karakterišu se progresivnim gubitkom funkcije perifernih nerava, pri čemu zahvaćenost i obim gubitka funkcije pozitivno korelišu sa njihovom dužinom. Periferne neuropatije se međusobno razlikuju po etiologiji, patomehanizmu i kliničkoj slici. U zavisnosti od uzroka, mogu se podeliti na stečene (eng. *Acquired Peripheral Neuropathy*, APN) i nasledne periferne neuropatije (eng. *Inherited Peripheral Neuropathy*, IPN). Stečene neuropatije se mogu javiti kao posledica dejstva toksina, uključujući toksično dejstvo lekova, ili mehaničkih povreda, kao i sekundarno, usled metaboličkih poremećaja (dijabetes), nedostataka u ishrani, infekcija i zapaljenskih procesa [1-3]. Nasledne periferne neuropatije su genetički uzrokovane [3, 4]. One se odlikuju izrazitom alelskom i lokusnom heterogenošću i do danas je sa ovom grupom bolesti asocirano više od 1000 mutacija u preko 100 gena [5-7]. Po tipu nerava zahvaćenih degeneracijom, u okviru IPN se mogu razlikovati sledeći entiteti: nasledne motorne i senzorne neuropatije (eng. *Hereditary Motor and Sensory Neuropathy*, HMSN) ili Šarko-Mari-Tut-ova bolest (eng. *Charcot-Marie-Tooth disease*, CMT) kada su zahvaćeni i motorni i senzorni neuroni perifernog nervnog sistema, nasledne motorne neuropatije (eng. *Hereditary Motor Neuropathy*, HMN) uzrokovane predominantnom degeneracijom motornih neurona i nasledne senzorne neuropatije i neuropatije autonomnog nervnog sistema (eng. *Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy*; HSAN) koje obuhvataju neuropatije uzrokovane aksonalnom degeneracijom senzornih i/ili visceralnih nerava. Dalja klasifikacija IPN podrazumeva elektrofiziološke kriterijume, pa se u okviru CMT razlikuju demijelinirajuća forma CMT u okviru koje je najčešća CMT tip 1 (CMT1), koja se odlikuje smanjenjem brzine nervne provodljivosti (eng. *Nerve Conduction Velocity*, NCV), a povezana je sa poremećajima u mijelinaciji vlakana perifernog nervnog sistema, i aksonalna forma CMT u okviru koje je najzastupljenija CMT tip 2 (CMT2), kod koje su očuvane brzine nervne provodljivosti, ali su po pravilu smanjeni intenziteti akcionih potencijala, a kao posledica smanjenog broja funkcionalnih aksona u okviru nervnog vlakna. Kao granična vrednost koristi se brzina nervne provodljivosti motorne komponente (eng. *Motor Nerve Conduction Velocity*, MNCV) nerva *medianus* koja iznosi 38 m/s [8, 9]. Intermedijerna forma bolesti se odlikuje brzinama nervne provodljivosti između 25 i 45 m/s, i, iako se često preklapa sa tipovima CMT1 i CMT2, može pomoći u usmeravanju genetičke dijagnostike bolesti [10, 11]. Normalne vrednosti brzina nervne provodljivosti variraju između 51 i 65 m/s. Dalja klasifikacija se vrši prema tipu nasleđivanja i genu uzročniku. Nasledne periferne neuropatije su progresivne bolesti, i često na samom početku nisu prisutni znaci ili simptomi na osnovu kojih bi moglo preciznije da se odredi o kojoj formi bolesti se radi. Sa druge strane, smanjenje brzina nervne provodljivosti je prisutno na samom početku i predstavlja neprogresivnu komponentu, što je čini pouzdanim dijagnostičkim kriterijumom u svim fazama bolesti. Nasledne periferne neuropatije se mogu javiti izdvojeno, ili kao deo neke multisistemske bolesti ili sindroma. Često se javljaju zajedno sa ataksijom ili spazmom, a postoji i preklapanje u genetičkoj osnovi sa spinocerebelarnim ataksijama (SCA) i naslednim spastičnim paraparezama (eng. *Hereditary Spastic Paraparesis*, HSP) [12-15].

Iako se CMT često mogu jasno podeliti na demijelinirajuću i aksonalnu formu, klinička prezentacija bolesti je posledica aksonalne degeneracije, koja u najvećem broju slučajeva primarno zahvata duža, a zatim i kraća nervna vlakna. Bolest se javlja u detinjstvu ili adolescenciji. Usled degeneracije perifernih nerava dolazi do simetrične, sporoprogredirajuće atrofije distalne muskulature nogu i stopala, i u većini slučajeva konačno zahvata i muskulaturu ruku. Takođe su prisutni gubitak osetljivosti, smanjeni ili ugašeni duboki tetivni refleksi i deformiteti stopala i ruku, kao što je *pes cavus* [10]. Vreme pojave bolesti, brzina progresije, kao i težina kliničke slike pokazuju veliku unutar- i među-familijarnu varijabilnost [16]. Sveprisutnost aksonalne degeneracije neurona perifernog nervnog sistema i korelacija nivoa degeneracije sa dužinom zahvaćenih vlakana ukazuje na to da poremećaj u aksonalnom transportu organela i/ili

metabolita može biti zajednički patomehanizam velikog broja demijelinirajućih i aksonalnih formi bolesti, bez obzira na primarni defekt [17, 18, 19].

Demijelinirajuće CMT predstavljaju najčešću formu naslednih perifernih neuropatija, a autozomno - dominantna forma ove bolesti (CMT1) zastupljena je kod više od 60% pacijenata sa naslednim motornim i senzornim neuropatijama [20]. Najveći broj CMT1 pacijenata nosi mutaciju u nekom od gena za proteine mijelina. Aksoni nervnih vlakana perifernog nervnog sistema sekvencijalno su obmotani višeslojnom strukturom koju formiraju ćelije glijе (Švanove ćelije) i koja formira mijelinski omotač. Između delova obmotanih mijelinskim omotačem nalaze se Ranvijeova suženja, regioni aksona u kojima se evocira akcioni potencijal. Na ovaj način, mijelizovana nervna vlakna imaju veće brzine provođenja nervnog impulsa u odnosu na nemijelizovana, što je od posebnog značaja za dugačke aksone. Pored uticaja na brzinu nervne provodljivosti, mijelinski omotač ima zaštitnu ulogu, a posreduje i u signalizaciji i razmeni metabolita između aksona i Švanovih ćelija [21]. U izgradnji mijelinskog omotača učestvuju periferni protein mijelina 22 (eng. *Peripheral Myelin Protein 22*, PMP22), mijelin protein nula ili protein 0 (eng. *Myelin Protein Zero/Protein 0*, MPZ/P0) i male promene u ekspresiji gena *PMP22* i *MPZ/P0* dovode do poremećaja u razvoju i/ili održavanju mijelinskog omotača [22, 23, 24]. CMT1X se odlikuje X vezanim nasleđivanjem i uzrokovana je mutacijama u genu *GJB1* koji kodira protein pukotinaste veze β -1/koneksin 32 (eng. *Gap Junction Protein β -1/Connexin 32*, *GJB1/Cx32*). Od CMT1 i CMT2 razlikuje se, pre svega, po genetičkoj osnovi. Brzina nervne provodljivosti kod pacijenata muškog pola kreće se između 30 i 40 m/s, dok se kod pacijentkinja kreće između 30 i 50 m/s [25]. Patohistološkom analizom uzoraka perifernih nerava pacijenata sa kliničkom dijagnozom CMT1X detektuje se aksonalna atrofija i regeneracija i minimalna de- i re-mijelinacija [26]. Cx32 se nalazi u paranodalnim regionima mijelinskog omotača (neposredno uz Ranvijeova suženja) u regionu nekompaktnog mijelina i u Šmit-Lantermanovim ostrvcima [27], učestvujući u unutarćelijskim pukotinastim vezama i omogućavajući brz transfer malih molekula radijalno kroz mijelinski omotač [28, 29]. Kod različitih CMT, uključujući CMT1A (duplikacija *PMP22*), CMT1E (mutacije u *PMP22*) i CMT1B (mutacije u *MPZ*), bilo zbog prevelike ekspresije, bilo zbog promene u aminokiselinskoj sekvenci, formiraju se proteinski agregati koji doprinose patogenezi bolesti. Nagomilavanje proteinskih agregata u endopazmatičnom retikulumu po pravilu pokreću ćelijski odgovor na pogrešno spakovane proteine (eng. *Unfolded Protein Response*, UPR) koji povlači povećanu sintezu šaperona proteina, smanjenje nivoa translacije i povećanu proteozomalnu degradaciju. Iako je u pitanju adaptivni mehanizam, UPR može značajno da utiče na funkcionalnost ćelije, a konačno da dovede i do apoptoze [30-38]. Nemogućnost Švanove ćelije da održi homeostazu i obezbedi adekvatnu komunikaciju sa aksonom posledično dovodi do klinički prepoznatljive aksonalne degeneracije [39].

Aksonalne forme CMT (CMT2) uglavnom su uzrokovane mutacijama u genima čiji proteinski produkti učestvuju u formiranju citoskeleta i ćelijskom transportu (uključujući aksonalni), mitohondrijalnoj dinamici, komunikaciji između organela, kao i translaciji koja se odigrava duž različitih delova aksona. Ovi geni su široko eksprimirani, ali zbog posebnih energetskehteva i osetljivosti (posebno dugačkih, aksona), po pravilu dovode do periferne neuropatije, ne zahvatajući druge sisteme organa, kao ni centralni nervni sistem [40]. Aksonalni transport je energetski zahtevan visoko regulisan proces kojim se transportuju organele i metaboliti, translaciona mašinerija, informacione RNK i signalni molekuli duž aksonalnih mikrotubula [41]. Transport mitohondrija duž aksona, kao i visoko regulisana mitohondrijalna dinamika koja uključuje adekvatno pozicioniranje mitohondrija u regione aksona sa povećanim energetskehtima, međusobne interakcije, spajanje i odvajanje mitohondrija, interakcije sa drugim organelama (endoplazmatični retikulum, kasni endozomi, lizozomi) su od vitalnog značaja za održavanje strukture i funkcije aksona [19, 40]. Mitofuzin 2 (eng. *Mitofusin 2*, MFN2) lociran u spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, učestvuje u interakcijama između

mitohondrija, fuziji, kao i njihovom transportu. Uglavnom dominantne, ali i recesivne, mutacije u genu za mitofuzin 2 su najčešći uzrok CMT2, koje su odgovorne za oko 20% aksonalnih neuropatija, i oko 90 % teških oblika bolesti [42-45]. Posebnu grupu aksonalnih CMT čine bolesti uzrokovane mutacijama u aminoacil-t-RNK sintetazama (ARS). Posle inicijalnog otkrića dominantne mutacije u genu za glicil-ARS (GARS) [46], kao uzroci dominantnih CMT2 identifikovane su mutacije u genima za različite aminoacil-t-RNK sintetaze (alanin(A)-ARS, histidin(H)-ARS, lizin(K)-ARS, metionin(M)-ARS, triptofan(W)-ARS; tirozin(Y)-ARS) [47-51]. Mehanizam kojim ove mutacije dovode do aksonalne degeneracije nije do kraja jasan, ali eksperimenti pokazuju da nije reč o haploinsuficijenciji, već da se radi o toksičnom efektu mutiranog proteina, koji konačno utiče na efikasnost translacije [52].

Korišćenjem klasičnih metoda genetičke dijagnostike najveći broj mutacija uzročnika naslednih perifernih neuropatija identifikovan je u 4 gena: *PMP22*, *GJB1*, *MFN2* i *MPZ* [53, 54]. Najučestaliji tip, CMT1A, uzrokovan je duplikacijom 1,5 Mb u regionu hromozoma 17p11.2 [55] i čini oko 50% svih IPN [56]. Ovom duplikacijom obuhvaćen je gen *PMP22* koji kodira za protein mijelinskog omotača. Recipročna delecija ovog regiona asocirana je sa blagom naslednom neuropatijom (eng. *Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies*, HNPP) [57]. Geni *GJB1*, *MFN2* i *MPZ* se karakterišu širokim spektrom mutacija, a populacione specifičnosti u vidu značajnih odstupanja u zastupljenosti pojedinih mutacija se mogu objasniti efektom osnivača [58, 59]. Rutinska upotreba metoda masivnog paralelnog sekvenciranja (MPS) dovela je do značajnog napretka u genetičkoj dijagnostici IPN koji se pre svega ogleda u otkriću novih gena asociranih sa bolestima, kao i u otkriću novih mutacija u genima odranije asociranim sa IPN, ali i sa drugim neurološkim i mišićnim bolestima [6]. I pored novih otkrića, tek za 65% CMT pacijenata je identifikovan gen uzročnik, od kojih je u 90% slučajeva to jedan od navedena četiri gena [60-62]. Očekivana uspešnost uspostavljanja genetičke dijagnoze iznosi više od 85% za CMT1, 30-40% za nasledne senzorne neuropatije (HSN), 25-30% za CMT2 i 15-25% za nasledne motorne neuropatije (HMN) [61, 62, 63]. Verovatnoća za otkrivanje uzročne mutacije koreliše sa pozitivnom porodičnom anamnezom, prisustvom endogamije, ranim početkom i demijelinirajućim oblikom bolesti [64].

Tradicionalan pristup genetičkoj dijagnostici - koji je podrazumevao detaljnu kliničku i elektrofiziološku evaluaciju pacijenta, a zatim analizu pojedinačnih gena u skladu sa utvrđenim algoritmima; u poslednje vreme je, osim u slučaju CMT1 (u kom se prvenstveno radi ciljana detekcija duplikacije *PMP22* gena), zamenjen sekvenciranjem nove generacije. Kao metoda prvog izbora u velikom broju laboratorija radi se sekvenciranje genskih panela koji uključuju analizu gena do sada asociranih sa naslednim perifernim neuropatijama, ali i sa naslednim spastičnim paraparezama, spinocerebelarnim ataksijama, miopatijama, kao i bolestima motoneurona [65-69]. Ovi paneli obuhvataju egzone, granice egzona i introna, ali i druge regione za koje je pokazano da promena u sekvenci ili broju kopija (eng. *Copy Number Variation*, CNV) može uzrokovati pojavu neuropatije. To mogu biti različiti regulatorni regioni kao što su promotori, 5' i 3' netranslirajući regioni (*GJB1*) [64, 70], te pojačivači (*PMP22*) [71-73]. Simultanom analizom gena asociranih sa neuropatijama obuhvaćen je veliki broj kombinacija fenotipa i gena uzročnika, a imajući u vidu da iste ili različite mutacije u istom genu mogu da dovedu do različitih prezentacija bolesti, kao i do različitih bolesti. Pa tako, mutacije u *MPZ* mogu biti uzročnik CMT1, CMT2, intermedijerne forme [74-76], kao i kongenitalnog, posebno teškog oblika bolesti, poznatijeg kao Dežerin-Sota sindrom (*Dejerine-Sottas*) [77]. Delecija *PMP22*, pored HNPP, može biti asocirana sa kliničkom prezentacijom CMT2 [78]. Posledice mutacije u genu za Atlantin GTP-azu 1 (eng. *Atlastin GTPase 1*, *ATL1*) se mogu ispoljiti u centralnom nervnom sistemu (CNS) i dovesti do nasledne spastične parapareze (HSP), ili uzrokovati perifernu neuropatiju (HSAN) bez zahvaćenosti CNS-a [64, 65], dok mutacije u genu za Dinamin 1 (eng. *Dynamin 1*, *DNM1*), pored periferne neuropatije, mogu uzrokovati

i miopatiju [66], a u genu za Fosfoinozotid 5-fosfatazu (eng. *Phosphoinositide 5-Phosphatase, FIG4*) bolesti motoneurona [67, 68]. Takođe, pokazano je da različite mutacije u istom genu mogu biti povezane sa različitim obrascima nasleđivanja (autozomno - dominantno i autozomno - recesivno nasleđivanje mutacija u genima za protein ranog odgovora na rast 2 ili kroks 20 (eng. *Early Growth Response-2/Krox 20, EGR2/Krox 20*), laki polipeptid proteina neurofilamenta (eng. *Neurofilament Protein, Light Chain, NEFL*) i za protein indukovani gangliozidom asocirani sa diferencijacijom 1 (eng. *Ganglioside-Induced Differentiation-Associated Protein 1, GDAP1*)) [6]. Analizom definisanih genskih panela smanjuje se vreme i obim bioinformatičke podrške neophodne za analizu rezultata, a broj utvrđenih varijanti nepoznatog značaja (eng. *Variants of Uncertain Significance, VUS*) je sveden na minimum, kao i mogućnost iznenadnih i sekundarnih otkrića (eng. *Incidental and Secondary Findings*). Na ovaj način je pojednostavljena i procedura komunikacije sa pacijentima. Sa druge strane, veliki broj novootkrivenih gena uzročnika IPN je identifikovan upravo analizom celog egzoma (eng. *Whole Exome Sequencing, WES*) ili varijantom analize koja uključuje klinički relevantne gene (analizom kliničkog egzoma), a konačno i analizama celog genoma (eng. *Whole Genome Sequencing, WGS*). Ovi pristupi su zahtevniji, kako u operativnom tako i u finansijskom smislu, ali omogućavaju identifikaciju novih gena uzročnika, a posebno imajući u vidu široku ekspresiranost velikog broja gena asociranih sa perifernim neuropatijama i sveprisutnost njihovih proteinskih produkata u različitim tkivima i organima. WGS analize takođe omogućavaju identifikaciju potencijalno uzročnih regiona i van kodirajuće sekvence. U zavisnosti od primenjene metode, dobija se u manjem ili većem obimu značajna količina informacija i potrebno je, dodatnim analizama (pretragom literature, pretragom prisustva učestalosti i fenotipske prezentacije varijanti u humanim genomima referentnih i drugih populacija, pretragama baza nukleotidnih sekvenci, *in silico* analizama mutiranih proteina, dodatnim MPS ili ciljanim analizama genoma roditelja ili analizama pedigreea, analizama transkriptoma i/ili funkcionalnim analizama) selektovati varijante i odvojiti potencijalne uzročnike bolesti od benignih i verovatno benignih varijanti. Analizom genskih panela, kao i drugim aplikacijama, značajan broj dobijenih VUS nukleotidnih varijanti su upravo heterozigotne mutacije koje dovode do gubitka funkcije (eng. *Loss-of-Function, LoF*) u genima asociranim sa neuropatijama, a za koje je predviđeno ili ranije potvrđeno da imaju recesivan efekat [64]. Ovakve mutacije ukazuju na moguće postojanje drugih *cis* i/ili *trans* faktora koji bi mogli da dovedu do inaktivacije i druge, naizgled, funkcionalne kopije gena. U zavisnosti od prethodno primenjene metodologije, to mogu, između ostalog, biti regioni koji nisu bili obuhvaćeni sekvenciranjem (nekodirajući regioni kod analiza egzoma), regioni koji iz tehničkih razloga nisu adekvatno pokriveni analizama kao npr. homopolimerni nizovi u koje se po pravilu uvode greške prilikom priprema biblioteka i regioni bogati G-C parovima koji se slabo amplifikuju lančanom reakcijom polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) [79]. Takođe, standardnim metodama MPS-a koje uključuju umnožavanje ciljanih regiona PCR-om, te sekvenciranje preklapajućih regiona veličine 150-300 bp, nije moguće detektovati ili precizno locirati kompleksne strukturne rearanžmane, često neutralne po broju kopija, te nedetektibilne i drugim metodama, a koji u pojedinim slučajevima mogu objasniti fenomen nedostatka nasledljivosti (eng. *Missing Heritability*) [80]. Sa pojavom nove generacije sekvenciranja, posebno sekvenciranja pojedinačnih molekula DNK u realnom vremenu (eng. *Long-Read High Fidelity (Hi Fi) Single Molecule, Real-Time (SMRT) sequencing*) [81] kojim je omogućena analiza molekula DNK dužine i do nekoliko desetina hiljada baznih parova, bez umnožavanja PCR-om i praktično bez grešaka, otvara se mogućnost analize homopolimernih nizova, G-C bogatih sekvenci, a takođe i kompleksnih strukturnih varijacija [82]. Region u kome mapira detektovana strukturna varijacija može obuhvatiti gen ili gene od ranije asocirane sa perifernim neuropatijama, u kom slučaju se dodatnim analizama može utvrditi na koji način genetički rearanžman utiče na ekspresiju gena, te utvrditi genotip-fenotip korelacija. Do danas je opisano nekoliko desetina različitih strukturnih varijacija kod pacijenata sa naslednim perifernim neuropatijama, od kojih većina

obuhvata poznate gene – uzročnike IPN [83]. Sa druge strane, ukoliko rearanžman ne obuhvata protein – kodirajuće gene ili analize transkriptoma i funkcionalne analize ne ukazuju na poremećaje u njihovoj ekspresiji, patomehanizam nastanka bolesti za sada bi ostao nepoznat, a uzroke treba dalje tražiti i na nivou promena u arhitekturi hromatina [83].

Literatura:

1. England JD, Asbury AK. Peripheral neuropathy. *The Lancet* 2004; 363 (9427): 2151-2161.
2. Benoy V, d'Ydewalle C, Van Den Bosch L. Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Peripheral Neuropathies. *Young Perspectives for Old Diseases* 2015;1: 269.
3. Weis J, Claeys KG, Roos A, Azzedine H, Katona I, Schröder JM *et al.* Towards a functional pathology of hereditary neuropathies. *Acta Neuropathol* 2017;133: 493-515.
4. Baets J, De Jonghe P, Timmerman V. Recent advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Current Opinion in Neurology* 2014;27 (5): 532-540.
5. Timmerman V, Strickland AV, Züchner S. Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)* 2014;5(1): 13-32.
6. Eggermann K, Gess B, Häusler M, Weis J, Hahn A, Kurth I. Hereditary Neuropathies. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(6): 91-97.
7. Pisciotta C, Shy ME. Neuropathy. *Handb Clin Neurol.* 2018;148: 653-665.
8. De Visser M. Diagnostic criteria for autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy type Ia. *Neuromuscul Disord* 1993;3(1): 77-9.
9. De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, Nelis E, De Vriendt E, Löfgren A *et al.* (1999) The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 1999;122: 281-90.
10. Reilly M. Classification and diagnosis of inherited neuropathies. *Ann Indian Acad Neurol* 2009;12: 80-8.
11. Bassam BA. Charcot-Marie-Tooth Disease Variants—Classification, Clinical, and Genetic Features and Rational Diagnostic Evaluation. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease* 2014;15(3): 117-128.
12. Mathis S, Goizet C, Tazir M, Magdelaine C, Lia AS, Magy L *et al.* Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J Med Genet* 2015;52(10): 681-690.
13. Rossor AM, Carr AS, Devine H, Chandrashekar H, Pelayo-Negro AL, Pareyson D *et al.* Peripheral neuropathy in complex inherited diseases: an approach to diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017;88(10): 846-863.
14. Goizet C, Boukhris A, Mundwiller E, Tallaksen C, Forlani S, Toutain A *et al.* Complicated forms of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia are frequent in SPG10. *Hum Mutat* 2009;30(02): E376-E385.
15. Caramins M, Colebatch JG, Bainbridge MN, Scherer SS, Abrams CK, Hackett EL *et al.* Exome sequencing identification of a GJB1 missense mutation in a kindred with X-linked spinocerebellar ataxia (SCA-X1). *Hum Mol Genet* 2013;22(21): 4329-4338.
16. Lupski JR and Garcia CA. Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathies and related disorders. In *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed., ed. Scriver CR *et al.*, 2000; New York: McGraw-Hill.
17. Baloh RH. Mitochondrial dynamics and peripheral neuropathy. *Neuroscientist.* 2008;14(1): 12-8.
18. Saporta MA, Shy ME. Inherited peripheral neuropathies. *Neurol Clin.* 2013;31(2):5 97-619.
19. Pareyson D, Saveri P, Sagnelli A, Piscoquito G. Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci Lett.* 2015;596: 66-77.
20. Numakura C, Shirahata E, Yamashita S, Kanai M, Kijima K, Matsuki T *et al.* () Screening of the early growth response 2 gene in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Sci* 2003 ;210(1-2): 61-4.
21. Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J *et al.* Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 2012;485(7399): 517-21.
22. Jerath NU, Shy ME. Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(4): 667-78.
23. Niemann A, Berger P, Suter U. Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 2006;8(1-2): 217-42.
24. Roa BB, Warner LE, Garcia CA, Russo D, Lovelace R, Chance PF *et al.* Myelin protein zero (MPZ) gene mutations in nonduplication type 1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mutat* 1996;7(1): 36-45.
25. Nicholson G, Nash J. Intermediate nerve conduction velocities define X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy families. *Neurology* 1993;43(12): 2558-64.
26. Schenone A, Mancardi GL. Molecular basis of inherited neuropathies. *Current Opinion in Neurology* 1999;12: 603-616.
27. Bergoffen J, Trofatter J, Pericak-Vance MA, Haines JL, Chance PF, Fischbeck KH. Linkage localization of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 1993.52(2): 312-8.

28. Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS. Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* 1998;142(4): 1095-104.
29. Bone LJ, Deschênes SM, Balice-Gordon RJ, Fischbeck KH, Scherer SS. Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol Dis* 1997;4(3-4):2 21-30.
30. Notterpek L, Snipes GJ, Shooter EM. Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination. *Glia* 1999;25(4): 358-69.
31. Fortun J, Dunn WA, Jr., Joy S, Li J, Notterpek L. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J Neurosci*. 2003;23(33): 10672-80.
32. Fortun J, Verrier JD, Go JC, Madorsky I, Dunn WA, Notterpek L. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis* 2007;25(2): 252-65.
33. Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA, Jr., Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis* 2006;22(1): 153-64.
34. Lee S, Bazick H, Chittoor-Vinod V, Al Salihi MO, Xia G, Notterpek L. Elevated Peripheral Myelin Protein 22, Reduced Mitotic Potential, and Proteasome Impairment in Dermal Fibroblasts from Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A Patients. *Am J Pathol*. 2018;188(3): 728-38.
35. Wrabetz L, D'Antonio M, Pennuto M, Dati G, Tinelli E, Fratta P *et al*. Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. *J Neurosci* 2006;26(8): 2358-68.
36. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmicreticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(7): 519-29.
37. Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* 2015;17(7): 829-38.
38. Saporta MA, Shy BR, Patzko A, Bai Y, Pennuto M, Ferri C *et al*. MpzR98C arrests Schwann cell development in a mouse model of early-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Brain* 2012;135: 2032-47.
39. Krajewski KM, Lewis RA, Fuerst DR, Turansky C, Hinderer SR, Garbern J *et al*. Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 2000;123(7): 1516-27.
40. McCray BA, Scherer SS. Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease: from Common Pathogenic Mechanisms to Emerging Treatment Opportunities. *Neurotherapeutics* 2021;18(4): 2269-2285.
41. Beijer D, Sisto A, Van Lent J, Baets J & Timmerman V. Defects in Axonal Transport in Inherited Neuropathies. *J Neuromuscul Dis* 2019 ;6: 401-419.
42. Zuchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S *et al*. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 2006;59: 276-281.
43. Feely SM, Laura M, Siskind CE, Sottile S, Davis M, Gibbons VS *et al*. MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology* 2011;76: 1690-1696.
44. McCorquodale DS 3rd, Montenegro G, Peguero A, Carlson N, Speziani F, Price J *et al*. Mutation screening of mitofusin 2 in Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *J Neurol* 2011;258: 1234-1239.
45. Pipis M, Feely SME, Polke JM, Skorupinska M, Perez L, Shy R *et al*. Natural history of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A: a large international multicentre study. *Brain* 2020;143: 3589-3602.
46. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin SQ *et al*. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* 2003;72: 1293-1299.
47. Jordanova A, Irobi J, Thomas FP, Van Dijck P, Meerschaert K, Dewil M *et al*. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet* 2006;38: 197-202.
48. Safka Brozkova D, Deconinck T, Griffin LB, Ferbert A, Haberlova J, Mazanec R *et al*. Loss of function mutations in HARS cause a spectrum of inherited peripheral neuropathies. *Brain* 2015;138: 2161-2172.
49. Tsai PC, Soong BW, Mademan I, Huang YH, Liu CR, Hsiao CT *et al*. A recurrent WARS mutation is a novel cause of autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. *Brain* 2017; 140: 1252-1266.
50. McLaughlin HM, Sakaguchi R, Liu C, Igarashi T, Pehlivan D, Chu K *et al*. Compound heterozygosity for loss-of-function lysyl-tRNA synthetase mutations in a patient with peripheral neuropathy. *Am J Hum Genet* 2010;87: 560-566.
51. Gonzalez M, McLaughlin H, Houlden H, Guo M, Yo-Tsen L, Hadjivassiliou M *et al*. Exome sequencing identifies a significant variant in methionyl-tRNA synthetase (MARS) in a family with late-onset CMT2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84: 1247-1249.
52. Niehues S, Bussmann J, Stefes G, Erdmann I, Kohrer C, Sun L *et al*. Impaired protein translation in Drosophila models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases. *Nat Commun* 2015;6: 7520.

53. *Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database* - IPNMD, 2007.
54. Keckarevic-Markovic M, Milic-Rasic V, Mladenovic J, Dackovic J, Kecmanovic M, Keckarevic D *et al.* Mutational analysis of GJB1, MPZ, PMP22, EGR2, and LITAF/SIMPLE in Serbian Charcot-Marie-Tooth patients. *J Peripher Nerv Syst* 2009;14(2): 125-36.
55. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ *et al.* DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991;66(2): 219-32.
56. Katona I, Wu X, Feely SM, Sottile S, Siskind CE, Miller LJ, *et al.* PMP22 expression in dermal nerve myelin from patients with CMT1A. *Brain* 2009;132: 1734-40.
57. Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B *et al.* DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 1993;72(1): 143-51.
58. Dackovic J, Keckarevic-Markovic M, Komazec Z, Rakocevic-Stojanovic V, Lavnica D, Stevic Z *et al.* Hereditary motor and sensory neuropathy Lom type in a Serbian family. *Acta Myol* 2008;27(2): 59-62.
59. Keckarevic Markovic MP, Dackovic J, Mladenovic J, Milic-Rasic V, Kecmanovic M, Keckarevic D *et al.* An algorithm for genetic testing of Serbian patients with demyelinating Charcot-Marie-Tooth. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013;17(1): 85-7.
60. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011;69(1): 22-33.
61. Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu YT, Davidson GL *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83(7): 706-10.
62. Fridman V, Bundy B, Reilly MM, Pareyson D, Bacon C, Burns J *et al.* CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86(8): 873-8.
63. Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol* 2013;9(10): 562-71.
64. Cortese A, Wilcox JE, Polke JM, Poh R, Skorupinska M, Rossor AM *et al.* Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 2020;94(1): e51-e61.
65. Hübner CA, Kurth I. Membrane-shaping disorders: a common pathway in axon degeneration. *Brain* 2014;137: 3109-21.
66. Timmerman V, Clowes VE, Reid E. Overlapping molecular pathological themes link Charcot-Marie-Tooth neuropathies and hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol*. 2013;246: 14-25.
67. Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis*;3: 26.
68. Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, Jin N, Adamska M, Shiga K *et al.* Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 2007;448(7149): 68-72.
69. Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM *et al.* Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet*. 2009;84(1): 85-8.
70. Cortese A, Manole A, Ashokkumar B. Functional validation of non-coding variants of GJB1 in patients with CMTX1. *Neuromuscul Disord* 2017;27: S25.
71. Zhang F, Seeman P, Liu P, Weternan MA, Gonzaga-Jauregui C, Towne CF *et al.* Mechanisms for nonrecurrent genomic rearrangements associated with CMT1A or HNPP: rare CNVs as a cause for missing heritability. *Am J Hum Genet* 2010;86(6): 892-903.
72. Jones EA, Lopez-Anido C, Srinivasan R, Krueger C, Chang LW, Nagarajan R *et al.* Regulation of the PMP22 gene through an intronic enhancer. *J Neurosci* 2011;31(11): 4242-50.
73. Jones EA, Brewer MH, Srinivasan R, Krueger C, Sun G, Charney KN *et al.* Distal enhancers upstream of the Charcot-Marie-Tooth type 1A disease gene PMP22. *Hum Mol Genet*. 2012;21(7): 1581-91.
74. Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, Shimizu N *et al.* Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 1993;5(1): 31-4.
75. Kleffner I, Schirmacher A, Gess B, Boentert M, Young P. Four novel mutations of the myelin protein zero gene presenting as a mild and late-onset polyneuropathy. *J Neurol* 2010;257(11): 1864-8.
76. Marrosu MG, Vaccargiu S, Marrosu G, Vannelli A, Cianchetti C, Muntoni F. Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene. *Neurology* 1998;50(5): 1397-401.
77. Floroskufi P, Panas M, Karadima G, Vassilopoulos D. New mutation of the MPZ gene in a family with the Dejerine-Sottas disease phenotype. *Muscle Nerve* 2007;35(5): 667-9.

78. Rudnik-Schöneborn S, Tölle D, Senderek J, Eggermann K, Elbracht M, Kornak U *et al.* Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. *Clin Genet* 2016;89(1): 34-43.
79. Pipis M, Rossor AM, Laura M, Reilly MM. Next-generation sequencing in Charcot-Marie-Tooth disease: opportunities and challenges. *Nat Rev Neurol* 2019;15(11): 644-656.
80. Theunissen F, Flynn LL, Anderton RS, Mastaglia F, Pytte J, Jiang L *et al.* Structural Variants May Be a Source of Missing Heritability in sALS. *Front Neurosci* 2020;14: 47.
81. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G *et al.* Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 2009;323(5910): 133-8.
82. Mantere T, Kersten S, Hoischen A. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet* 2019;10: 426.
83. Cutrupi AN, Brewer MH, Nicholson GA, Kennerson ML. Structural variations causing inherited peripheral neuropathies: A paradigm for understanding genomic organization, chromatin interactions, and gene dysregulation. *Mol Genet Genomic Med* 2018;6(3): 422-433.

**BIOMEDICINA
MOLEKULARNA BIOLOGIJA TUMORA**

**BIOMEDICINE
MOLECULAR BIOLOGY OF TUMORS**



Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate

Zorana Dobrijević¹, Suzana Matijašević-Joković², Ana Branković³, Ana Djordjević⁴, Milica Popović⁵ i Goran Brajušković²

¹Univerzitet u Beogradu-Institut za primenu nuklearne energije INEP, Beograd, Srbija

²Centar za humanu molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Beograd, Srbija

³Kriminalističko-policijski univerzitet, Beograd, Srbija

⁴Univerzitet u Beogradu-Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Beograd, Srbija

⁵Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

U ovom radu preglednog tipa prikazano je desetogodišnje iskustvo istraživačkog tima PRO-STATSERBIA koji za temu svog istraživanja ima molekularnu osnovu karcinoma prostate (KP). Centar za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu poseduje kolekciju uzoraka i banku podataka za gotovo 1000 muškaraca sa bolestima prostate (KP i benigna hiperplazija prostate) i preko 350 muškaraca bez znakova bolesti prostate iz populacije Republike Srbije. Najveći broj studija bio je dizajniran kao studije asocijacije odabranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i progresiju KP. U ovim studijama slučajeva i kontola ispitivane su genetičke varijante kako u genima za proteine i nekodirajuće molekule RNK, tako i u nekodirajućim regionima genoma (tzv. „genskim pustinjama“). Pored studija slučajeva i kontrole, sprovedene su i meta-analize kao i analize statističkih epistatičkih interakcija analiziranih genetičkih varijanti. Krajnji cilj ovih studija je kreiranje algoritma za procenu rizika za progresiju bolesti koji bi se koristio u fazi aktivnog praćenja bolesnika sa ranodijagnostikovanim KP. U poslednje vreme, istraživanja su usmerena na egzosome i njihov makromolekulski sadržaj (proteine i nekodirajuće molekule RNK) kao potencijalne biološke markere tačne biopsije KP. Pored toga, biološki makromolekuli na površini egzozoma predstavljaju i ciljane molekule u novim strategijama lečenja KP.

Ključne reči: karcinom prostate, studije asocijacije, meta-analize, genetičke varijante, egzozomi, mikroRNK, PSMA

Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer

**Zorana Dobrijević¹, Suzana Matijašević-Joković², Ana Branković³, Ana Djordjević⁴, Milica Popović⁵
i Goran Brajušković²**

¹Department for Metabolism, Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²Center for Human Molecular Genetics, University of Belgrade-Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

³Criminal Police University, Belgrade, Serbia

⁴University of Belgrade-Institute for Biological Research "Siniša Stanković"-National Institute of Republic of Serbia, Belgrade, Serbia

⁵University of Belgrade-Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

Correspondence: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

Abstract

This review-type paper will present the ten-year experience of the PROSTATSERBIA research team, which has the molecular basis of prostate cancer (PCa) as its research topic. The Center for Human Molecular Genetics of the Faculty of Biology, University of Belgrade has a collection of samples and a data bank for almost 1000 men with prostate diseases (PCa and benign prostatic hyperplasia) and for over 350 men without signs of prostate diseases, all from Serbian population. Most of the studies were designed as studies of association of selected genetic variants with the risk for development and progression of PCa. In these case-control studies, genetic variants were examined both in genes for proteins and non-coding RNAs, as well as in non-coding regions of the genome (so-called gene deserts). In addition to case control studies, both meta-analyses and the analysis of statistical epistatic interactions of the analyzed genetic variants were conducted. The main goal of all these studies was to create an algorithm for risk assessment for disease progression that would be used in the phase of active monitoring of patients with early diagnosed PCa. Recently, we shifted our research focus on exosomes and their macromolecular content (proteins and microRNAs) as potential biological markers of liquid prostate cancer biopsy. In addition, macromolecules at the exosome surface represent target molecules for new PCa treatment strategies.

Keywords: prostate cancer, association studies, meta-analysis, genetic variants, exosomes, microRNA, PSMA

Karcinom prostate

Karcinom prostate (KP), pored karcinoma pluća, najčešće je dijagnostikovani maligni tumor muškaraca širom sveta. I pored toga što su opisani maligni tumori prostate različitog porekla, najveći broj njih su adenokarcinomi nastali neoplastičnom transformacijom žlezdanog epitela prostate. Zato je za maligne tumore prostate široko prihvaćen termin karcinom prostate od kojih je preko 85% sporadičnog (nenaslednog) tipa. Zahvaljujući rutinskoj primeni određivanja serumske vrednosti prostata specifičnog antigena (PSA), od osamdesetih godina prošlog veka („PSA era“), beleži se stabilan trend porasta novodijagnostikovanih slučajeva KP u ranoj fazi bolesti, i to kod muškaraca sve mlađe životne dobi (1).

Standardne metode koje se koriste u dijagnostici KP uključuju digitalni rektalni pregled (eng. *Digital Rectal Examination*, DRE), transrektalni ultrazvučni pregled (eng. *Transrectal Ultrasound*, TRUS) i određivanje serumske vrednosti PSA. Primarni tumori prostate označavaju se stadijumima T. U okviru kliničkog stadijuma T definiše se lokalna zahvaćenost prostate tumorom, pri čemu se razlikuju organ-ograničeni (T1-T2 stadijumi) i lokalno uznapredovali KP (T3-T4 stadijumi). Sa T1 označeni su tumori koji nisu detektabilni kliničkim pregledom i ultrazvukom, sa T2 maligni tumori koji zahvataju jedan (T2) ili oba lobusa prostate, a sa T3 karcinomi koji „probijaju“ kapsulu prostate i zahvataju semene kanaliće. Višim stadijumom T4 označavaju se karcinomi koji zahvataju bešiku i/ili druge lokalne organe i tkiva. Lokalna uznapredovalost KP procenjuje se i određivanjem N stadijuma KP. Stadijumima N karakteriše se prisustvo (N+), odnosno odsustvo (N0) malignih ćelija u regionalnim limfnim čvorovima. Prisustvo metastaza KP u kostima i drugim udaljenim organima opisuje se M stadijumom po TNM klasifikaciji KP (2).

U dijagnostici KP primenjuju se standardni prognostički parametri: klinički stadijum bolesti (T) na osnovu TNM klasifikacije i određivanje preoperativne serumske vrednosti PSA. Zlatni standard u dijagnostici KP je biopsija prostate. Tokom histo-patološke analize bioptiranog tkiva, na osnovu patoloških izmena žlezdanog epitela prostate, određuje se gradus tumora – Glison gradus. Zbirni Glison gradus (GG) izražava se numeričkim vrednostima od 2 do 8 i u korelaciji je sa biološkom prirodom karcinoma u smislu njegove invazivnosti i sposobnosti metastaziranja. Korišćenjem standardnih prognostičkih parametara (klinički stadijum bolesti, serumska vrednost PSA i GG) procenjuje se rizik za progresiju KP (2).

Terapija izbora KP je hirurško lečenje (radikalna prostatektomija). Radikalna prostatektomija za sobom nosi značajan rizik od post-operativnih komplikacija koje mogu imati drastične posledice na kvalitet života operisanih muškaraca. Pre svega, to se odnosi na moguću pojavu nekontrolisanog mokrenja (inkontinencije) i/ili erektilne disfunkcije (impotencije). To je razlog što se savremena urološka onkologija suočava sa paradoksalnim fenomenima, kada su maligne bolesti u pitanju, a to su fenomeni preterane dijagnoze (eng. „*overdiagnosis*“) i posledično preteranog tretmana (eng. „*overtreatment*“) KP (2,3).

PROSTATSERBIA

Do danas nisu otkriveni pouzdani tumor markeri i prognostički parametri KP koji bi se koristili za preciznu procenu rizika za progresiju tumora kod ranodijagnostikovanih KP. Upravo zbog toga, otkriće novih bioloških markera KP ostaje jedan od glavnih izazova savremene urološke onkologije i translacione medicine. To je bio motiv da se u okviru Centra za humanu molekularnu biologiju (CHMG) formira grupa istraživača koji bi za temu svog istraživačkog rada imali otkriće potencijalno novih bioloških markera koji bi se, nezavisno ili sa standardnim prognostičkim parametrima, koristili kako u dijagnostici tako i u proceni biološke aktivnosti i rizika od pojave invazivnog fenotipa kod ranodijagnostikovanih KP.

Istraživački tim dobija ime *PROSTATSERBIA* (akronim engleskog imena *Single nucleotide polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population*) i postaje član međunarodnog *PRACTICAL consortium* (eng. *The Prostate Cancer Association Group to Investigate Cancer Associated Alterations in the Genome, PRACTICAL*) (<http://practical.icr.ac.uk>).

U periodu od 2010. do 2020. godine, u saradnji sa Klinikom za urologiju Kliničko-bolničkog centra "Dr Dragiša Mišović" i Kliničkog odeljenja za urologiju Kliničko-bolničkog Centra "Zvezdara" formirana je kolekcija bioloških uzoraka (periferni krvi i bukalnih briseva) i baze podataka za preko 1200 muškaraca sa teritorije Republike Srbije i to kako bolesnika sa KP i benignom hiperplazijom prostate (eng. *Benign prostatic hyperplasia*, BPH), tako i muškaraca bez znakova bolesti prostate. U formiranim grupama, prosečna starost bolesnika sa KP bila je 69.91 godina, kod bolesnika sa BPH iznosila je 68.10 godina, dok je u grupi muškaraca bez znakova bolesti prostate (kontrolna grupa) ona iznosila 69.11 godina. U bazi podataka za svakog bolesnika ponaosob nalazi se informacija o starosnoj dobi, datumu dijagnostikovanja bolesti i preoperativne serumske vrednosti PSA, određivane standardnim protokolom korišćenjem monoklonskog imunoeseja *Hybritech* metodom (*Beckman Hybritech assay Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Kalifornija, SAD*). Prilikom dijagnostikovanja KP određivan je i klinički stadijum primarnog tumora po TNM klasifikaciji. Za bolesnike kod kojih je učinjena biopsija prostate nalaze se podaci o pato-histološkoj dijagnozi i vrednosti GG. Baza podataka sadrži i informaciju o eventualnom postojanju metastaza u trenutku dijagnostikovanja KP.

Prema kriterijumima Evropskog udruženja urologa (eng. *European Association of Urology*, EAU), formirane su tri grupe bolesnika sa KP na osnovu serumske vrednosti PSA: prvu grupu činili su bolesnici sa serumskim vrednostima PSA manjim od 10 ng/ml, drugu grupu bolesnici sa serumskim vrednostima PSA u granicama od 10 do 20 ng/ml i treću grupu činili su bolesnici sa serumskim vrednostima PSA većim od 20 ng/ml. Bolesnici sa KP podeljeni su i u tri grupe prema vrednostima GG: prvu sa GG manjim od 7, drugu sa GG=7 i treću sa GG većim od 7. Na osnovu kliničkog stadijuma primarnog tumora, bolesnici su svrstavani u grupu sa stadijumom T1, grupu sa stadijumom T2 i grupu sa stadijumom T3 ili T4 primarnog tumora (2,3).

Na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara, bolesnici sa KP bili su, dalje, svrstavani u dve grupe: grupu sa niskim (GG manji od 7 i klinički stadijum primarnog tumora T1 ili T2) i grupu sa visokim rizikom (GG veći ili jednak 7 ili stadijum primarnog KP T3 ili T4, ili prisustvo metastaza u kostima) za progresiju bolesti. Bolesnici sa metastazama, bez obzira na vrednosti standardnih prognostičkih parametara, svrstavani su u grupu bolesnika sa visokim rizikom za progresiju KP (2).

Podela bolesnika prema procenjenom riziku za progresiju KP nema samo istraživački značaj. Bolesnicima sa niskim rizikom za progresiju KP, naročito onima u mlađem životnom dobu, danas se sve češće preporučuje aktivno praćenje bolesti umesto hirurškog lečenja neposredno nakon dijagnostikovanja tumora (3).

U formiranoj grupi bolesnika iz Republike Srbije, za skoro 60% bolesnika sa KP procenjen je visok rizik za progresiju bolesti, dok je kod više od 15% bolesnika, u trenutku dijagnostikovanja bolesti, detektovano i prisustvo udaljenih metastaza. Ovaj podatak je alarmantan po javno zdravlje građana naše zemlje i sugeriše neophodnost pojačanog informisanja muškaraca o značaju preventivnih pregleda prostate i uspešnosti lečenja ranodijagnostikovanih KP. Mesec novembar je mesec raka prostate i to je jedna od prilika da što veći broj muškaraca, naročito onih starijih od 50 godina, iskoriste pogodnost organizovanih pregleda urologa i određivanja serumske vrednosti PSA kao tumor markera KP.

Na formiranoj kolekciji bioloških uzoraka sprovedene su studije asocijacije kreirane kao studije slučajeva i kontrola. Korišćene metode genotipizacije bile su:

- Polimorfizmi u dužini restrikcionih fragmenata (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) prethodno umnoženih metodom lančane reakcije polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR);
- Analiza kriva topljenja visoke rezolucije (High Resolution Melting Analysis, HRMA),
- PCR specifičan za alel (eng. Allele-specific PCR);
- Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. real-time PCR) uz upotrebu specifičnih proba (Primerdesign Ltd, Southampton, Velika Britanija);
- Upotreba TaqMan eseja za genotipizaciju polimorfizama (eng. Taqman® SNP Genotyping Assay)(Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD); i
- Metoda Sangerovog sekvenciranja korišćenjem automatskog sekvencatora.

Studije su podrazumevale i proveru rezultata genotipizacije za sve analizirane genetičke varijante (GV) metodom Sangerovog sekvenciranja.

Provera kvaliteta rezultata genotipizacije, kao i pravilne selekcije i genetičke strukture kontrolne grupe podrazumevala je analizu prisustva Hardy-Vainbergove ravnoteže u različitim grupama ispitanika. Analiza prisustva Hardy-Vajnbergove ravnoteže sprovedena je zasebno za grupu uzoraka poreklom od bolesnika sa KP i BPH, i grupu uzoraka poreklom od muškaraca bez znakova bolesti prostate (kontrolna grupa). Za navedene analize korišćen je egzaktni test u okviru softverskog paketa *SNPStats* (*Catalan Institute of Oncology*, Španija). Nakon provere potencijalnog odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže, testirana je asocijacija GV sa rizikom za pojavu i progresiju KP, kao i sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP. Primenjivani statistički testovi asocijacija zasnovani su na logističkoj regresiji, a kao mera asocijacije određenog alela ili genotipa sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP korišćen je odnos šansi (eng. *Odds Ratio*, OR). Statistički značajnim rezultatima smatrani su oni za koje je dobijena P vrednost manja od 0,05. P vrednosti $\geq 0,05$ i manje od 0,1 smatrane su statističkim trendom asocijacije. Korišćeni genetički modeli bili su: kodominantan, recesivan, dominantan, overdominantan i log-aditivni. Za procenu genetičkog modela koji najbolje odgovara uočenim razlikama u raspodeli genotipova između poređenih grupa korišćen je Akaike informacioni kriterijum (eng. *Akaike information criteria*, AIC)(4,5).

Dobijene rezultate genotipizacije, odnosno utvrđenih asocijacija, kada je to bio moguće, dodatno smo potvrđivali i meta-analizama. Analiza heterogenosti rezultata studija i meta-analize za pojedinačne grupe sprovedene su pomoću statističkog softvera *OpenMeta-analyst* (*Tufts Medical Center*, SAD)(6). Kohranov Q statistički test korišćen je u kombinaciji sa određivanjem indeksa nedoslednosti (eng. *inconsistency index*, I^2) za analizu heterogenosti rezultata studija. Heterogenost rezultata studija smatrana je značajnom u slučajevima kada je P vrednost bila manja od 0,1. Ukoliko nije bila pokazana značajna heterogenost rezultata studija i panela, korišćen je model fiksiranog efekta (eng. *fixed-effect model*), dok je prisustvo značajne heterogenosti uslovljavalo korišćenje modela neuređenih efekata (eng. *random-effects model*). Vrednosti OR i njihovih 95% CI izračunate su za svaku genetičku varijantu korišćenjem jednog od ova dva modela (7). Za model neuređenih efekata korišćen je metod koji su predložili DerSimonian i Laird (8). Na osnovu rezultata pojedinačnih studija uključenih u meta-analizu u vidu vrednosti OR i njihovih 95% CI konstruisani su "Šumski dijagrami" (eng. *Forest plots*). Za svaku meta-analizu izračunavane su P vrednosti, a kao prag statističke značajnosti korišćena je P vrednost od 0,05. Zasebne meta-analize sprovedene su za dominantni, recesivni i overdominantni genetički model, kao i za efekte manje učestalosti alela genetičkih varijanti, njegovih homozigota i heterozigota. Kao referentni genotip u navedenim poređenjima korišćen je homozigot učestalijeg alela ili učestaliji alel. Prisustvo greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija procenjavano je primenom Egerovog testa. Vrednost praga statističke značajnosti u Egerovom testu iznosila je 0,05 (9).

Osim studija slučajeva i kontrola i meta-analiza, sprovedena je i analiza statističkih epistatičkih interakcija između genetičkih varijanti, a čiji bi rezultati mogli usloviti uvođenje korekcija tokom konstruisanja algoritama za procenu rizika za razvoj i/ili progresiju KP baziranih na primeni biomarkera. S obzirom na to da statističke epistatičke interakcije mogu reflektovati realne biološke epistaze, navedena analiza ima potencijalni značaj i u identifikaciji biološki relevantnih interakcija između gena u procesima molekularne patogeneze KP. Rezultati genotipizacije, prethodno korišćeni u analizama genetičkih asocijacija, statistički su analizirani neparametarskom metodom redukcije dimenzionalnosti višestrukih faktora (eng. *Multifactor Dimensionality Reduction*, MDR), pri čemu su dobijeni rezultati ukazivali na odsustvo statističkih epistatičkih interakcija, sinergistički efekat ili redundantnost efekata odabranih genetičkih varijanti.

Poslednje tri godine, u izazovnim uslovima kovid pandemije, u saradnji sa Klinikom za urologiju Kliničkog Centra Srbije radimo na formiranju kolekcije bioloških uzoraka i baze podataka bolesnika sa KP i BPH sa ciljem istraživanja egzozoma kao potencijalnih bioloških markera KP. Cilj ovog ispitivanja je provera mogućnosti korišćenja egzozoma i njegovih bioloških makromolekula u tačnoj biopsiji KP.

Do danas, kolekcija sadrži po 35 bioloških uzoraka bolesnika sa KP i BPH. Metodologija istraživanja egzozoma podrazumeva korišćenje protočne citometrije i transmisione elektronske mikroskopije za izolaciju i karakterizaciju egzozoma. Nivo ekspresije odabranih molekula mikroRNK iz egzozoma određuje se metodom PCR-a u realnom vremenu. Za lokalizaciju odabranih egzozomalnih proteina koristi se metoda *immunogold* TEM a za određivanje nivoa njihove ekspresije *Western blot* analiza. Ovaj projekat izvodimo u saradnji sa Centrom za elektronsku mikroskopiju, Biološkog fakulteta, Odeljenjem za biohemiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" i Katedrom za biohemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Za statističku obradu rezultata dobijenih u analizi nivoa ekspresije mikroRNK i proteina koristimo neparametrijski test – *Mann-Whitney* test u *GraphPad Prism 8.0.2*. (*GraphPad Software Inc.*, Kalifornija, SAD).

Studija asocijacije genetičkih varijanti u genima za proteine (genima kandidatima) sa rizikom za razvoj i progresiju KP

Karcinom prostate predstavlja heterogenu grupu malignih tumora kod koji do sada nisu identifikovani geni kandidati čije se mutacije mogu „linearno“ i direktno dovesti u vezu sa KP (10). Naša strategija istraživanja odabranih gena kandidata bazirala se na poznatoj ulozi njihovih proteinskih produkata u održavanju tkivne homeostaze i posledičnoj ulozi u procesima neoplastične transformacije žlezdanog epitela prostate.

Signalni put posredovan azot monoksidom (NO) ima ulogu u regulaciji mikrocirkulacije kao i u procesima inflamacije, apoptoze i angiogeneze. Smanjenje u nivou proizvodnje azot monoksida dovodi do fenomena „vaskularnog starenja“. Vaskularno starenje je hronična vaskularna inflamatorna bolest povezana sa oksidativnim stresom i endotelnom disfunkcijom, što je u korelaciji sa procesima hiperplazije i neoplastične transformacije (11). Azot monoksid nastaje aktivnošću enzima azot-monoksid sintetaze (NOS; EC 1.14.13.39), koji katalizuje oksidaciju L-arginina u L-citrulin. Kod čoveka, tri gena kodiraju za tri izozima azot-oksida sintaze: neuronalnu (nNOS ili NOS1), citokinima indukovanu (iNOS ili NOS2) i endotelnu formu (eNOS ili NOS3) (12). U genu NOS3 identifikovan je veći broj GV koje su asociirane sa KP: -786T>C (rs2070744), 894G>T (rs1799983), -1468T>A, -922G>A, -764A>G, -714G>T, -690C>T, -649G>A i inserciono-delecioni polimorfizam označen kao 4a/b varijanta (u intronu 4) (13).

Rezultati naše studije slučajeva i kontrola pokazali su da GV 894G>T, -786T>C i -690C>T mogu predstavljati prognostičke markere rizika za progresiju KP (14). U sprovedenoj meta-analizi koja je obuhvatala 11 studija sa 3.806 slučajeva i 4.466 kontrola pokazano je da su -786T>C (rs2070744) i intronska varijanta 4a/b

asocirane sa rizikom za razvoj KP. Rezultati ove meta-analize takođe su pokazali da bolesnici koji su nosioci alela za intronske varijante 4a/b imaju povećan rizik za progresiju KP ka agresivnijoj formi tumora sa višim GG i T stadijumom bolesti. Zbirno, rezultati naših studija ukazuju na značaj GV u genu *NOS3* u procesima neoplastične transformacije žlezdanog epitela prostate (15).

Gen *KLK3* (eng. *Kalikrein Related Peptidase 3*, *KLK3*) kodira PSA, serinsku proteazu koja, preko sposobnosti remodelovanja ekstraćelijskog matriksa tkiva prostate, ima ulogu u procesima invazije KP (16). Protein *VAMP8* (eng. *Vesicle Associated Membrane Protein 8*) pripada porodici solubilnih receptorskih proteina osetljivih na N-etilmaleimid (eng. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors*, *SNA-REs*) i doprinosi Varburgovom efektu, važnom metaboličkom koraku tokom procesa neoplastične transformacije (17). Dosadašnja istraživanja pokazala su da protein *MDM4* (eng. *MDM4 Regulator of p53*, *MDM4*), protein-protein interakcijom sa ubikvitin-ligazom *MDM2*, ima sposobnost heterodimerizacije inaktivacije proteina *p53* i na taj način je uključen u proces neoplastične transformacije tkiva prostate (18). Kriterijum za odabir genetičkih varijanti *rs1058205* (u genu *KLK3*), *rs1010* (u genu *VAMP8*) i *rs4245739* (u genu *MDM4*) bio je taj da ove GV menjaju mesta vezivanja mikroRNK za transkripte ovih gena. Kod bolesnika iz populacije Srbije, rezultati studije slučajeva i kontrola pokazali su da je *rs1058205* asocirana sa sniženim serumskim vrednostima PSA i nižim kliničkim stadijumom KP. Varijanta *rs1010* asocirana je sa povećanim vrednostima GG i kliničkog stadijuma KP, dok je za varijantu *rs4245739* pokazana asocijacija sa povećanim vrednostima sva tri standardna prognostička parametra kod bolesnika sa KP u populaciji Srbije (19).

Studije asocijacije genetičkih varijanti odabranih na osnovu rezultata GWA studija sa rizikom za razvoj i progresiju KP

U prvoj deceniji ovog veka, zahvaljujući dostignućima genomike, istraživači su bili u prilici da kreiraju i sprovedu studije asocijacije na čitavom genomu – GWA studije (eng. *Genome Wide Associated Studies*, *GWASs*). Kada su bolesti čoveka u pitanju, cilj ovih studija je identifikacija novih GV asociranih sa rizikom za pojavu ili progresiju bolesti. Karcinom prostate bio je predmet preko 40 GWAS u kojima je identifikovano preko 170 GV asociranih sa KP (20). Prve GWAS identifikovale su regione „genskih pustinja“ hromozoma 8 i 17 u kojima su anotirane GV asocirane sa KP. To je bio kriterijum kojim smo izvršili prvi odabir GV za studije slučajeva i kontrola kod bolesnika sa KP u Srbiji (21). U dve paralelne studije analizirali smo moguću asocijaciju *rs1447295*, *rs4242382*, *rs6983267*, *rs7017300* i *rs7837688* u regionu 8q24, kao i *rs7501939* i *rs3760511* u regionu 17q12 sa KP. Za četiri od pet analiziranih GV u regionu 8q24 pokazana je asocijacija sa rizikom za razvoj KP kod muškaraca iz Srbije dok je za jednu (*rs1447295*) uočeno odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže kod bolesnika i sa KP i sa BPH (22). Za obe analizirane GV u regionu 17q12 pokazana je asocijacija sa rizikom za razvoj KP što je potvrđeno i rezultatima meta-analize. Pored rizika za razvoj KP, rezultati naše studije slučajeva i kontrola pokazali su povezanost *rs7501939* i *rs3760511* u regionu 17q12 sa rizikom za razvoj BPH kod muškaraca iz Srbije. Ovakav rezultat ukazuje da su u našoj populaciji ove dve GV asocirane i sa malignim i sa benignim tumorima prostate (23). Za dve genetičke varijante iz regiona 19p13 i 8q24, *rs3787016* (24) i *rs378854* (25), nije pokazana statistički značajna asocijacija ni sa rizikom za razvoj niti sa rizikom za progresiju KP kod bolesnika iz Srbije.

Studije asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj i progresiju KP

RNK interferencija predstavlja proces negativne regulacije ekspresije gena na posttranskripcionom nivou specifičan za sekvencu koji je posredovan ribonukleoproteinskim kompleksom označenim kao (RNK-

indukovani) utišavajući kompleks (eng. *RNA-induced Silencing Complex*, RISC) (26). Treba jasno razlikovati RNK interferenciju od epigenetičkih mehanizama regulacije ekspresije gena. Epigenetička regulacija ekspresije gena bazira se na kovalentnim modifikacijama molekula DNK i histonskih proteina sa malim molekulima, najčešće metilacijom i acetilacijom. RNK interferencija i epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije čine mrežu regulatornih puteva koji određuju obrazac ekspresije genoma na tkivno- i razvojno-specifičan način (27).

Poznato je već deset godina da promene u strukturi ili nivoima ekspresije nekodirajućih molekula RNK imaju ulogu u procesima molekularne patogeneze KP. To je razlog što se molekuli mikroRNK godinama istražuju kao mogući dijagnostički i prognostički biološki tumor markeri, kao i ciljani molekuli novih strategija lečenja KP (28). Istraživačka grupa PROSTATSERBIA prva je publikovala rezultate ispitivanja asocijacije GV u genima za mikroRNK i u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa KP u jednoj Evropskoj populaciji (29).

Osnovni kriterijum za odabir GV za ovu studiju bio je njihov potencijalni funkcionalni značaj. Genetičke varijante u genima za mikroRNK birane su za analizu ukoliko su ispunjavale minimum tri, od sledeća četiri kriterijuma: a) potvrđena asocijacija GV sa KP u drugim populacijama; b) potvrđena asocijacija sa rizikom za razvoj i/ili progresiju drugih malignih tumora čoveka; c) pokazana izmenjena ekspresija gena u malignim ćelijama u odnosu na neizmenjene ćelije žlezdanog epitela prostate; i d) GV nalaze se u genima za mikroRNK koje utiču na androgenu signalizaciju.

Rezultatima naše prve pilot studije utvrđena je asocijacija genetičke varijante rs2910164 u genu za miR-146a sa standardnim prognostičkim parametrima KP (30). Meta-analizom nije pokazana asocijacija rs2910164 sa rizikom za razvoj KP, ali je ustanovljena asocijacija sa rizikom za razvoj karcinoma mokraćne bešike, grlića materice, pluća, jetre, želuca, nazofaringealnog karcinoma i skvamoznog karcinoma grla (31).

Za genetičke varijante u genu za miR-27a nije ispitivana moguća asocijacija sa KP do publikovanja rezultata naše studije. Kriterijum po kome je GV rs895819 u genu *hsa-miR-27a* uvrštena u našu studiju slučaja i kontrola bio je taj da su dotadašnje studije na drugim malignim bolestima pokazale izrazitu asocijaciju ove GV sa rizikom za razvoj malignih tumora. U studiji asocijacije kod muškaraca iz Srbije, za manje učestali alel C varijante rs895819 u genu za *miR-27a* ustanovljena je asocijacija kako sa povećanim rizikom za razvoj KP, tako i sa kliničkim stadijumom primarnog tumora i sa rizikom za pojavu udaljenih metastaza. Istovremeno, utvrđena je asocijacija varijanti rs2910164 u genu *hsa-miR-146a*, rs3746444 u genu *hsa-miR-499* i rs895819 u genu za miR-27a sa rizikom za progresiju KP (32).

U sledećoj studiji, naša pažnja bila je usmerena na GV u genima za mikroRNK koje su locirane u regulatornim regionima sa mogućim efektom na procese obrade i transporta primarnih transkripata gena za mikroRNK (pri-mikroRNK). To su bile GV rs4938723, rs1076064 i rs4705342 u regulatornim regionima gena za miR-34b/c, miR-143/145 i miR-378. Rezultati naše studije pokazali su da je GV rs4705342 povezana sa rizikom za razvoj KP, dok su GV rs1076064 i rs4938723 asociirane sa standardnim prognostičkim parametrima koji ukazuju na potencijalni rizik za progresiju KP (33).

Odabrane GV u analiziranim genima za proteine utišavajućeg kompleksa (*DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* i *GEMIN4*) nisu pokazale asociiranost sa rizikom za razvoj KP. Za varijantu rs784567 u genu *TARBP2* ustanovljena je asocijacija sa serumskim vrednostima PSA, a za varijante rs3742330 u genu *DICER1* i rs4961280 u genu *AGO2* pokazana je asocijacija sa GG. Sa kliničkim stadijumom primarnog tumora utvrđena je asocijacija varijanti rs3742330 u genu *DICER1*, rs4961280 u genu *AGO2* i rs7813 u genu *GEMIN4*. Na kraju, za varijantu rs3742330 u genu *DICER1* pokazana je asocijacija sa rizikom za progresiju KP (34). Meta-analiza

pokazala je da rs1057035 u genu *DICER1* može predstavljati potencijalni biološki marker povezan sa rizikom za razvoj malignih bolesti (35), dok rs636832 i rs595961 u genu *AGO1* mogu predstavljati varijante predispozicije za određene tipove malignih tumora. Rezultati meta-analize pokazali su i da rs4961280 u genu *AGO2* nije asocirana sa rizikom za razvoj malignih bolesti (36).

Analiza statističkih epistatičkih interakcija između GV u genima za izabrane mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa koji su sa njima funkcionalno povezani nije pokazala efekat interakcija između testiranih GV na rizik za razvoj KP. S druge strane, značajan efekat na rizik za progresiju KP ustanovljen je u analizi koja je uključivala varijantu rs11614913 u genu za miR-196a2 u kombinaciji sa varijantama u genima za navedene proteine uključene u biosintezu i regulatornu funkciju molekula mikroRNK. Najadekvatniji model, prema rezultatima nevedenog testa, opisuje interakciju tri genetičke varijante: rs11614913 u genu za miR-196a2, rs7813 u genu *GEMIN3* i rs784567 u genu *TARBP2*. Biološki mehanizam kojim se objašnjavaju detektovane interakcije predstavlja proces biosinteze miR-196a2, a u kojem učestvuju oba analizirana protein-kodirajuća gena. U navedenu hipotezu o postojanju realnih bioloških interakcija koje se reflektuju na statističke epistaze uklapa se pretpostavljeni mehanizam efekta rs11614913 na sekundarnu strukturu prekursora miR-196a2 (*unpublished data*).

Istraživanja moguće primene egzozoma kao bioloških tumor specifičnih markera KP

Egzozomi su vrsta ekstraćelijskih vezikula koje oslobađaju svi tipovi ćelija sisara. Egzozomi sadrže proteine, lipide, molekule RNK (iRNK, mikroRNK i duge nekodirajuće RNK), molekule DNK (fragmente genomske DNK, jednolančane DNK i mitohondrijske DNK) i metabolite koje su poreklom od ćelije iz kojih su „oslobođeni“ (37). Danas je poznato da egzozomi imaju značajnu ulogu u procesima inicijacije, rasta, invazivnosti i sticanja sposobnosti metastaziranja malignih tumora čoveka. Izmenjen nivo produkcije i makromolekulskog sadržaja egzozoma reflektuje patološke promene u tumorskim ćelijama od kojih vode poreklo (38). Ova činjenica ukazuje na moguću upotrebu egzozoma i bioloških makromolekula egzozoma kao novih biomarkera tečnih biopsija čija bi se analiza koristila u dijagnostici malignih bolesti (39).

Iz uzoraka seruma bolesnika sa KP i BPH uspešno smo izolovali i okarakterisali egzozome originalnom imunoafinitetnom metodom. Ova metoda bazira se na upotrebi polimetakrilamidnog matriksa, obeležjenog proizvedenim i prečišćenim nanotelima, koji prepoznaju specifične proteinske epitope na površini egzozoma (40). Egzozome poreklom od ćelija žlezdanog epitela prostate karakteriše i prisustvo membranskog proteina, membranski antigen specifičan za prostatu (eng. *Prostate-Specific Membrane Antigen*, PSMA). Dosadašnja istraživanja sugerišu moguću ulogu PSMA kao ciljanog molekula u strategijama razvoja novih generacija biološke terapije KP (41). Prisustvo PSMA na površini egzozoma iz seruma bolesnika sa KP dokazana je metodom *immuno-gold* TEM (*unpublished data*). Za analizu nivoa proteinske ekspresije koristi se *Western blot* metoda (42). Poslednjih nekoliko godina intenzivno se istražuje i moguća primena egzozomalnih mikroRNK kao bioloških markera progresije tumora u dijagnostici i aktivnom praćenju KP (43). U okviru aktuelne studije, određujemo nivo ekspresije *miR-21*, *miR-141* i *miR-375* iz izolovanih egzozoma seruma bolesnika sa KP i BPH metodom *real-time* PCR (44).

Autori su mišljenja da će analiza egzozoma i egzozomalnih bioloških makromolekula poreklom od KP imati značajnu ulogu u rasvetljavanju mogućnosti korišćenja egzozoma kao pouzdanih bioloških tumor markera u tečnim biopsijama KP.

Zahvalnica

Najveći deo istraživanja bio je finansiran u okviru projekta osnovnih istraživanja „Analiza promena u strukturi genoma kao dijagnostički i prognostički parametar humanih bolesti“ broj 173016 finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011 do 2019. I nakon ovog perioda, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije nastavlja sa finansiranjem preko bilateralnih ugovora sa Biološkim fakultetom Univerziteta u Beogradu (451-03-9/2021-14/200178). Deo istraživanja finansiran je i sredstvima CHMG, kao i finansijskom pomoći Biološkog fakulteta.

Autori rada duguju zahvalnost:

- za podršku i pruženu priliku pokojnoj prof. dr Stanki Romac osnivaču CHMG.
- za učešće u formiranju kolekcije uzoraka i banke kliničkih podataka prof. dr Vinki Vukotić, prof. dr Snežani Cerović, doc. dr Ivanu Vukoviću, dr sc dr. Nebojši Jeremiću i dr Nataši Filipović.
- za učešće u eksperimentalnom radu i drugim projektnim zadacima prof. dr Dušanki Savić-Pavićević, dr sc. Jovanu Mirčetiću, dr sc. Neveni Kotarac, dr sc. Aleksandru Kojiću, dr sc. Miši Vreći, dr sc Mihailu Mirkoviću, dr sc. Brankici Rašković, dr sc. Predragu Kalabi, dr sc. Biljani Ristić (ex Petrićević), dr sc. Stefanu Prekoviću, Stefanu Cidilku MSc, Ivanu Stankoviću MSc, Nikoli Nonkoviću MSc, Ani Vuković MSc i Anđeli Brančić MSc.
- za veliku podršku i svaku vrstu pomoći kolegama iz CHMG: prof. dr Dušanki Savić-Pavićević, dr sc. Jeleni Karanović, dr sc. Milošu Brkušaninu, doc dr. Jovanu Pešoviću i dr sc. Nemanji Vučiću.
- za pomoć oko “osvajanja” tačne biopsije dr sc. Sanji Kovačević i Lidiji Filipović MSc.
- Na kraju, najveću zahvalnost autori duguju prof. dr Aleksandri Korać na saradnji i dragocenim savetima oko kreiranja procedure karakterizacije i morfološke analize egzozoma. Metode TEM i *immuno-gold* TEM su nezaobilazne karike u analizi egzozoma i njegovih membranskih proteina

Literatura

1. 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; 71(3):209-49.
2. Cornford P, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II-2020 Update: Treatment of Relapsing and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2021; 79(2):263-82.
3. Hoffman RM, Mott SL, McDowell BD, Anand ST, Nepple KG. Trends and practices for managing low-risk prostate cancer: a SEER-Medicare study. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2022; 25(1):100-8.
4. Jolliffe I, Lovric M. International encyclopedia of statistical science. Principal Component Analysis. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg; 2011. p.1094–6.
5. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011; 6(2):121-33.
6. Wallace BC, Dahabreh IJ, Trikalinos TA, Lau J, Trow P, Schmid CH. Closing the Gap between Methodologists and End-Users: R as a Computational Back-End. *J Stat Softw.* 2012; 49(5).
7. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 22(4):719-48.
8. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials.* 1986; 7(3):177- 88.
9. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315(7109):629-34.
10. Bai B, Chen Q, Jing R, He X, Wang H, Ban Y, et al. Molecular Basis of Prostate Cancer and Natural Products as Potential Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Front Pharmacol.* 2021;12:738235.
11. Phua TJ. The Etiology and Pathophysiology Genesis of Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: A New Perspective. *Medicines (Basel).* 2021;8(6):30.
12. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298 (Pt 2):249-58.
13. Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2009; 30(4):621-5.
14. Branković A, Brajušković G, Nikolić Z, Vukotić V, Cerović S, Savić-Pavićević D, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(6):355-61.
15. Nikolić ZZ, Pavićević DLj, Romac SP, Brajušković GN. Genetic variants within endothelial nitric oxide synthase gene and prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Transl Sci.* 2015; 8(1):23-31.
16. Ding WH, Ren KW, Yue C, Zou JG, Zuo L, Zhang LF, Bai Y, Okada A, Yasui T, Mi YY. Association between three genetic variants in kallikrein 3 and prostate cancer risk. *Biosci Rep.* 2018; 38(6):BSR20181151.
17. Stegeman S, Amankwah E, Klein K, O'Mara TA, Kim D, Lin HY, et al. A Large-Scale Analysis of Genetic Variants within Putative miRNA Binding Sites in Prostate Cancer. *Cancer Discov.* 2015; 5(4):368-79.
18. Gansmo LB, Romundstad P, Birkeland E, Hveem K, Vatten L, Knappskog S, et al. MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk. *Cancer Med.* 2015; 4(12):1901-7.
19. Kotarac N, Dobrijevic Z, Matijasevic S, Savic-Pavicevic D, Brajuskovic G. Association of KLK3, VAMP8 and MDM4 Genetic Variants within microRNA Binding Sites with Prostate Cancer: Evidence from Serbian Population. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26(4):2409-23.
20. Benafif S, Kote-Jarai Z, Eeles RA; PRACTICAL Consortium. A Review of Prostate Cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018; 27(8):845-857.
21. Brajušković G, Nikolić Z, Branković A, Kotarac N, Savić-Pavićević D. Genetic basis of prostate cancer: Association studies. *Biologica Serbica* 2017; 39(1):40-5.
22. Branković AS, Brajušković GN, Mirčetić JD, Nikolić ZZ, Kalaba PB, Vukotić VD, Tomović SM, Cerović SJ, Radojičić ZA, Savić-Pavićević DL, Romac SP. Common variants at 8q24 are associated with prostate cancer risk in Serbian population. *Pathol Oncol Res.* 2013; 19(3):559-69.
23. Nikolić ZZ, Branković AS, Savić-Pavićević DL, Preković SM, Vukotić VD, Cerović SJ, Filipović NN, Tomović SM, Romac SP, Brajušković GN. Assessment of association between common variants at 17q12 and prostate cancer risk-evidence from Serbian population and meta—analysis. *Clin Transl Sci.* 2014; 7(4):307-13.

24. Nikolić ZZ, Brajušković GN, Pavićević DLj, Kojić AS, Vukotić VD, Tomović SM, Cerović SJ, Filipović V, Mišljenović D, Romac SP. Assessment of possible association between rs3787016 and prostate cancer risk in Serbian population. *Int J Clin Exp Med*. 2013;6(1):57-66. ISSN:1940-5901/IJCEM1210001.
25. Brajušković G, Nikolić Z, Kojić A, Savić-Pavićević D, Cerović S, Tomović S, Filipović N, Vukotić V, Romac S. Assessment of possible association between rs378854 and prostate cancer risk in Serbian population. *Arch Biol. Sci. Belgrade* 2013; 65(2):475-86.
26. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*. 2013; 42:217-39.
27. Bolton EM, Tuzova AV, Walsh AL, Lynch T, Perry AS. Noncoding RNAs in prostate cancer: the long and the short of it. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(1):35-43.
28. Bolton EM, Tuzova AV, Walsh AL, Lynch T, Perry AS. Noncoding RNAs in prostate cancer: the long and the short of it. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(1):35-43.
29. Nikolić Z, Savić-Pavićević D, Brajušković G. Genetic Association Studies on Prostate Cancer. In: Mohan R, editor. *Prostate Cancer - Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments*. InTECH, Rijeka; 2016. p.145-77.
30. Nikolić ZZ, Savić Pavićević DLj, Vukotić VD, Tomović SM, Cerović SJ, Filipović N, et al. Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control*. 2014; 25(11):1571-5.
31. Nikolić ZZ, Savić Pavićević DL, Vučić NL, Romac SP, Brajušković GN. Association between a Genetic Variant in the hsa-miR-146a Gene and Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis. *Public Health Genomics*. 2015; 18(5):283-98.
32. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, Cidilko S, Filipović N, Cerović S, et al. Assessment of association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499, hsa-miR-196a2 and hsa-miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population. *Exp Mol Pathol*. 2015; 99(1):145-50.
33. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, Cerović S, Vukotić V, Brajušković G. Genetic variants in RNA-induced silencing complex genes and prostate cancer. *World J Urol*. 2017; 35(4):613-24.
34. Kotarac N, Dobrijevic Z, Matijasevic S, Savic-Pavicevic D, Brajuskovic G. Analysis of association of potentially functional genetic variants within genes encoding miR-34b/c, miR-378 and miR-143/145 with prostate cancer in Serbian population. *EXCLI J*. 2019; 18:515-29.
35. Dobrijević Z, Matijašević S, Išić Denčić T, Savić-Pavićević D, Nedić O, Brajušković G. Association between genetic variants in DICER1 and cancer risk: An updated meta-analysis. *Gene*. 2021; 766:145132.
36. Dobrijević Z, Matijašević S, Savić-Pavićević D, Brajušković G. Association between genetic variants in genes encoding Argonaute proteins and cancer risk: A meta-analysis. *Pathol Res Pract*. 2020; 216(5):152906.
37. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016; 36(3):301-12.
38. Filipović L, Kojadinović M, Popović M. Exosomes and exosome-mimetics as targeted drug carriers: Where we stand and what the future holds?. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2022; 68.
39. Tatischeff I. Current Search through Liquid Biopsy of Effective Biomarkers for Early Cancer Diagnosis into the Rich Cargoes of Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(11):5674.
40. Filipović L, Spasojević M, Prodanović R, Korać A, Matijašević S, Brajušković G, et al. Affinity-based isolation of extracellular vesicles by means of single-domain antibodies bound to macroporous methacrylate-based copolymer. *N Biotechnol*. 2022;69:36-48.
41. Haberkorn U, Eder M, Kopka K, Babich JW, Eisenhut M. New Strategies in Prostate Cancer: Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Ligands for Diagnosis and Therapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(1):9-15.
42. Gligorovska L, Bursać B, Kovačević S, Veličković N, Matić G, Djordjevic A, et al. Mif deficiency promotes adiposity in fructose-fed mice. *J Endocrinol*. 2018;240(2).
43. Markert L, Holdmann J, Klinger C, Kaufmann M, Schork K, Turewicz M, et al. Small RNAs as biomarkers to differentiate benign and malign prostate diseases: An alternative for transrectal punch biopsy of the prostate? *PLoS One* 2021; 16(3):e0247930.
44. Bursac B, Djordjevic A, Velickovic N, Milutinovic D V, Petrovic S, Teofilovic A, et al. Involvement of glucocorticoid prereceptor metabolism and signaling in rat visceral adipose tissue lipid metabolism after chronic stress combined with high-fructose diet. *Mol Cell Endocrinol*. 2018; 476:110-8.

Uticaj tumorske mikrosredine na razvoj i progresiju maligniteta

Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Šelemetjev

Odeljenje za endokrinologiju i radioimunologiju, Institut za primenu nuklearne energije-INEP,

Univerzitet u Beogradu

Kontakt: tijana@inep.co.rs

Apstrakt:

Tumorska mikrosredina predstavlja specifično okruženje sastavljeno od okoloćelijskog matriksa i nemalignih elemenata kao što su krvni sudovi, fibroblasti i makrofagi. Ona se aktivno stvara od strane malignih ćelija i ima uticaj na njihovo ponašanje. Tumorski okoloćelijski matriks ima znatno izmenjene biofizičke i biohemijske osobine u odnosu na netumorsko tkivo, što posledično uzrokuje promene u ćelijskoj signalizaciji. Recipročna interakcija između tumorske ćelije i njenog okruženja je ključna za nastanak i progresiju maligniteta, orkestrirajući sve faze malignog procesa: epitel-mezenhimsku tranziciju, održavanje besmrtnosti maligne ćelije, neoangiogenezu, izbegavanje imunskog odgovora, formiranje metastaza i rezistenciju na hemoterapeutike. U ovom poglavlju daćemo pregled najvažnijih karakteristika tumorskog okruženja, i osvrnućemo se na najnovija saznanja o njihovom uticaju na malignu progresiju.

Ključne reči: maligna transformacija, okoloćelijski matriks, metastatska diseminacija

The effects of tumor microenvironment on malignancy formation and progression

Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Šelemetjev

Department for Endocrinology and Radioimmunology, Institute for the Application of Nuclear Energy - INEP,
University of Belgrade

Correspondence: tijana@inep.co.rs

Abstract:

The tumor microenvironment is a specific surrounding composed of extracellular matrix and non-malignant elements such as blood vessels, fibroblasts and macrophages. It is actively generated by malignant cells and has an influence on their behavior. The tumor extracellular matrix acquires altered biochemical and biophysical properties compared to healthy tissue, with many repercussions on cellular signaling. The mutual interaction between the tumor cell and its surroundings is crucial for the onset and progression of malignant tumors, orchestrating all phases of the malignant process: epithelial-mesenchymal transition, maintenance of cellular immortality, angiogenesis, avoidance of immune surveillance, formation of metastases, and resistance to therapeutics. In this chapter, we will review the most important features of the tumor microenvironment and revise the most recent understandings on its influence on malignant progression.

Key words: Malignant transformation, extracellular matrix, metastatic dissemination

UVOD

Poslednje dve decenije istraživanja biologije tumora svedočile su značajnoj promeni paradigme u suštinskom razumevanju procesa nastanka i evolucije maligniteta. Novopristigli podaci ukazuju da se tumor ne može posmatrati kao jednostavan skup pojedinačnih maligno transformisanih ćelija, i posledično, da se njegovo razumevanje ne može svesti na utvrđivanje njihovih genetičkih i molekularno bioloških osobina. Iako su genetske i epigenetske promene u epitelnoj ćeliji osnovni pokretač onkogenih procesa, neočekivani „saveznik“ u progresiji tumora predstavlja i njihov fiziološki relevantan okvir, tj. „**tumorska mikrosredina**“. Taj okvir se sastoji se od komponenata koje same po sebi nisu maligne: vezivnog tkiva, fibroblasta, krvnih sudova, infiltriranih elemenata imunog sistema i skupa različitih solubilnih molekula, uronjenih u okoćelijski matriks. Tumorska mikrosredina je u neprestanoj dinamičnoj i recipročnoj komunikaciji sa malignom ćelijom i utiče na njeno ponašanje. Pokazano je da interakcija između zdrave ćelije i izmenjene mikrosredine može da dovede do razvoja maligniteta. Takođe je pokazano da ćelije sa malignim genotipom mogu postati fenotipski normalne nakon odgovarajućih manipulacija mikrosredine [1-3]. Štaviše, eksperimentalni podaci ukazuju da tumorska mikrosredina učestvuje u svim fazama patogeneze tumora: diferencijaciji i sticanju osobina besmrtnosti, epitelno-mazenhimskoj tranziciji, vaskularizaciji, izbegavanju imunskog odgovora, odgovoru na terapije, prelasku invazivne ćelije u cirkulaciju, i konačno, ekstravazaciji i formiranju metastaza na sekundarnom mestu [1, 4].

Od svih komponenti tumorske mikrosredine upravo je **okoloćelijski matriks (ekstracelularni matriks, extracellular matrix, ECM)** dugo vremena zavređivao najmanje pažnje jer je kao trodimenzionalna mreža fibroznih proteina smatran pasivnim i stabilnim okvirom u kome obitavaju ćelije, sa čisto strukturnom, odnosno biomehaničkom ulogom. Danas se zna da je okoloćelijski matriks jedna izuzetno dinamična sredina koja obezbeđuje kontekstualne informacije odgovorne za kontrolu individualnog i kolektivnog ćelijskog ponašanja. Važno je istaći da je interakcija ćelije i matriksa recipročna. Ćelija, u zavisnosti od potreba, može da sintetiše ili razgrađuje matriks i da mu menja biohemijski sastav i fizičke osobine. Istovremeno, sve promene u matriksu kao rezultat ćelijske aktivnosti će zauzvrat uticati na ponašanje te i susednih ćelija. Tako ECM, sa jedne strane obezbeđuje oblik i potporu tkivu, ali takođe reguliše i identitet, poziciju, proliferaciju i sudbinu ćelija tog tkiva. Zbog toga, od momenta nastanka maligniteta, matriks povratnom spregom koevoluira sa malignom ćelijom: dok maligna ćelija menja matriks po svojim novonastalim potrebama, on aktivno doprinosi sticanju sve invazivnijeg fenotipa maligno transformisane ćelije, konstantno stimulišući rast, progresiju i širenje tumora.

OSOBINE TUMORSKOG MATRIKSA

Biohemijske osobine

Biohemijski gledano, za ECM se može reći da predstavlja trodimenzionalnu mrežu fibroznih proteina uronjenih u hidratizirani polisaharidni gel. Proteinska mreža matriksa, koja se još naziva i **matrizom**, sastoji se od oko 300 jedinstvenih molekula koji se sintetišu u fibroblastima i sekreću u intersticijalni matriks, a mogu se podvesti pod dve glavne grupe: strukturne proteine i glikozaminoglikane. ECM je takođe „lokalni depo“ za široki spektar malih solubilnih molekula koji direktno utiču na ponašanje ćelije. Ovaj raznoliki skup molekula sadrži citokine, nutrijente, hormone, faktore rasta, signalne i angiogenetske faktore, čija se veza-
nost za matriks, odnosno oslobađanje i dostupnost ćeliji, reguliše u zavisnosti od potreba. Pored toga, matriks je bogat i komponentama koje omogućavaju horizontalni transfer DNK: apoptotska tela, egzosome i vanćelijsku („slobodnu“) DNK [5]. Regulisanje dostupnosti ovih komponenti je razlog neprestanog lokal-

nog remodeliranja matriksa dok na makroskopskom nivou topologija tkiva ostaje nepromenjena. Ovo remodeliranje je strogo kontrolisano finom ravnotežom između sinteze, sekrecije, modifikacije i enzimske degradacije komponenata matriksa.

Maligna transformacija uzrokuje brojne promene u biohemijskim osobinama matriksa. Usled intenzivne proliferacije ćelija, i pojačane metaboličke aktivnosti tumor predstavlja hipoksičnu sredinu, dok intenzivirana glikolitička aktivnost uzrokuje nagomilavanje mlečne kiseline i sniženu pH vrednost mikrosredine. Obe ove osobine imaju bitne posledice na efikasnost hemoterapeutika i imunog sistema u borbi protiv karcinoma. Takođe, pod ovakvim uslovima fibroblasti prolaze kroz fenotipske promene i transformišu se u se u **kancer-vezane fibroblaste** (*Cancer associated fibroblasts*, **CAF**). Ovo je heterogena grupa ćelija čija je primarna uloga sinteza fibrilnih komponenti tumorskog matriksa, ali pored toga sintetišu i faktore rasta, citokine, hemokine, ekstraćelijske vezikule, proteine i enzime i imaju brojne uloge u malignoj progresiji [6-9].

Tumorski matriks, sintetisan od strane CAF, sadrži visoke koncentracije strukturnih i matricelularnih proteina u odnosu na zdravo tkivo. Matricelularni proteini su grupa ne-strukturalnih ECM proteina koji ispoljavaju svoju funkciju vezujući se za ostale ECM proteine, faktore rasta, citokine ili receptore na ćelijskim membranama, regulišući time proliferaciju i diferencijaciju ćelija, odnosno održavajući time homeostazu tkiva.

Stručna literatura je bogata podacima o prekomernoj ekspresijama strukturnih proteina i glikozaminoglikana koji potpomažu rast i širenje tumora, međutim, u svrhu ovog poglavlja istaći ćemo samo najvažnije:

Kolageni su glavna komponenta tumorske mikrosredine. Mnogi kolageni, uključujući kolagen I, II, III, V i IX pokazuju povećanu depoziciju i pravilniju linearizaciju u tumorskom nego u zdravom tkivu. Ovako organizovani kolageni mogu da formiraju svojevrsnu barijeru oko tumora štiteći ga od dejstva imunog sistema i terapeutika, a takođe promoviše i mobilnost malignih ćelija [8, 10].

Fibronektin je veliki multidomenski glikoprotein eksprimiran u velikom broju epitelijalnih maligniteta koji predstavlja svojevrsan ram za deponovanje ostalih komponenata matriksa i mesto vezivanja za male solubilne molekule matriksa. Pokazano je da fibronektin reguliše proliferaciju i motoričke sposobnosti ćelija, uglavnom posredstvom integrina [11].

Periostin je jedan od matricelularnih proteina sa multiplom funkcijom, čija ekspresija raste tokom maligne transformacije [12, 13]. Osnovna uloga periostina jeste strukturna organizacija ECM - periostin aktivira BMP-1 koji posledično aktivira lizil oksidazu (LOX). LOX je bakar-zavisni oksidativni enzim koji modifikuje organizaciju matriksa tako što povezuje kolagen i elastin, omogućavajući dodatno nakupljanje kolagena, što za posledicu ima povećanje čvrstine tkiva. Dodatno, periostin se vezuje za integrine na maligno transformisanim ćelijama, aktivirajući Akt/fosfo kinazni- i FAK-om posredovani signalni put, povećavajući time preživljavanje, invazivnost i metastatski potencijal maligno transformisane ćelije.

Fibroblast aktivirajući protein (*Fibroblast activating protein*, FAP) je enzim koji modifikuje matriks kontrolišući rast fibroblasta [14, 15]. U zdravom tkivu FAP se ne eksprimira, ali je njegovo prisustvo detektovano u preko 90% karcinoma.

Hijaluron, kao glavna polisaharidna komponenta ECM, kroz interakcije sa receptorima na membrani ćelija i vezujućim molekulima, ima esencijalnu ulogu u organizaciji arhitekture tkiva i regulaciji ćelijskih procesa, kao što su proliferacija i migracija [16, 17]. Hijaluron predstavlja miks polimera različite veličine. Veliki polimeri promovišu integritet tkiva i njegovo mirovanje, dok produkti manjih dužina pojačavaju signalnu

transdukciju, doprinoseći pro-onkogenim svojstvima ćelije. Hijaluron male molekulске mase ima angiogenetska svojstva, dok najkraći oligomeri hijalurona utiču na razvoj tumora. Ovako raznolik efekat čini uticaj hijalurona na razvoj tumora veoma kompleksnim. Poslednja istraživanja pokazuju da akumulacija hijalurona i hijaluronidaza u ECM, putem remodelovanja ECM i reprogramiranja ćelijskog metabolizma, može voditi razvoju karcinoma. Nađeno je da hijaluron povišen u karcinomu pankreasa.

Hondroitin sulfat (HS) je prirodni polimer i kao glavna aktivna komponenta hrskavičavog tkiva, reguliše viabilnost ćelija hrskavice i održava integritet tkivne strukture. HS može vezati razne citokine i faktore rasta, receptore na površini ćelija, adhezivne molekule, enzime i fibrilarne glikoproteine u ECM, utičući time na ponašanje ćelija, ali i na biofizičke i biohemijske osobine ECM. Uočena je korelacija nivoa HS sa pojavom agresivnih formi tumora i lošijom prognozom [18-20].

Matriksne metaloproteinaze (MMP), porodica enzima zaduženih za razgradnju većine elemenata matriksa, imaju povišenu ekspresiju u velikom broju karcinoma [21-23]. Ovi enzimi imaju višestruku ulogu u malignoj progresiji: prekidaju međućelijske veze, utiču na oslobađanje faktora rasta u ECM, pokreću epitelo-mezenhimsku tranziciju, fizički krče put pred ćelijom, razaraju bazalnu membranu i omogućavaju prelazak ćelija u cirkulaciju, učestvuju u ekstravazaciji i uspostavljanju mikrosredine povoljne za razvoj metastaza. Prekomerna ekspresija i enzimska aktivnost MMP je uočena u velikom broju epitelnih maligniteta.

Kaveolini pripadaju porodici integralnih membranskih proteina koji čine deo lipidnih raftova koji regulišu signalne puteve vezane za proliferaciju, preživljavanje i pokretljivost. Kaveolin je bitan aktivator Rho-ROCK signalnog puta koji reguliše ćelijske funkcije kao što su reorganizacija citoskeleta i aktivacija gena. Aktivacija Rho-ROCK je zavisna od integrina i aktivira usmereno kretanje ćelije kao i dodatno pravilno organizovanje elemenata matriksa, karakteristično za razvoj maligniteta. Deregulacija ekspresije kaveolina karakteristična je za brojne karcinome [24-26].

Sindekani (Synd) jesu heparan-sulfat proteoglikanski receptori, prisutni kako u stromalnim tako i u tumorskim ćelijama [27, 28]. Oni funkcionišu kao integrinski ko-receptori vezujući se za veliki broj ekstracelularnih molekula uključujući fibronektin, vitronektin, laminine i fibrilarne kolagene. Povezani su sa paralelnom organizacijom ECM fibrila i povećanom agresivnošću tumora [27, 28].

Biofizičke osobine

Biofizičke osobine ECM se odnose na prostorni raspored, gustinu i orijentaciju matriksnih filamenata, rigidnost, poroznost i solubilnost sredine, kao i sve ostale karakteristike koje obezbeđuju potporu, arhitekturu i integritet tkiva. One su strogo kontrolisane sastavom i koncentracijom matriksnih komponenti, kao i njihovim post-translacionim modifikacijama kao što su glikozilacija, transglutaminacija i kros-linkovanje.

U toku rasta tumora, ECM prolazi kroz značajno remodelovanje što rezultuje promenama u njegovim biofizičkim osobinama. Normalni ECM se razgrađuje i na njegovom mestu se sintetiše tumor-specifični ECM. Pored povećane depozicije matriksnih filamenata, tumorski matriks se razlikuje od zdravog i po njihovoj organizaciji. Nasumična organizacija filamenata kolagena je karakteristika zdravog tkiva, dok je dobro organizovana struktura gustih, paralelnih vlakana odlika tumorskog matriksa [8]. S obzirom da filamentu služe kao prirodan put kojim se ćelije kreću, njihova linearizacija olakšava integrinima posredovanu migraciju maligno transformisanim ćelijama. Nagomilavanje kolagena u procesu tumorigeneze je demonstrirano u više navrata, a na primeru kancera dojke i kolorektalnog karcinoma je pokazan i uticaj na tumorsku progresiju i formiranje metastaza [29, 30]. Prekomerne depozicije matriksnih fibrila dovode do povećanja intersticijalnog pritiska, rigidnosti i tenzija u tkivu i konačno, mehaničkog pritiska na ćeliju. Takođe, prekomerno ekspri-

mirani glikozaminoglikani, zbog svoje anjonske strukture privlače veliku količinu vode što dovodi do povećanja hidrostatskog pritiska tkiva [31], koji je neophodan za održavanje malignog fenotipa [32].

Ćelije „osećaju“, procesuiraju i reaguju na mehaničke stimuluse iz ECM putem promena u visoko koordinisanom mehanosenzorskom sistemu sastavljenom od adhezivnih receptora, citoskeletne mreže i molekularnih motora koji prenose mehaničke signale na konvencionalne signalne puteve [33]. Glavni protagonisti ovog procesa su fokalni adhezivni kompleks (FAK) i TGF- β (*Transforming growth factor- β*), oba proteina po višeno eksprimirana u većini epitelnih maligniteta [34–38]. Oni zajedno sa citoskeletom, jedarnom membranom i hromatinom čine sofisticiranu mehanosenzorsku mašineriju koja je u stanju da menja globalnu transkripciju ćelije. Na taj način mehanički stimuli mogu uticati na međućelijske interakcije, interakcije ćelije i ECM, kao i na osnovno ćelijsko ponašanje kao što je diferencijacija ili apoptoza koji su ključni za maligni proces. I drugi fizički parametri, poput promena u zapremini i obliku jedra ili celokupne ćelije, takođe mogu da izazovu aktivaciju mehanotransduktorskih puteva. Osim promena u ćelijskoj signalizaciji, povećane tenzije uzrokovane rigidnošću tumorskog matriksa mogu da uzrokuju otkrivanje kriptičnih signalnih peptida, poremećaje u receptor-ligand interakcijama, enzimskoj aktivnosti i radu jonskih kanala.

Ćelije karcinoma dojke reaguju proliferacijom na povećanu rigidnost matriksa usled pojačane Rho signalizacije i fosforilacije enzima fokalne adhezije kinaze. Povećani pritisak, od ~16 kPa u odnosu na normalno tkivo (0.38–7.33 kPa), uzrokuje pojačanu TGF- β i α -SMA signalizaciju što utiče na zdrave fibroblaste da se transformišu u CAF fibroblaste. Makrofagi u tim uslovima sekretuju više pro-inflamatornih molekula (TNF- α , NO, IL-1 β) doprinoseći lokalnoj inflamaciji, dok endokrine ćelije sintetišu proangiogenetske faktore (ANGPT2, FGF, IGF, IL, CSF, SDF1) [39].

Proteini YAP (*Yes associated protein*) i TAZ (*Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) odnedavno su priznati kao nova klasa medijatora mehanotransdukcije sa bitnim ulogama progresiji maligniteta [40–42]. Mehanički signali poreklom od povećane rigidnosti matriksa ili povećanog pritiska zbog prisustva intersticijalne tečnosti, podstiču translokaciju YAP i TAZ proteina u jedro, gde oni intereaguju sa transkripcionim faktorima, pospešujući time mobilnost i proliferaciju ćelije. Pokazano je da su YAP i TAZ nizvodni proteini Hippo signalnog puta, i da igraju bitnu ulogu u održanju stem ćelija, rastu organa i tumorigenezi.

ECM U TUMORIGENEZI

Uloga ECM u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji

Da bi ćelija poprimila invazivan fenotip, prvo mora da prođe proces **epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT)** [4, 43]. Ovo je morfološka promena u kojoj tumorska ćelija prelazi iz dobro diferenciranog epitelijalnog fenotipa u invazivniji mezenhimalni fenotip. EMT je reverzibilan proces, uzrokovan reprogramiranjem ekspresije gena i praćen mnogim strukturnim i funkcionalnim promenama, a posledica je gubitak polarnosti ćelije i zadobijanje migratornog fenotipa. Usled promena u globalnoj ćelijskoj transkripciji, dolazi do represije gena koji kodiraju proteine markere epitelnih ćelija, kao što su E-kadherin, okcludin i dezmozoplakin od strane pro-EMT faktora kao što je SNAIL, dok anti-EMT transkripcioni faktor TWIST uzrokuje povećanje ekspresije mezenhimalnih proteina kao što su vimentin i N-kadherin, kao i formiranje invadipodija, membranskih protruzija koje su bogate F-aktinom [2, 43, 44].

Tumorski matriks je izuzetno pogodna sredina za pokretanje EMT. Prekomerna ekspresija glikozaminoglikana i hijalurona može da pokrene EMT vezujući se za receptor CD44, dok je glikoprotein tenascin indukuje preko protoonkogenske tirozin kinaze Src [45]. EMT može da se pokrene usled gubitaka kontaktne

inhibicije u čemu veliku ulogu ima aktivnost ekstracelularnih matriksnih proteaza kao što su MMP koje direktno prekidaju međućelijske veze kao i usidrenoast ćelije u matriks. Takođe, iniciranje ovog procesa može biti posredovano faktorima rasta iz ECM kao što su faktor rasta hepatocita (HGF), transformišući faktor rasta- β (TGF- β), epidermalni faktor rasta (EGF), faktor rasta fibroblasta (FGF), i mnogim drugim matricelularnim proteinima [46]. Pored toga, pokazalo se da EMT može biti regulisana i drugim regulatornim molekulima kao što su mikroRNK (miR). Porodica miR koja uključuje miR-200a, miR-200b, miR-141 i miR-429 ima važnu funkciju u ovom procesu regulišući ekspresiju mRNK za ZEB1 i ZEB2 (*zinc-finger family E-box-binding homeobox factor*), transkripcionih represora koji stimulišu EMT [47].

EMT povećava mobilnost ćelije, njen kapacitet za migraciju i invaziju i plastičnost neophodnu za evoluciju maligne ćelije ka metastatskom fenotipu. Kroz EMT prolaze ćelije na invazivnom frontu karcinoma i tako postaju predvodnici klastera ćelija koje šire karcinom.

Uloga ECM u održavanju besmrtnosti ćelije

Većina populacija kancerskih ćelija se odlikuje postepenim sticanjem osobina koje vode ka njihovoj besmrtnosti, tj. sposobnosti beskonačne deobe. Proces ćelijske deobe je iniciran vezivanjem faktora rasta za receptore na ćelijskoj membrani ili adhezijom ćelije za komponente ECM putem integrina, što dovodi do aktivacije niza signalnih puteva. Tačna tranzicija iz G1 faze ćelijskog ciklusa u S fazu je ključna za kontrolu proliferacije eukariotskih ćelija, odnosno njena disregulacija vodi ka nemogućnosti zaustavljanja ćelijskog ciklusa [48-50]. G1/S tranzicija podrazumeva aktivaciju Ras i PI3K signalnih puteva, dovodeći do fosforilacije FAK i Erk proteina. Fosfo-ERK prelazi u jedro gde aktivira ciklin D koji onda „sakuplja“ inhibitore rasta CDK1 i CDK4. Sa druge strane, potpunom fosforilacijom FAK proteina, on se aktivira i pravi kompleks sa SRC proteinom. FAK/SRC kompleks olakšava ćelijsku pokretljivost. U odsustvu integrin posredovane adhezije ćelije za ECM, SRC i ERK signalizacija se ne pokreće, a nivo supresora ćelijskog ciklusa, kao što je p27, ostaje visok, što vodi nekontrolisanoj deobi ćelije [51].

Mnoge maligno transformisane ćelije sekretuju sopstvene ECM ligande ili imaju ligirane integrine, i tako izbegavaju proliferativnu supresiju. Takođe, ćelije koje interaguju sa ECM veće kompaktnosti, kao što je tumorski matriks, imaju veće proliferativne sposobnosti zbog konstantne aktivacije signalnih puteva koji vode povećanoj ekspresiji molekula karakterističnih za preživljavanje (kao što su Bcl-2, FLIP faktor, NF- κ B), i smanjenoj ekspresiji tumor supresora (kao što je protein p53), obezbeđujući time njihovo preživljavanje [52]. Povećana rigidnost matriksa indukuje i ekspresiju onih miR koje smanjuju ekspresiju tumor supresora PTEN i pojačavaju PI3K/Akt aktivnost, čime se dodatno pospešuje ćelijski rast i preživljavanje [53].

Još jedan od načina kojim maligne ćelije stiču osobine besmrtnosti je izbegavanje ćelijske smrti u uslovima gubitka kontakta ćelije sa matriksom, tj. supresija anoikisa. Pored anoikisa, maligne ćelije su sposobne da izbegnu programiranu smrt inhibicijom apoptoze. Apoptoza je proces regulisan balansom pro- i antiapoptotskih proteina koji u procesu maligne transformacije favorizuje preživljavanje ćelije [54, 55]. Zbog neadekvatne aktivacije ćelija imunog sistema, tumorski matriks sadrži nizak nivo liganada za tzv. površinske „receptore smrti“, što direktno inhibira programirani ulazak u ćelijsku smrt. Adhezija maligne ćelije može da inaktivira proapoptotske molekule (kao što je Bax), i indukuje ekspresiju anti-apoptotskih gena (kao što je Bcl2). Takođe, vezivanjem laminina za integrine u maligno izmenjenom ECM omogućava se stalna aktivacija i produkcija epidermalnog faktora rasta (EGFR) i stimuliše proinflamatorni NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) signalni put, čime se maligno transformisanoj ćeliji dodatno omogućava preživljavanje bez usidrenja u ECM.

Nemogućnost zaustavljanja ćelijskog ciklusa i izbegavanje programirane ćelijske smrti dovode do be-

skonačne deobe ćelija, što daje vreme i „ćelijski materijal“ za akumulaciju novih mutacija, formiranje krvnih sudova i sticanje sve više invazivnih karakteristika na putu ka metastatskoj diseminaciji.

Uloga ECM u angiogenezi

Budući da ga čine metabolički izuzetno aktivne ćelije kojima se rapidno povećava broj, tumorsko tkivo ima povećanu potrebu za nutrijentima, kiseonikom, metabolitima, hemijskim medijatorima i transportom metaboličkog otpada. Zbog toga je neovaskularizacija tj. stvaranje novih krvnih sudova na već postojećoj cirkulatornoj mreži, važan aspekt rasta i razvoja tumora većih od 1-2mm. U uslovima lokalne hipoksije i povećane kiselosti sredine, dolazi do remećenja balansa nivoa proangiogenetskih (VEGF i bEGF) i anti-angiogenetskih faktora (trombospondin i endostatin) vezanih za matriks usled koga se pokreće proces stvaranja novih krvnih sudova na već postojećoj vaskularnoj mreži. Ovaj proces je poznat kao „**angiogenetski prekidač**“ [56-58].

Remodeliranje matriksa je neophodan proces za pokretanje angiogenetskog prekidača. Glavne komponente matriksa koje pospešuju angiogenezu su kolagen, laminin i fibronektin. Ovi medijatori angiogeneze svoju funkciju vrše preko arginin-glicin-asparaginska kiselina motiva koji se vezuju za integrine i pokreću dalju unutarćelijsku signalizaciju. Proangiogenetski faktori takođe stimulišu epitelne ćelije da produkuju i sekretuju enzime kao što su matriksne metaloproteinaze. One svojim proteolitičkim dejstvom menjaju dostupnost pro- i antiangiogenetskih komponenti ECM, oslobađaju prostor za stvaranje novih krvnih sudova, oslobađaju kriptična mesta na ECM proteinima koja su signali za proliferaciju endotelijalnih ćelija. Nasuprot MMP, njihovi tkivni inhibitori (TIMP-ovi), takođe vezani za komponente matriksa, inhibiraju neovaskularizaciju i tumorigenezu. Heparan sulfat glikozaminoglikani, kao komponente matriksa, imaju sposobnost da promovišu ili suprimiraju angiogenezu posredstvom VEGF signalnog puta, a takođe predstavljaju mesto vezivanja antiangiogenetskih faktora kao što je endostatin.

Nakon pokretanja angiogenetskog prekidača, aktivirane endotelne ćelije locirane na vrhovima kapilara rastu i luče kolagenaze, urokinaze i aktivatore plazminogena, što dozvoljava urastanje kapilara i širenje tumorskih ćelija u i kroz ECM, vezivnotkivnu stromu i u limfatične i vaskularne prostore.

Međutim, istraživanja su pokazala da „tumor pravi loše krvne sudove“, tj. da se tumorski krvni sudovi strukturalno i biološki razlikuju od zdravih krvnih sudova po poroznosti i brzini protoka krvi, onemogućavajući isporuku leka, promovišući fibrozu i izazivajući intravazaciju tumorskih ćelija, odnosno ulazak malignih ćelija u krvotok [56, 57].

Uloga ECM u izbegavanju imunskog odgovora

Na primeru nekoliko tumora je pokazano da povećana gustina i linearnost matriksnih komponenti kao i prisustvo CAF ćelija smanjuju mobilnost ćelija imunog sistema i predstavljaju fizičku barijeru za njihovu infiltraciju na mesto tumora [59, 60]. Zbog toga se u tumorskom tkivu imune ćelije uglavnom pozicioniraju u stromi a ne u blizini tumora što je inicijalno pokazano studijama mikroskopije, a kasnije potvrđeno na 3D ćelijskim modelima. Takođe, veliki matriksni proteini kao što su fibronektin i fibrin predstavljaju mesto vezivanja za citokine i integrine imunih ćelija što dodatno doprinosi njihovoj imobilizaciji. Članovi porodice galektina kojom je tumorski matriks bogat, ne samo da sprečavaju adheziju imunih ćelija za tumorski matriks, nego i vezuju proinflamatorne citokine kao što je CXCL9, sprečavajući stvaranje citokinskog gradijenta koji bi usmerio T ćelije ka mestu tumora [59].

Pored inhibicije mobilnosti, elementi tumorskog ECM i CAF ćelije takođe imaju negativan efekat na funkciju imunskih ćelija. Efekat na mijeloidne ćelije (neutrofili i makrofagi) se ogleda u pogrešnom usmera-

vanju njihove polarizacije ka imunosupresivnom fenotipu M2, dok je u limfoidnoj liniji (T-limfociti) sprečena ćelijska aktivacija. Pokazano je da T ćelije gajene u uslovima povećane matriksne gustine pokazuju smanjenu sposobnost proliferacije, deregulaciju gena odgovornih za citotoksični efekat, a takođe im je smanjena mogućnost prezentacije antigena od strane dendritičnih ćelija [60].

Uloga ECM u formiranju metastaza

Metastaziranje se definiše kao širenje ćelija kancera od primarnog tumora i stvaranje sekundarnog depozita na udaljenoj lokaciji. Iako su metastaze glavni uzrok smrti pacijenata obolelih od kancera, pokazalo se da je metastaziranje prilično neefikasan proces koji se sastoji od niza kompleksnih i uzastopnih koraka, a kancerske ćelije moraju uspešno da savladaju svaki korak u toj kaskadi kako bi došlo do stvaranja metastatskog tumora [4]. Metastatska kaskada uključuje: invaziju (proboj bazalne membrane od strane tumorskih ćelija), intravazaciju (ulazak malignih ćelija u krvotok), preživljavanje u cirkulaciji (rasejavanje tumorskih ćelija kroz cirkulaciju), ekstravazaciju (izlazak malignih ćelija na sekundarnom mestu) i kolonizaciju (formiranje metastaza).

Procenjeno je da manje od 1% ćelija primarnog tumora puštenih u cirkulaciju uspeva da kolonizuje sekundarna mesta [61], a uzroci uspeha (ili neuspeha) metastatskog procesa se često mogu naći u tumorskoj mikrosredini. Pre svega, u cirkulaciji ćelije mogu biti ubijene usled samog stresa ili od strane imunog sistema. Takođe, mali je broj receptivnih niša odgovarajućih karakteristika na sekundarnim mestima koje bi prihvatile diseminisane ćelije. Dodatno, procena je da od ukupnog broja rasejanih ćelija jako mali broj njih (oko 0.02% u zavisnosti od korišćenog eksperimentalnog modela), biva sposoban da se naknadno aktivira, odnosno da se umnožava i stvori makroskopske tumore [61].

Prvi korak u metastatskoj kaskadi je proboj bazalne membrane. Bazalna membrana je specijalizovana vrsta ECM debljine 50 do 100 nm, veće kompaktnosti i manje poroznosti od intersticijalnog matriksa u koju su „usidrene“ epitelijalne ćelije. Kako su pore bazalne membrane nanometarske veličine, ona predstavlja barijeru za migratornu ćeliju. Tako, za inicijaciju invazije neophodno je remodeliranje ili potpuni gubitak bazalne membrane. Za narušavanje integriteta bazalne membrane u tumoru prvenstveno su odgovorne matriksne metaloproteinaze koje degradiraju kolagen IV i laminin, njene glavne komponente. Zbog toga je tumorska bazalna membrana tanja i poroznija od zdrave. Sa postepenim gubitkom bazalne membrane, ćelije koje je podržavala gube kontaktnu inhibiciju, apiko-bazalni polaritet i lakše ulaze u proces EMT [62-64].

Nakon lokalne invazije, dolazi do **intravazacije** koja podrazumeva prolazak metastatskih ćelija kroz zidove endotela i njihov ulazak u cirkulaciju u formi **cirkulišućih tumorskih ćelija** (*circulating tumor cells, CTC*). U ovoj fazi ćelije ulaze u sredinu koja je drastično drugačija od primarnog tumora i gde im preči uništenje zbog mehaničkog stresa, napada imunog sistema ili anoikisa. Zanimljivo je da cirkulišuće tumorske ćelije imaju povišenu ekspresiju gena za elemente ECM kao što su kolageni (Col1a2, Col3a1), TIMP-2, proteoglikan dekorin (*Dcn*), glikoprotein osteonektin (*Sparc*), i fibronektin. Ćelije mogu da migriraju same ili u sklopu ćelijskih klastera koji sadrže nemaligne ćelije „pomagače“, fenotipski izmenjene od strane tumorskog matriksa: CAF fibroblaste i makrofage M2 fenotipa (**TAM** – *tumor associated macrophages*) [65, 66]. Iako su klasteri ređe prisutni od pojedinačnih CTC, oni su 20 – 50 puta efikasniji u formiranju metastaza [67]. Cirkulacija CTC u klasterima i sinteza elemenata matriksa ukazuje na funkciju u održavanju malignog potencijala ali i u obezbeđivanju zaštite od mehaničkog uništavanja i napada imunskog sistema.

Ekstravazacija je složen proces koji uključuje interakcije ligand-receptor, hemokine i cirkulišuće netumorske ćelije [68-71]. Da bi napustile cirkulaciju, CTC moraju da stupe u interakciju sa ECM endotela. Zau-

stavljanje ćelije u kapilarnoj mreži je posredovano $\alpha v\beta 3$ integrinom koji u cirkulaciji kompleksira sa fibronektinom iz plazme što omogućava vezivanje za endotelni matriks. Nakon toga, maligna ćelija mora da uništi integritet endotela degradacijom transmembranskih proteina kao što su kadherin, katenin i vinkulin. **Kolonizacija** sekundarnog mesta je poslednji korak u progresiji malignog tumora i zavisi od sposobnosti kancerskih ćelija da se prilagode svojoj novoj mikrookolini. Ovo je izuzetno neefikasan proces jer su svega 0.1% CTC sposobne da kolonizuju sekundarno mesto. Interakcije između tumorskih ćelija i ćelija sekundarnog mesta kao i uspostavljanje vaskularne mreže su važni faktori za uspešnu metastatsku kolonizaciju [72]. Mehanizam kojim ćelija "bira" mesto metastaze nije u potpunosti razjašnjen. Smatra da primarni tumori mogu indukovati stanja u udaljenim organima koja favorizuju preživljavanje kancerskih ćelija, tj. unapred pripremiti tzv. „**premetastatsku nišu**“. Ovo se postiže tako što primarni tumor otpušta različite faktore u cirkulaciju koji modifikuju udaljenu mikrosredinu kako bi bila receptivna za CTC i omogućila kolonizaciju. Ovi faktori uključuju proinflamatorne citokine, matricelularne proteine i faktore rasta, kao i vanćelijske vezikule, ćelije poreklom iz koštane srži koji zajedno indukuju vaskularno curenje, preuređivanje ECMA i imunosupresiju [73, 74].

Izmenjeni makrofazi (TAM) su jedan od glavnih faktora koji učestvuju u stvaranju pre-metastatske niše [75, 76]. Tumorske ćelije luče faktore (CCL-2, VEGF, PLGF, CSF-1, TNF- α , TGF- β , i TIMP-1) koji podstiču odlazak TAM u krvotok i njihovo zadržavanje u pre-metastatskoj niši. Grupisanje makrofaga na sekundarnom mestu je tumorskim ćelijama oznaka za nakupljanje. TAM proizvode hemokin stromalni faktor 1 (*Stromal derived factor 1*, SDF-1) koji podstiče migraciju tumorskih ćelija i njihov rast, kao i angiopoetin-1 koji podstiče adheziju tumorskih ćelija na endotel. TAM proizvode i MMP, integrine i lizil oksidaze (*Lysyl oxidase*, LOX) u svrhu remodeliranja ECMA na mestu buduće metastaze. Modeliranje ECM je još jedan od načina kojima se tumorske ćelije usmeravaju na pre-metastatsko mesto jer ćelije primarnog tumora proizvode osteopontin i druge faktore kako bi regrutovali granulin ekspimirajuće hematopoetske ćelije koje onda menjaju ponašanje strome na udaljenim mestima [77]. Ćelije kancera dojke proizvode povišene nivoe TNC što promoviše metastatsku kolonizaciju pluća [78]. Povećana ekspresija MMP-9 u plućima indukovana je signalima iz udaljenog primarnog tumora [79]. Takođe, postoje indicije da je mesto metastaze predeterminisano setom hemokina koje sekretuju CTC, odnosno da se ćelija zaustavlja na mestu koje eksprimira receptore za njene hemokine. Tako ćelije karcinoma dojke koje ekspimiraju CXCR4 će metastazirati u tkiva koja ekspimiraju njegov ligand SDF-1 [80].

Sudbina metastatske ćelije nakon dolaska do sekundarnog mesta može ići u tri pravca: ćelije mogu da proliferišu i formiraju mikrometastaze (1-2mm), mogu da umru, ili mogu da budu žive ali uspavane [81, 82]. Stvaranje novih kolonija može se desiti u toku samo nekoliko dana u eksperimentalnim modelima, ali kod humanih tumora ovaj proces može zahtevati mesece, čak i godine. Uloga ECM u metastatskom procesu je značajna, posebno za započinjanje i održavanje rasta metastatskih ćelija, ali i za održavanje uspavanosti tumorskih ćelija na sekundarnoj lokalizaciji. Pretpostavka je da ćelije tumora nastanjuju metastatska mesta dok je primarni tumor još uvek prisutan, ali ostaju u stanju mirovanja (uspavanosti) tokom dužeg vremenskog perioda i ponovo se aktiviraju u nekoj kasnijoj fazi, verovatno kao rezultat promena u lokalnoj mikrookolini, odnosno u ECMu. U koliko ove mikrometastaze počnu da proliferišu, njihova sudbina takođe može ići u tri pravca: ćelije mogu da nastave sa proliferacijom i da formiraju vaskularizovane makrometastaze, mogu da umru ili mogu da nastave život kao uspavane mikrometastaze. Uspavanost na ovom nivou je rezultat balansa između proliferacije i apoptoze u okviru ćelijske populacije tako da ne dolazi do uvećanja veličine mikrometastaze [81, 83]. Smatra se da je ovaj tip uspavanosti rezultat nemogućnosti stimulacije angiogeneze koja je potrebna za dalji rast tumora, verovatno usled zaštitnih mehanizama mikrosredine koji sprečavaju uključivanje procesa angiogeneze.

UTICAJ ECM NA REZISTENCIJU NA HEMOTERAPEUTIKE

Distribucija hemoterapeutika u tumorskom tkivu se uglavnom odvija difuzijom. Akumulacija kolagena direktno sprečava prodor terapeutika do tumora. Pokazano je da prekomerna ekspresija LOX enzima koji kroslinkuju kolagen i elastin doprinoseći povećanju matriksne gustine negativno utiču na distribuciju terapeutika, dok njihova inhibicija 2-aminopropionitriлом preokreće ovaj efekat [84]. Povišena ekspresija ovih enzima je detektovana u rezistentnim karcinomima dojke, jajnika i kolorektalnog karcinoma. Fišer i saradnici su našli da je mezenhimalni fenotip ćelije kao posledica epitelomezehimске tranzicije rezistentan na ciklofosamid zbog pojačane ekspresije efleksnih pumpi (ABCC1, ABCB1) koje izbacuju lekove, kao i ekspresije enzima kao što je citohrom p450 koji te lekove metabolišu [85]. Hipoksija je takođe povezana sa rezistencijom na lekove jer mnogi lekovi kao i radijaciona terapija zahtevaju prisustvo kiseonika za maksimalan citotoksični efekat.

Dodatni problem u dostavljanju terapeutika na tumorsku lokaciju je cirkulatorna mreža tumorske mikrosredine. Tumorski krvni sudovi su heterogeni u pogledu organizacije, funkcije i strukture, a tumorska vaskulatura je nejednako distribuirana i haotična. Protok krvi kroz ove sudove nije ni konstantan, ni jednosmeran. Kroz otvorene krvne sudove perfuzija nije kontinualna; tokom svega nekoliko minuta protok krvi može krenuti u skroz drugom pravcu, pa čak i u suprotnom smeru u istom krvnom sudu. Sve ovo uzrokuje nepouzdan dotok terapeutika na ciljano mesto [56, 57].

CAF ćelije doprinose hemorezistenciji na nekoliko načina. CAF formiraju neku vrstu protektivne barijere koja štiti tumor od terapeutika kako fizičkom barijerom tako i protektivnom signalizacijom. PAI-1, citokin koji ove ćelije proizvode aktivira Erk/Akt signalni put i inhibira aktivnost kaspaze-3, neophodne za pokretanje apoptoze usled hemoterapijskog stresa [86]. Slično tome, interleukin 6 (IL6) takođe predominantno sintetisan od strane CAF indukuje ekspresiju CXCR7 direktno povezanog sa hemorezistencijom [87]. U hipoksičnim uslovima CAF proizvode visoke nivoe TGFβ, koji indukuje ekspresiju STEM osobina uključujući i hemorezistenciju [88].

ZAKLJUČAK

Iako smo shvatili da tumorska mikrosredina nije pasivna pozadina malignog procesa već njen aktivni učesnik, još mnogo toga je ostalo da se otkrije o njenoj ulozi. Izučavanje ECM u savremenim molekularno biološkim laboratorijama od velike je važnosti za fundamentalno razumevanje tumora, a dobijena saznanja mogu imati ogroman značaj u primenjenoj biomedicini. Akumulirana saznanja o alteracijama u biohemijskim i biofizičkim osobinama tumora u odnosu na zdravo tkivo omogućavaju otkrivanje novih biomarkera, specifičnih za vrstu ili uznapredovanost tumora. Dodatno, poznavanje načina na koji komponente ECM utiču na elemente malignog procesa doprinosi pronalasku novih kandidata za ciljanu anti-tumorsku terapiju.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući podršci Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-68/2022-14/200019.

LITERATURA

1. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3028. doi: 10.3390/ijms19103028.
2. Paolillo M, Schinelli S. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4947. doi: 10.3390/ijms20194947.
3. Tzanakakis G, Kavasi RM, Voudouri K, Berdiaki A, Spyridaki I, Tsatsakis A, et al. Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon. *Dev Dyn.* 2018;247(3):368-81. doi: 10.1002/dvdy.24557.
4. Majidpoor J, Mortezaee K. Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol.* 2021;38(1):3. doi: 10.1007/s12032-020-01447-w.
5. Karamanos NK. Extracellular matrix: key structural and functional meshwork in health and disease. *FEBS J.* 2019;286(15):2826-29. doi: 10.1111/febs.14992.
6. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):174-86. doi: 10.1038/s41568-019-0238-1.
7. Li Z, Sun C, Qin Z. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts and its effect on cancer cell reprogramming. *Theranostics.* 2021;11(17):8322-36. doi: 10.7150/thno.62378.
8. Piersma B, Hayward MK, Weaver VM. Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020;1873(2):188356. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188356.
9. Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(2):99-115. doi: 10.1038/s41573-018-0004-1.
10. Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med.* 2019;17(1):309. doi: 10.1186/s12967-019-2058-1.
11. Lin TC, Yang CH, Cheng LH, Chang WT, Lin YR, Cheng HC. Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. *Cells.* 2019;9(1):27. doi: 10.3390/cells9010027.
12. González-González L, Alonso J. Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression. *Front Oncol.* 2018;8:225. doi: 10.3389/fonc.2018.00225.
13. Liu Y, Huang Z, Cui D, Ouyang G. The Multiaspect Functions of Periostin in Tumor Progression. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1132:125-36. doi: 10.1007/978-981-13-6657-4_13.
14. Puré E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. *Oncogene.* 2018;37(32):4343-57. doi: 10.1038/s41388-018-0275-3.
15. Fitzgerald AA, Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39(3):783-803. doi: 10.1007/s10555-020-09909-3.
16. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules* 2020;10(11):1525. doi: 10.3390/biom10111525.
17. Caon I, Bartolini B, Parnigoni A, Caravà E, Moretto P, Viola M, et al. Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. *Semin Cancer Biol.* 2020;62:9-19. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.007.
18. Mellai M, Casalone C, Corona C, Crociara P, Favole A, Cassoni P, et al. Chondroitin Sulphate Proteoglycans in the Tumour Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1272:73-92. doi: 10.1007/978-3-030-48457-6_5.
19. Silver DJ, Silver J. Contributions of chondroitin sulfate proteoglycans to neurodevelopment, injury, and cancer. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;27:171-8. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.016.
20. Pantazaka E, Papadimitriou E. Chondroitin sulfate-cell membrane effectors as regulators of growth factor-mediated vascular and cancer cell migration. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(8):2643-50. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.009.
21. Marecko I, Cvejic D, Selemetjev S, Paskas S, Tatic S, Paunovic I, et al. Enhanced activation of matrix metalloproteinase-9 correlates with the degree of papillary thyroid carcinoma infiltration. *Croat Med J.* 2014;55(2):128-37. doi: 10.3325/cmj.2014.55.128.
22. Roncevic J, Djoric I, Selemetjev S, Jankovic J, Dencic TI, Bozic V, et al. MMP-9-1562 C/T single nucleotide polymorphism associates with increased MMP-9 level and activity during papillary thyroid carcinoma progression. *Pathology.* 2019;51(1):55-61. doi: 10.1016/j.pathol.2018.10.008.

23. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
24. Simón L, Campos A, Leyton L, Quest AFG. Caveolin-1 function at the plasma membrane and in intracellular compartments in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(2):435-53. doi: 10.1007/s10555-020-09890-x.
25. Ketteler J, Klein D. Caveolin-1, cancer and therapy resistance. *Int J Cancer*. 2018;143(9):2092-104. doi: 10.1002/ijc.31369.
26. Paskaš S, Janković J, Marečko I, Išić Denčić T, Tatić S, Cvejić D, et al. Caveolin-1 expression in papillary thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological parameters and BRAF mutation status. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;150(2):201-9. doi: 10.1177/0194599813512781.
27. Handra-Luca A. Syndecan-1 in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1272:39-53. doi: 10.1007/978-3-030-48457-6_3.
28. Teixeira FCOB, Götte M. Involvement of Syndecan-1 and Heparanase in Cancer and Inflammation. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1221:97-135. doi: 10.1007/978-3-030-34521-1_4.
29. Kehlet SN, Sanz-Pamplona R, Brix S, Leeming DJ, Karsdal MA, Moreno V. Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2016;6:30599. doi: 10.1038/srep30599.
30. Koorman T, Jansen KA, Khalil A, Houghton PD, Visser D, Rätze MAK, et al. Spatial collagen stiffening promotes collective breast cancer cell invasion by reinforcing extracellular matrix alignment. *Oncogene*. 2022;41(17):2458-69. doi: 10.1038/s41388-022-02258-1.
31. Voutouri C, Stylianopoulos T. Evolution of osmotic pressure in solid tumors. *J Biomech*. 2014;47(14):3441-7. doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.09.019.
32. Provenzano PP, Hingorani SR. Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(1):1-8. doi: 10.1038/bjc.2012.569.
33. Legerstee K, Houtsmuller AB. A Layered View on Focal Adhesions. *Biology (Basel)*. 2021;10(11):1189. doi:10.3390/biology10111189.
34. Golubovskaya VM, Kweh FA, Cance WG. Focal adhesion kinase and cancer. *Histol Histopathol*. 2009;24(4):503-10. doi: 10.14670/HH-24.503.
35. Ignjatović VB, Janković Miljuš JR, Rončević JV, Tatić SB, Išić Denčić TM, Đorić IĐ, et al. Focal adhesion kinase splicing and protein activation in papillary thyroid carcinoma progression. *Histochem Cell Biol*. 2022;157(2):183-94. doi: 10.1007/s00418-021-02056-y.
36. Šelemetjev S, Bartolome A, Išić Denčić T, Đorić I, Paunović I, Tatić S, et al. Overexpression of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, focal adhesion kinase, correlates with papillary thyroid carcinoma progression. *Int J Exp Pathol*. 2018;99(2):87-94. doi: 10.1111/iep.12268.
37. Caja L, Dituri F, Mancarella S, Caballero-Diaz D, Moustakas A, Giannelli G, et al. TGF- β and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1294. doi: 10.3390/ijms19051294.
38. Brier B, Moses HL. TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(1-2):29-40. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.006.
39. Emon B, Bauer J, Jain Y, Jung B, Saif T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:279-287. doi: 10.1016/j.csbj.2018.07.003.
40. Pocaterra A, Romani P, Dupont S. YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. *J Cell Sci*. 2020;133(2):jcs230425. doi: 10.1242/jcs.230425.
41. Zhang X, Zhao H, Li Y, Xia D, Yang L, Ma Y, et al. The role of YAP/TAZ activity in cancer metabolic reprogramming. *Mol Cancer* 2018;17(1):134. doi: 10.1186/s12943-018-0882-1.
42. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. 2016;29(6):783-803. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.005.
43. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014;7(344):re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189.
44. Hodoroğa A, Calinescu A, Antohe M, Balaban M, Nedelcu RI, Turcu G, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2019;2019:3851576. doi: 10.1155/2019/3851576.
45. Scott LE, Weinberg SH, Lemmon CA. Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:135. doi: 10.3389/fcell.2019.00135.

46. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-72. doi: 10.1038/cr.2009.5.
47. Korpai M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem.* 2008;283(22):14910-4. doi: 10.1074/jbc.C800074200.
48. Hume S, Dianov GL, Ramadan K. A unified model for the G1/S cell cycle transition. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(22):12483-12501. doi: 10.1093/nar/gkaa1002.
49. Icard P, Fournel L, Wu Z, Alifano M, Lincet H. Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. *Trends Biochem Sci.* 2019;44(6):490-501. doi: 10.1016/j.tibs.2018.12.007.
50. Wang Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells.* 2021;10(12):3327. doi: 10.3390/cells10123327.
51. Zhang C, Stockwell SR, Elbanna M, Ketteler R, Freeman J, Al-Lazikani B, et al. Signalling involving MET and FAK supports cell division independent of the activity of the cell cycle-regulating CDK4/6 kinases. *Oncogene.* 2019;38(30):5905-20. doi: 10.1038/s41388-019-0850-2.
52. Verzella D, Pescatore A, Capece D, Vecchiotti D, Ursini MV, Franzoso G, et al. Life, death, and autophagy in cancer: NF- κ B turns up everywhere. *Cell Death Dis.* 2020;11(3):210. doi: 10.1038/s41419-020-2399-y.
53. Ghafouri-Fard S, Abak A, Shoorei H, Mohaqiq M, Majidpoor J, Sayad A, et al. Regulatory role of microRNAs on PTEN signaling. *Biomed Pharmacother.* 2021;133:110986. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110986.
54. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2129-44. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.
55. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
56. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(9):1745-70. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.
57. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007;170(1):1-15. doi: 10.2353/ajpath.2007.060302.
58. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-364.
59. Gordon-Weeks A, Yuzhalin AE. Cancer Extracellular Matrix Proteins Regulate Tumour Immunity. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3331. doi: 10.3390/cancers12113331.
60. Mortezaee K. Immune escape: a critical hallmark in solid tumors. *Life Sci* 2020;118110.
61. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol.* 2016;43:7-13.
62. Kai F, Laklai H, Weaver VM. Force matters: biomechanical regulation of cell invasion and migration in disease. *Trends Cell Biol.* 2016;26(7):486-97.
63. Labernadie A, Kato T, Brugués A, Serra-Picamal X, Derzsi S, Arwert E, et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2017;19(3):224-37.
64. Glentis A, Oertle P, Mariani P, Chikina A, El Marjou F, Attieh Y, et al. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat Commun.* 2017;8(1):1-13. doi: 10.1038/s41467-017-00985-8.
65. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol* 2017;10(1):58.
66. Aras S, Zaidi MR. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *Br J Cancer.* 2017;117(11):1583-91.
67. Strilic B, Offermanns S. Intravascular survival and extravasation of tumor cells. *Cancer Cell.* 2017;32(3):282-93.
68. Osmani N, Follain G, García León MJ, Lefebvre O, Busnelli I, Larnicol A, et al. Metastatic tumor cells exploit their adhesion repertoire to counteract shear forces during intravascular arrest. *Cell Rep.* 2019;28(10):2491-500.e5 doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.102.
69. Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell adhesion and matrix stiffness: coordinating cancer cell invasion and metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:145.

70. Leong HS, Robertson AE, Stoletov K, Leith SJ, Chin CA, Chien AE, et al. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Rep.* 2014;8(5):1558–70. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.050.
71. Williams KC, Cepeda MA, Javed S, Searle K, Parkins KM, Makela AV, et al. Invadopodia are chemosensing protrusions that guide cancer cell extravasation to promote brain tropism in metastasis. *Oncogene.* 2019;38(19):3598–615. doi: 10.1038/s41388-018-0667-4.
72. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):1–17.
73. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):285–93. doi: 10.1038/nrc2621.
74. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11):1423–37. doi:10.1038/nm.3394.
75. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ breast cancer.* 2016;2(1):1–12.
76. Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(12):887–904.
77. Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, Nilsson B, Reinhardt F, Bray MA, et al. Human tumors instigate granulocyte-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(2):784–99. doi: 10.1172/JCI43757.
78. O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(38):16002–7. doi: 10.1073/pnas.1109493108.
79. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2002;2(4):289–300. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00153-8.
80. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004;6(1):17–32. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.010.
81. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):563–72. doi:10.1038/nrc865.
82. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998;153(3):865–73. doi:10.1016/S0002-9440(10)65628-3.
83. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1(2):149–53. doi:10.1038/nm0295-149.
84. Henke E, Nandigama R, Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci.* 2020;6:160. doi: 10.3389/fmolb.2019.00160.
85. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature.* 2015;527(7579):472–6.
86. Che Y, Wang J, Li Y, Lu Z, Huang J, Sun S, et al. Cisplatin-activated PAI-1 secretion in the cancer-associated fibroblasts with paracrine effects promoting esophageal squamous cell carcinoma progression and causing chemoresistance. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):759. doi: 10.1038/s41419-018-0808-2.
87. Qiao Y, Zhang C, Li A, Wang D, Luo Z, Ping Y, et al. IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2018;37(7):873–83. doi: 10.1038/onc.2017.387.
88. Tang YA, Chen YF, Bao Y, Mahara S, Yatim SMJM, Oguz G, et al. Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemoresistance in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(26):E5990–E5999. doi: 10.1073/pnas.1801348115.

Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnom karcinomu

Jovana Despotović

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,

Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Kontakt: jovanadespotovic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Kolorektalni karcinom predstavlja heterogenu bolest koja zauzima treće i drugo mesto na svetu po stepenu incidence i stopi mortaliteta, respektivno. Poznato je da mikroRNK molekuli imaju ključne uloge u procesu patogeneze, progresije i metastaziranja kolorektalnog karcinoma, ali i rezistenciji na hemioterapiju. U različitim tumorima je pokazano da hsa-miR-93-5p može imati onkogenu, ali i tumor-supresorsku ulogu. Ovaj rad ima za cilj da predstavi dosadašnja saznanja o ulozi hsa-miR-93-5p u procesima vezanim za kolorektalnu karcinogenezu, metastaziranje i odgovor na hemioterapiju kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Rad takođe razmatra hsa-miR-93-5p kao potencijalni prognostički i prediktivni biomarker i primenu ovog molekula u kliničkoj praksi.

Ključne reči: hsa-miR-93-5p, kolorektalni karcinom, metastaza, odgovor na terapiju, prognostički biomarker, prediktivni biomarker

Role of hsa-miR-93-5p in colorectal cancer

Jovana Despotović

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,

University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: jovanadespotovic@imgge.bg.ac.rs

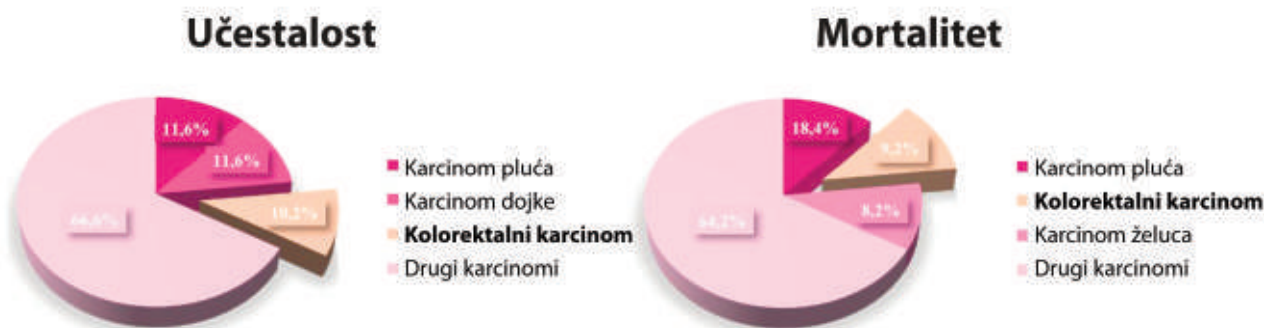
Abstract

Colorectal cancer is a heterogeneous disease that ranks third and second globally in terms of incidence and mortality rates, respectively. MicroRNAs have been implicated in the growth, progression, metastasis and response to therapy of different tumors, including colorectal cancer. Hsa-miR-93-5p has been reported to have oncogenic and tumor-suppressive roles in different tumor kinds. This review article aims to present the current knowledge on the role of hsa-miR-93-5p in the processes related to colorectal carcinogenesis, metastasis and response to chemotherapy in patients with primary and metastatic colorectal cancer. Also, the role of hsa-miR-93-5p as a potential prognostic and predictive biomarker and application of this molecule in the clinical practice is described.

Keywords: hsa-miR-93-5p, colorectal cancer, metastasis, response to therapy, prognostic biomarker, predictive biomarker

Kolorektalni karcinom

Kolorektalni karcinom (eng. *colorectal cancer*, CRC) je tip gastrointestinalnog maligniteta koji nastaje u kolonu ili rektumu. Sa oko 1,85 miliona novih slučajeva godišnje (10,2% slučajeva svih maligniteta) prema stopi učestalosti svih karcinoma zauzima treće mesto, odmah posle karcinoma pluća i karcinoma dojke, dok sa približno 0,88 miliona smrtnih slučajeva (9,2%) zauzima drugo mesto, odmah posle karcinoma pluća (Slika 1) [1]. Ukoliko se godišnji trend rasta nastavi, predviđa se da će do 2030. godine doći do povećanja stopa učestalosti i smrtnosti za 20% i 25%, respektivno [2]. Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa CRC je oko 90% ukoliko se bolest dijagnostikuje u ranim stadijumima, a iznosi samo 13% u slučaju već uznapredovale bolesti [3]. Vodeći faktori rizika za razvoj CRC uključuju porodičnu istoriju CRC, prethodno prisustvo drugih tumora, fizičku neaktivnost, pušenje, prekomernu težinu, visok unos alkoholnih pića, visok unos crvenog ili prerađenog mesa, kao i skroman unos mlečnih proizvoda i namirnica koje sadrže integralne žitarice ili dijetetska vlakna [3]. Međutim, približno 65% svih slučajeva CRC nastaju sporadično, bez prethodne porodične istorije ili nasleđenih genetičkih varijanti koje povećavaju rizik od razvoja CRC [4].



Slika 1. Stope učestalosti i mortaliteta CRC. Modifikovano prema Bray i sar. [1].

CRC nastaje postepenom akumulacijom genetičkih i epigenetičkih promena u žlezdanim epitelnim ćelijama kolona i rektuma koje dovode do histoloških promena kripti, od neizmenjenog epitela kolona i rektuma, preko adenoma (benignih tumora), sve do karcinoma koji može daljom progresijom da vrši invaziju u okolno tkivo i migrira do distalnih organa gde formira metastaze. Opisanu kaskadnu promenu od neizmenjenog epitela do karcinoma prate izmene u različitim molekularnim putevima. Tako je pokazano da prema modelu Fearon-a i Vogelstein-a kolorektalnoj karcinogenezi doprinosi aktivacija proto-onkogen *KRAS* i *BRAF* zajedno sa mutacionom inaktivacijom tumor-supresorskih gena *APC*, *SMAD4* i *TP53* [5]. Takođe, prema saznanjima iz prethodne dve decenije, u nastanak i razvoj CRC su uključeni i drugi molekularni mehanizmi poput hromozomske nestabilnosti, mikrosatelitske nestabilnosti nastale usled promena u genima uključenim u popravku pogrešno sparenih baza DNK, i fenotipa nastalog metilacijom CpG ostrva u promotorima određenih gena [6]. Imajući u vidu da histološki identični tumori mogu imati drastično različite prognoze, kao i činjenicu da se kod nekih pacijenata mogu naći promene u različitim molekularnim putevima, došlo se do zaključka da CRC predstavlja heterogenu i multifaktorijalnu bolest. Bolje razumevanje uloge ovih molekularnih puteva može doprineti poboljšavanju strategija za prevenciju, skrining, dijagnozu, prognozu i terapiju pacijenata sa CRC [7].

Maligne tumore, uključujući i CRC, karakteriše sposobnost odvajanja ćelija tumora sa njihovog primarnog mesta, zatim njihova migracija i invazija u limfne i krvne sudove, i finalno nastanjenje u distalnim or-

ganima gde će formirati sekundarni tumor, odnosno metastazu. Svaki opisani korak procesa metastaziranja je precizno regulisan i zahteva kako genetičke, tako i epigenetičke promene. Međutim, tačni mehanizmi uključeni u proces metastaziranja su u velikoj meri ostali nepoznati [7]. Oko 25% pacijenata će već pri postavljanju dijagnoze primarnog CRC imati metastaze CRC (mCRC), dok će polovina pacijenata razviti metastaze daljom progresijom bolesti [8]. Najčešći organ u kome CRC formira metastaze jeste jetra (eng. *colorectal cancer liver metastasis*, CRLM) [9]. Skoro polovina pacijenata sa CRC će preminuti usled komplikacija uzrokovanim prisustvom metastaza [10], tako da je od izuzetnog značaja da se otkriju novi terapijski pristupi, kao i prognostički i prediktivni biomarkeri, kako bi se ovako visoka stopa smrtnosti smanjila.

Lečenje kolorektalnog karcinoma

Tokom proteklih decenija, svi pacijenti sa CRC su lečeni na isti način. Međutim, postalo je jasno da usled heterogene prirode bolesti pacijenti ne pokazuju isti odgovor na terapiju, ili imaju različite sporedne reakcije na primenjene lekove. Zbog toga se prešlo na personalizovani pristup lečenju pacijenata, uzimajući u obzir životne navike pacijenta, stadijum tumora, kao i biološke i molekularne karakteristike tumora [11]. U eri personalizovane medicine, pacijentima sa CRC i mCRC su dostupni različiti modaliteti lečenja koji uključuju resektivnu hirurgiju, sistemska hemioterapiju i nove ciljne biološke lekove.

Klasifikacija tumora prema stadijumu pomoću TNM sistema, Dukes-ove i Astler-Coller-ove klasifikacije, pruža osnovu za određivanje terapijskih opcija. Dok će pacijenti sa ranom bolešću biti lečeni uglavnom samo operativno, pacijentima sa uznapredovalom bolešću će pored operacije biti data (neo)adjuvantna sistemska hemioterapija sa ili bez ciljanih bioloških agenasa. Primena hemioterapije u kliničkoj praksi je dovela do značajnog poboljšanja ishoda pacijenata sa CRC. Glavni cilj neoadjuvantne sistemske hemioterapije je da se bolest koja je trenutno neresektibilna učini podobnom za resekciju [12]. Citotoksični lekovi koji se najčešće koriste u okviru sistemske hemioterapije za lečenje CRC su: 5-fluorouracil (5-FU) (inhibitor timidilat sintaze koji funkcioniše tako što inhibira sintezu pirimidina tokom replikacije DNK, a najčešće se u kliničkoj praksi primenjuje zajedno sa leukovorinom koji pojačava njegovo dejstvo), oksaliplatin (derivat platine treće generacije koji dovodi do zastoja u mitozu usled formiranja DNK adukata), i irinotekan (inhibitor topoisomerase I koji dovodi do inhibicije ligacije DNK tokom ćelijskog ciklusa) [13]. U kliničkoj praksi se u okviru prve linije lečenja pacijenata najčešće primenjuje kombinacija ovih lekova, i to u vidu dublet režima FOLFOX (5-FU + leukovorin + oksaliplatin) i FOLFIRI (5-FU + leukovorin + irinotekan) [14, 15].

Otkrivanje uloge faktora rasta poput EGF (eng. *epidermal growth factor*) i VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*) u procesu metastaziranja ukazalo je na ove molekule kao potencijalne terapijske targete. Tako su u kliničku praksu ušla humanizovana antitela na receptor za EGF cetuksimab i panitumumab, kao i humanizovana antitela, fuzionisani proteini i mali inhibicioni proteini receptora za VEGF bevacizumab, ziv-aflibercept, regorafenib i ramucirumab [16]. Pokazano je da kombinacija sistemske hemioterapije sa ciljanim biološkim agensima dovodi do boljeg odgovora pacijenata na terapiju u poređenju sa primenom samo sistemske hemioterapije [17-20]. Uprkos obećavajućem uspehu ciljanih agenasa primećeno je da određen broj pacijenata ne pokazuje odgovor na primenjenu terapiju usled urođene ili stečene rezistencije. Zbog toga bi selekcija pacijenata koji bi imali koristi od primene određene hemioterapije poboljšala terapijsku efikasnost čime bi se izbeglo davanje terapije koja bi za određenog pacijenta bila samo toksična, a smanjili bi se i finansijski troškovi lečenja. Do danas je identifikovan mali broj molekularnih biomarkera koji mogu da predvide odgovor pacijenta na terapiju i tako pomognu lekarima u donošenju odluke za odabir prave terapije za datog pacijenta. Tako je na primer status gena uključenih u popravku pogrešno sparenih baza DNK jedini biomarker koji može da predvidi koji pacijenti sa stadijumom II CRC neće pokazati odgovor na adju-

vantnu terapiju [21]. Takođe, pacijenti sa CRC koji u tumoru poseduju aktivirajuće mutacije u genu *KRAS* neće pokazati odgovor na terapiju koja cilja receptor za EGF, zbog čega je molekularno testiranje statusa gena *KRAS* ušlo u kliničku praksu kako bi se selektovali pacijenti sa većom verovatnoćom za pozitivan efekat ove vrste terapije [22-24]. Buduća istraživanja koja će iznedriti nove validirane prediktivne i prognostičke biomarkere biće neophodna kako bi se poboljšao kvalitet života i ishod pacijenata sa CRC.

MikroRNK

MikroRNK (miRNK) molekuli pripadaju velikoj klasi malih regulatornih nekodirajućih RNK molekula koji vrše post-transkripcionu regulaciju genske ekspresije kod metazoa [25]. To su jednolančani RNK molekuli dužine od 21-25 nukleotida koji nastaju od dugačkog prekursora koji formira strukturu nesavršeno sparene ukosnice, od koje će daljom obradom nastati zrela miRNK. Većina miRNK svoju ulogu negativnih regulatora genske ekspresije najčešće vrši komplementarnim vezivanjem za 3' netranslatirajući region (eng. *untranslated region*, UTR) iRNK, što za posledicu ima degradaciju ciljane iRNK ili inhibiciju translacije [26]. Bioinformatičke analize ukazuju da miRNK sisara mogu da regulišu i do 60% svih protein-kodirajućih gena [27], zbog čega nije iznenađujuće da su miRNK molekuli uključeni u regulaciju fundamentalnih ćelijskih procesa poput ćelijske proliferacije, diferencijacije i smrti [28]. Zbog njihove važne uloge u regulaciji ovih procesa, izmene u ekspresiji miRNK povezane su sa fiziološkim i razvojnim promena, kao i pojavom patoloških stanja, poput tumora.

Brojne studije koje su analizirale ekspresioni status miRNK su pokazale da je pojava izmenjene ekspresije miRNK u humanim karcinomima više pravilo nego izuzetak. Tako je povišena ili snižena ekspresija miRNK pokazana u brojnim tumorima i tumorskim ćelijskim linijama [28, 29], poput limfoma [30], karcinoma dojke [31], glioblastoma [32], hepatocelularnog karcinoma [33], karcinoma pluća [34], karcinoma pankreasa [35], karcinoma prostate [36] i CRC [37, 38]. miRNK su predložene kao regulatori onkogeneze s obzirom da mogu imati onkogenu ili tumor-supresorsku ulogu [29, 39], s tim da ta uloga može biti specifična za tip tumora [40]. Uopšteno, ekspresija zrelih miRNK je globalno snižena u tumorskim tkivima [41], bilo kao posledica gubitka genetičke informacije, epigenetičkog utišavanja, usled defekata u procesu biogeneze miRNK, ili globalne represije transkripcije [40]. Ne samo da je ekspresija miRNK izmenjena u tumorima, već je poznato da miRNK mogu imati ključne uloge u nastanku, razvoju, progresiji i metastaziranju tumora [39, 40]. miRNK su izučavane i kao potencijalni dijagnostički, prognostički i prediktivni biomarkeri, i terapijski agensi ili targeti, s obzirom da profili ekspresije miRNK koreliraju sa kliničkim i biološkim karakteristikama tumora kao što je tip tkiva, stepen diferencijacije, agresivnost i odgovor na terapiju [29].

Obrazac ekspresije miRNK je konzistentno i reproducibilno izmenjen u CRC u poređenju sa normalnom mukozom creva [37, 38, 42, 43]. Uloga miRNK u ranom razvoju CRC se ogleda u činjenici da se obrazac ekspresije miRNK menja tokom progresije od normalnog kolona, preko adenoma do kolorektalnog karcinoma [44]. miRNK su uključene i u kasnije faze razvoja i progresije CRC, tako što utiču na invaziju, migraciju, intravazaciju, ekstrasvazaciju i metastatsko naseljavanje udaljenih organa tumorskih ćelija [42, 45].

Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnoj karcinogenezi

hsa-miR-93-5p, zajedno sa hsa-miR-106b i hsa-miR-25, pripada klasteru miR-106b-25 lociranom na 515 baznih parova dugom regionu hromozoma 7q22, u okviru introna 13 gena *MCM7* [46]. U literaturnim podacima ne postoji konsenzus u vezi sa smerom ekspresije hsa-miR-93-5p u CRC u poređenju sa normalnom mukozom, pri čemu većina studija ukazuje na povišenu ekspresiju hsa-miR-93-5p [47-49], dok druge ističu

sniženu ekspresiju hsa-miR-93-5p [50, 51]. U različitim tumorima je pokazana onkogeni ili tumor-supresorska uloga hsa-miR-93-5p koju ispoljava kroz regulaciju ćelijske proliferacije, ćelijskog ciklusa i smrti, invazije, migracije, angiogeneze i rasta tumora, dok za CRC dosadašnja istraživanja ukazuju na tumor-supresorsku ulogu (Tabela 1).

Onkogeni uloga	Referenca	Tumor-supresorska uloga	Referenca
karcinom jajnika	[75, 76]	gliomi	[77]
glioblastom	[75]	karcinom jajnika	[78]
nazofaringealni karcinom	[79]	kolorektalni karcinom	[47, 51-55]
karcinom pluća	[80]		
karcinom jednjaka	[81, 82]		
karcinom grlića materice	[83, 84]		
karcinom želuca	[85, 86]		
skvamocelularni karcinom glave i vrata	[87]		
hepatocelularni karcinom	[88]		
karcinom dojke	[89, 90]		
osteosarkom	[91]		

Tabela 1. Onkogeni i tumor-supresorska uloga hsa-miR-93-5p u humanim karcinomima.

Studija Tang i saradnika je pokazala da povišena ekspresija miR-93 inhibira proliferaciju, invaziju i migraciju ćelijskih linija CRC HCT116 i SW480, kao i formiranje tumora *in vivo* na modelu miša, kroz regulaciju Wnt/ β -katenin signalnog puta posredstvom SMAD7 [52]. Potvrđujući ove rezultate, nalazi druge studije ukazuju da je povišena ekspresija miR-93 dovela do smanjenja vijabilnosti, indukcije apoptoze i inhibicije autofagije HCT116 i SW480 ćelija [53]. Uloga miR-93 kao inhibitora tumorigeneze potvrđena je i studijom Yang i saradnika, gde je pokazano da povišena ekspresija miR-93 inhibira proliferaciju maligne ćelijske linije kolona Caco2 tako što smanjuje ekspresiju gena *ERBB2*, *p21* i *VEGF* i dovodi do akumulacije ćelija u G2 fazi kroz regulaciju proteina CCNB1. Takođe, miR-93 je inhibirala migraciju, ali ne i invaziju, apoptozu ili nekrozu ovih ćelija, a dovela je i do smanjenja rasta tumora na *in vivo* mišijem modelu [47]. Druga studija je pokazala da povišena ekspresija miR-93 inhibira proliferativne, migratorne i invazivne sposobnosti LOVO i SW480 ćelija i aktivira njihovu apoptozu kroz uticaj na HMGB3 i blokadu PI3K/AKT signalnog puta [54]. Pored inhibicije migracije i invazije, hsa-miR-93-5p ispoljava anti-tumorsku aktivnost u CRC i smanjenjem sposobnosti imunološkog izbegavanja CRC ćelija tako što smanjuje nivoe proteina MMP-1, MMP-2 i MMP-9 kroz inhibiciju gena *PD-L1* [51]. Takođe, miR-93 je bila jedna od nekoliko diferencijalno eksprimiranih miRNK između SW1116 ćelija gajenih u medijumu bez seruma sa karakteristikama matičnih ćelija karcinoma kolona (SW1116csc) i diferenciranih SW1116 ćelija, a zaslužna je za inhibiciju proliferacije i formiranje kolonija kod SW1116csc ćelija u poređenju sa SW1116 ćelijama [55]. Rezultati studije u kojoj je hsa-miR-93-5p funkcionalno okarakterisana u CRC ćelijama HCT116 i SW620 kroz nekoliko procesa važnih za kolorektalnu karcinogenezu su pokazali da hsa-miR-93-5p stimuliše *in vitro* formiranje tuba čime učestvuje u promovisanju angiogeneze kod CRC, ali da ne utiče na vijabilnost, ćelijski ciklus, ćelijsku smrt po tipu anoikis i migraciju

in vitro, kao ni na rast tumora *in vivo* na modelu embriona pileta [56], što je u suprotnosti sa navedenim studijama gde je dokazano anti-tumorsko dejstvo hsa-miR-93-5p u CRC.

Uloga hsa-miR-93-5p u odgovoru na hemioterapiju

Ekspresija miRNK je često izmenjena pod dejstvom anti-tumorskih lekova [57, 58]. Tokom protekle decenije je pokazano da miRNK ne samo da imaju često izmenjenu ekspresiju u tumorskim ćelijama rezistentnim na određene lekove [59], već i da miRNK imaju važnu ulogu u regulaciji rezistencije na lekove, uključujući 5-FU i oksaliplatin. Takođe je ustanovljeno da status miRNK može da predvidi uspeh hemioterapije zasnovane na 5-FU, oksaliplatinu i irinotekanu kod pacijenata sa CRC [60-62]. Zbog svega navedenog, i uzimajući u obzir da miRNK pokazuju jaku tkivnu-specifičnost i stabilnost, miRNK molekuli su predloženi kao potencijalni biomarkeri odgovora na terapiju. Veći broj studija povezuje hsa-miR-93-5p sa odgovorom na standardne i ciljane hemioterapeutske lekove za lečenje CRC i mCRC.

Tretirajući HCT-8 ćelije CRC sa 10 μ M 5-FU ili 4,24 μ M oksaliplatinom, Zhou i saradnici su pokazali da je ekspresija miR-93 bila snižena 24 h nakon ovih tretmana [58]. Za razliku od ove studije, rezultati istraživanja Hou i saradnika su pokazali da je ekspresija hsa-miR-93-5p 24 h nakon tretmana sa 5 μ M 5-FU bila povišena u HT29 ćelijama [63]. Pri poređenju ovih studija svakako treba obratiti pažnju na izbor ćelijske linije, kao i korišćenu koncentraciju i dužinu trajanja tretmana. Rezultati na metastatskoj ćelijskoj liniji CRC SW620 su pokazali da je ekspresija hsa-miR-93-5p 72 h nakon tretmana sa pojedinačnim hemioterapeutskim lekovima (5-FU, oksaliplatin, irinotekan) i njihovim kombinacijama (5-FU + oksaliplatin i 5-FU + irinotekan) bila snižena za oko 50% u poređenju sa kontrolnim tretmanom [64]. U eksperimentu gde je praćena vremenska dinamika promene ekspresije ove miRNK, ustanovljeno je da je ekspresija hsa-miR-93-5p 24 h nakon tretmana sa kombinovanim režimima bila nepromenjena, a da je 144 h nakon tretmana zadržala sniženi nivo koji je uočen i nakon 72 h. Paralelno sa promenom ekspresije hsa-miR-93-5p, uočeno je i da su SW620 ćelije pokazale relativno dobar odgovor na tretman standardnim hemioterapeuticima u vremenskoj tački od 72 h, jer je došlo do smanjenja njihove vijabilnosti i indukcije ćelijske smrti, ali i promene u ekspresiji markera epitelijalno-mezenhimalne tranzicije *CDH1* i *VIM* usled koje su ćelije poprimile karakteristike slične epitelnim ćelijama. Nakon 144 h, SW620 ćelije su se vratile na bazalno mezenhimalno stanje. Na osnovu ovih nalaza je zaključeno da je hsa-miR-93-5p validan kandidat za testiranje kao biomarker odgovora na terapiju standardnim hemioterapeutskim agensima.

Kao što je ranije napomenuto, pored standardnih hemioterapeutskih agenasa u terapiji mCRC se koristi udruženo i targetovana terapija. Do sada nisu pokazani validirani prediktivni biomarkeri koji bi predvideli efikasnost ciljanog terapeutika bevacizumaba [65]. S obzirom na to da je prethodna studija ukazala na potencijalni prediktivni značaj hsa-miR-93-5p u odgovoru na standardnu hemioterapiju, narednom studijom je ispitan prediktivni potencijal hsa-miR-93-5p u odgovoru na bevacizumab, sa ili bez primene kombinovanog sistemskog režima 5-FU + oksaliplatin *in vitro* [66]. Pokazano je da tretman 250 μ g/mL bevacizumabom, ili bevacizumab u kombinaciji sa 5-FU + oksaliplatin režimom tokom 72 h nije doveo do promene ekspresije hsa-miR-93-5p u ćelijskoj liniji metastatskog CRC SW620. Bevacizumab nije uticao na ekspresiju hsa-miR-93-5p ni kod HCEC-1CT ćelija neizmenjenog epitela kolona. Ovo je prva studija koja je ispitala efekat bevacizumaba na ekspresiju hsa-miR-93-5p na *in vitro* modelu mCRC. Međutim, u tumorima poput karcinoma pluća i karcinoma dojke je pokazano da ciljani terapeutski agens bevacizumab utiče na ekspresiju hsa-miR-93-5p. Tačnije, bevacizumab koncentracije 50 μ g/mL je nakon 72 h povećao ekspresiju hsa-miR-93-5p kod ćelija karcinoma pluća NCI-H460 [67]. Suprotno, nivo hsa-miR-93-5p je bio snižen kod pacijenata koji su primali bevacizumab usled karcinoma dojke [68].

miRNK prisutne u tkivima ili kao slobodno cirkulišući molekuli u krvi su predložene kao obećavajući biomarkeri za predikciju odgovora na sistemsku i ciljanu terapiju kod pacijenata sa CRC [69]. Korišćenjem uzoraka metastatskog tumorskog tkiva i seruma pacijenata sa CRLM, analizirano je da li je ekspresija hsa-miR-93-5p izmenjena kod ispitanika koji su primali neoadjuvantnu hemioterapiju baziranu na kombinaciji lekova 5-FU + oksaliplatin u odnosu na one koji nisu primali neoadjuvantnu hemioterapiju, kako bi se u kliničkim uslovima potvrdili rezultati iz pomenutih *in vitro* eksperimenata. Međutim, s obzirom na to da statistička značajnost nije uočena, zaključeno je da neoadjuvantna hemioterapija bazirana na kombinaciji lekova 5-FU + oksaliplatin nije uticala na ekspresiju hsa-miR-93-5p u metastatskom tumorskom tkivu i serumu kod ispitanika sa CRLM [66]. Kako bi se ispitao translacioni potencijal hsa-miR-93-5p kao prediktivnog biomarkera za odgovor na neoadjuvantnu hemioterapiju kod ispitanika sa CRLM, analizirana je povezanost visoke, odnosno niske ekspresije hsa-miR-93-5p u metastatskom tumorskom tkivu i serumu ispitanika sa CRLM koji su pokazali odgovor na hemioterapiju u odnosu na one koji nisu. Međutim, takva povezanost nije uočena. Ovaj rezultat je bio u skladu sa studijom koja je obuhvatila ispitanike sa mCRC koji su takođe primali prvu liniju terapije baziranu na kombinaciji 5-FU + oksaliplatin [70]. Rezultati ovih studija govore u prilog tome da hsa-miR-93-5p nema prediktivni potencijal kod pacijenata sa CRLM lečenim sa kombinacijom 5-FU + oksaliplatin.

Uloga hsa-miR-93-5p u prognozi bolesti

Trenutno su aktuelna istraživanja koja za cilj imaju potragu za biomarkerima koji bi mogli da predvide ishod bolesti pacijenata sa CRC. Biomarkeri koji bi mogli da klasifikuju pacijente koji su pod povišenim rizikom za relaps bolesti, pojavu metastaza ili imaju sniženo očekivano ukupno preživljavanje ili preživljavanje bez bolesti bi bili od izuzetnog kliničkog značaja jer bi mogli da utiču na donošenje odluke o primeni striktnijeg režima adjuvantne hemioterapije, i ukazali bi na potrebu za češćim praćenjem ovih pacijenata. Brojna istraživanja ukazuju da bi upravo molekuli miRNK eksprimirani u tumoru ili u različitim telesnim tečnostima mogli biti potencijalni prognostički biomarkeri za CRC i mCRC [69, 71, 72].

Tumorski markeri karcinoembrionski antigen (eng. *carcinoembryonic antigen*, CEA) i karbohidratni antigen (eng. *carbohydrate antigen*, CA) 19-9 su dobro ustanovljeni markeri za praćenje pojave recidiva bolesti jer su lako detektabilni u perifernoj krvi pacijenata. Međutim, senzitivnost ovih biomarkera nije dovoljna za precizno praćenje rekurentne bolesti i aktivno se radi na pronalaženju načina da se njihova senzitivnost poboljša. Pokazano je da bi miRNK molekuli u kombinaciji sa ovim tumorskim markerima mogli da poboljšaju diskriminaciju pacijenata u odnosu na ishod bolesti [73]. Ispitano je da li hsa-miR-93-5p eksprimirana u CRLM ili serumu korelira sa nivoima tumorskih markera CEA i CA 19-9 [66]. Rezultati su pokazali da hsa-miR-93-5p u CRLM pokazuje umereno negativnu korelaciju sa nivoom CEA, ali dalja istraživanja su potrebna koja bi potvrdila korist kombinovanja hsa-miR-93-5p i CEA tumorskog markera kod ispitanika sa CRLM za prognozu bolesti.

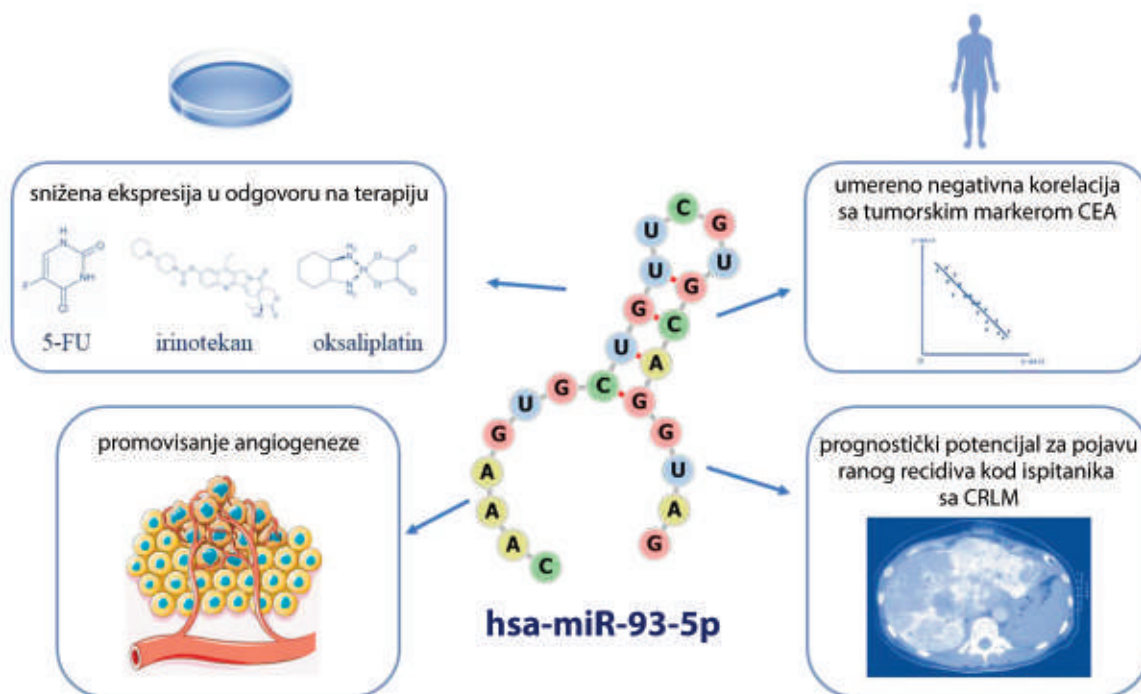
Četiri studije su ispitivale potencijalni prognostički značaj hsa-miR-93-5p kod ispitanika sa CRC. Sve studije su pronašle da je snižena ekspresija hsa-miR-93-5p bila povezana sa pojavom ranog recidiva bolesti i lošijim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez bolesti [47, 50, 51, 74]. Što se tiče uloge hsa-miR-93-5p kod mCRC, poznato je da je ekspresija hsa-miR-93-5p viša u CRLM u odnosu na normalno tkivo kolona i u odnosu na primarni CRC [48]. Ispitan je prognostički značaj hsa-miR-93-5p za jednogodišnje preživljavanje bez bolesti i pojavu ranog recidiva kod ispitanika sa CRLM [66]. Rezultati Kaplan-Meier-ove analize su pokazali da ne postoji razlika u jednogodišnjem preživljavanju bez bolesti kod ispitanika sa povišenom i sniženom ekspresijom hsa-miR-93-5p u CRLM ili serumu. Međutim, bivarijantna analiza je pokazala da je

povišena ekspresija hsa-miR-93-5p u serumu bila značajno povezana sa pojavom ranog recidiva bolesti u okviru praćenja ispitanika u periodu od godinu dana. Zbog toga je slobodno cirkulišuća hsa-miR-93-5p u serumu predložena kao potencijalni prognostički biomarker za pojavu ranog recidiva bolesti kod ispitanika sa CRLM.

Zaključak

U ovom radu dat je pregled uloge hsa-miR-93-5p u procesima relevantnim za kolorektalnu karcinogenezu, odgovoru na terapiju i prognozu bolesti. Onkogeni ili tumor-supresorski uloga hsa-miR-93-5p koju ispoljava kroz regulaciju ćelijske proliferacije, ćelijskog ciklusa i smrti, invazije, migracije i rasta tumora je pokazana u različitim tumorima, dok u CRC dosadašnja istraživanja ukazuju na tumor-supresorsku ulogu. Standardni hemioterapeutici za lečenje CRC utiču na ekspresiju hsa-miR-93-5p, ali su različite *in vitro* studije pokazale oprečne rezultate. Brojne studije zato potvrđuju prognostički značaj hsa-miR-93-5p kod ispitanika sa CRC, jer je pokazano da je snižena ekspresija hsa-miR-93-5p povezana sa pojavom ranog recidiva bolesti i lošijim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez bolesti.

U mCRC (Slika 2) je pokazano da hsa-miR-93-5p učestvuje u promovisanju angiogeneze kod CRC i mCRC tako što stimuliše *in vitro* formiranje tuba. Takođe je pokazano da standardni hemioterapeutski lekovi 5-FU, oksaliplatin, irinotekan i njihovi kombinovani režimi, ali ne i ciljani agens bevacizumab, utiču na ekspresiju hsa-miR-93-5p u SW620 ćelijama *in vitro*, ali da efekat neoadjuvantne hemioterapije na ekspresiju hsa-miR-93-5p nije uočen kod pacijenata sa CRLM. hsa-miR-93-5p nema prediktivni potencijal kod pacijenata sa CRLM lečenim sa 5-FU + oksaliplatin kombinacijom. Zanimljivo je da je hsa-miR-93-5p u CRLM pokazala umereno negativnu korelaciju sa nivoom tumorskog markera CEA, pa bi dalja istraživanja trebalo da potvrde korisnost njihovog kombinovanja za prognozu bolesti. Najzad, povišena ekspresija hsa-miR-93-5p u serumu ispitanika sa CRLM bila je značajno povezana sa pojavom ranog recidiva bolesti, zbog čega je predložena kao potencijalni prognostički biomarker za pojavu ranog recidiva kod ispitanika sa CRLM.



Slika 2. Šematski prikaz rezultata o povezanosti hsa-miR-93-5p sa angiogenezom i odgovorom na terapiju dobijenih na osnovu *in vitro* studija (levo) [56, 64], i rezultata o prognostičkom potencijalu hsa-miR-93-5p kod pacijenata sa mCRC (desno) [66].

Iako brojni dokazi podržavaju upotrebu miRNK kao potencijalnih prediktivnih i prognostičkih biomarkera kako u tkivu tako i kao slobodno cirkulišućih molekula u krvi, dosadašnja istraživanja nisu iznedrila validirane miRNK biomarkere za odgovor na sistemsku hemioterapiju za lečenje CRC i mCRC, niti za prognozu ishoda bolesti. Buduća istraživanja na većoj grupi ispitanika i na nezavisnim kohortama bi trebalo da konačno rasvetle mogućnosti primene hsa-miR-93-5p u kliničkoj praksi i njenu upotrebu kao prognostičkog biomarkera kako bi se došlo do personalizovanog lečenja ispitanika sa CRC.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj ugovora 451-03-68/2022-14/200042).

Posebno se zahvaljujem dr Aleksandri Nikolić na kritičkoj oceni ovog rada, kao i svim savetima i sugestijama za poboljšanje njegovog kvaliteta.

Literatura

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68 (6): 394-424.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66 (4): 683-91.
3. Mattiuzzi C, Sanchis-Gomar F, Lippi G. Concise update on colorectal cancer epidemiology. *Ann Transl Med*. 2019;7 (21): 609.
4. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16 (12): 713-32.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61 (5): 759-67.
6. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;27 (9): 1423-31.
7. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Pathology Research International*. 2012;2012: 597497.
8. Blumgart LH, Fong Y. Surgical options in the treatment of hepatic metastasis from colorectal cancer. *Current Problems in Surgery*. 1995;32 (5): 333-421.
9. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, et al. Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*. 2006;106 (7): 1624-33.
10. Helling TS, Martin M. Cause of death from liver metastases in colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2013;21 (2): 501-6.
11. Yau TO. Precision treatment in colorectal cancer: Now and the future. *JGH Open*. 2019;3 (5): 361-9.
12. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, Group EGW. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014;25 Suppl 3: iii1-9.
13. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2005;352 (5): 476-87.
14. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000;355 (9209): 1041-7.
15. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18 (16): 2938-47.
16. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5 (1): 22.
17. Yu IS, Cheung WY. Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Personalized Medicine: A More Tailored Approach to Systemic Therapy. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018: 9450754.
18. Hurwitz HI, Tebbutt NC, Kabbinavar F, Giantonio BJ, Guan ZZ, Mitchell L, et al. Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials. *Oncologist*. 2013;18 (9): 1004-12.
19. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28 (31): 4697-705.
20. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29 (15): 2011-9.
21. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28 (20): 3219-26.

22. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;359 (17): 1757-65.
23. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26 (3): 374-9.
24. Weinberg BA, Marshall JL, Hartley M, Salem ME. A paradigm shift from one-size-fits-all to tailor-made therapy for metastatic colorectal cancer. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2016;14 (2): 116-28.
25. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews: Genetics*. 2008;9 (2): 102-14.
26. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews: Genetics*. 2004;5 (7): 522-31.
27. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2009;19 (1): 92-105.
28. Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle*. 2005;4 (9): 1179-84.
29. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews: Cancer*. 2006;6 (11): 857-66.
30. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435 (7043): 828-33.
31. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*. 2005;65 (16): 7065-70.
32. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;334 (4): 1351-8.
33. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 2006;25 (17): 2537-45.
34. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9 (3): 189-98.
35. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24 (29): 4677-84.
36. Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Wallace TA, Howe TM, Yfantis HG, et al. Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *Prostate*. 2008;68 (11): 1152-64.
37. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research*. 2003;1 (12): 882-91.
38. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Sjoblom T, et al. The colorectal microRNAome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103 (10): 3687-92.
39. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews: Cancer*. 2015;15 (6): 321-33.
40. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*. 2012;6 (6): 590-610.
41. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435 (7043): 834-8.
42. Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer Journal*. 2012;18 (3): 244-52.
43. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, et al. Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *International Journal of Oncology*. 2009;34 (4): 1069-75.
44. Oberg AL, French AJ, Sarver AL, Subramanian S, Morlan BW, Riska SM, et al. miRNA expression in colon polyps provides evidence for a multihit model of colon cancer. *PLoS One*. 2011;6 (6): e20465.
45. Tokarz P, Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment. *Acta Biochimica Polonica*. 2012;59 (4): 467-74.
46. Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Research*. 2008;68 (20): 8191-4.

47. Yang IP, Tsai HL, Hou MF, Chen KC, Tsai PC, Huang SW, et al. MicroRNA-93 inhibits tumor growth and early relapse of human colorectal cancer by affecting genes involved in the cell cycle. *Carcinogenesis*. 2012;33 (8): 1522-30.
48. Drusco A, Nuovo GJ, Zanesi N, Di Leva G, Pichiorri F, Volinia S, et al. MicroRNA profiles discriminate among colon cancer metastasis. *PloS One*. 2014;9 (6): e96670.
49. Earle JS, Luthra R, Romans A, Abraham R, Ensor J, Yao H, et al. Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. *J Mol Diagn*. 2010;12 (4): 433-40.
50. Xiao ZG, Deng ZS, Zhang YD, Zhang Y, Huang ZC. Clinical significance of microRNA-93 downregulation in human colon cancer. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013;25 (3): 296-301.
51. Chen YL, Wang GX, Lin BA, Huang JS. MicroRNA-93-5p expression in tumor tissue and its tumor suppressor function via targeting programmed death ligand-1 in colorectal cancer. *Cell Biology International*. 2020;44 (5): 1224-36.
52. Tang Q, Zou Z, Zou C, Zhang Q, Huang R, Guan X, et al. MicroRNA-93 suppress colorectal cancer development via Wnt/ β -catenin pathway downregulating. *Tumour Biology*. 2014;36 (3): 1701-10.
53. Liu Y, Chen X, Liu J, Gu H, Fan R, Ge H. Long non-coding RNA HOTAIR knockdown enhances radiosensitivity through regulating microRNA-93/ATG12 axis in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*. 2020;11 (3): 175.
54. Gu M, Jiang Z, Li H, Peng J, Chen X, Tang M. MiR-93/HMGB3 regulatory axis exerts tumor suppressive effects in colorectal carcinoma cells. *Experimental and Molecular Pathology*. 2021;120: 104635.
55. Yu XF, Zou J, Bao ZJ, Dong J. miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2011;17 (42): 4711-7.
56. Despotovic J. Role of microRNAs involved in regulation of TGF β signaling pathway in metastatic colorectal cancer - functional analysis and response to therapy [Doctoral dissertation]. Belgrade, Serbia: University of Belgrade; 2022.
57. Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacological Research*. 2007;56 (3): 248-53.
58. Zhou J, Zhou Y, Yin B, Hao W, Zhao L, Ju W, et al. 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells in vitro. *Oncology Reports*. 2010;23 (1): 121-8.
59. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S, et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat*. 2010;13 (4-5): 109-18.
60. Xie T, Huang M, Wang Y, Wang L, Chen C, Chu X. MicroRNAs as Regulators, Biomarkers and Therapeutic Targets in the Drug Resistance of Colorectal Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;40 (1-2): 62-76.
61. Garajová I, Ferracin M, Porcellini E, Palloni A, Abbati F, Biasco G, et al. Non-Coding RNAs as Predictive Biomarkers to Current Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18 (7).
62. Yu X, Li Z, Yu J, Chan MT, Wu WK. MicroRNAs predict and modulate responses to chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Proliferation*. 2015;48 (5): 503-10.
63. Hou N, Han J, Li J, Liu Y, Qin Y, Ni L, et al. MicroRNA profiling in human colon cancer cells during 5-fluorouracil-induced autophagy. *PloS One*. 2014;9 (12): e114779.
64. Despotovic J, Dragicevic S, Nikolic A. Effects of Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer on the TGF- β Signaling and Related miRNAs hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21-5p and hsa-miR-93-5p. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2021.
65. Gherman A, Balacescu L, Gheorghe-Cetean S, Vlad C, Balacescu O, Irimie A, et al. Current and New Predictors for Treatment Response in Metastatic Colorectal Cancer. The Role of Circulating miRNAs as Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2020;21 (6).
66. Despotović J, Bogdanović A, Dragičević S, Galun D, Krivokapić Z, Nikolić A. Prognostic potential of circulating miR-93-5p in patients with colorectal cancer liver metastases. *Neoplasma*. 2022;69 (2): 430-42.
67. Al-Mutairi FF, Baru R, Ramalingam S, Ahmad A, Charan HK, Vijayan V, et al. Global MicroRNA Profiling of Human Lung Cancer Cell Lines Using Bevacizumab. *Trends in Biosciences*. 2017;10 (12): 2266-8.
68. Lindholm EM, Ragle Aure M, Haugen MH, Kleivi Sahlberg K, Kristensen VN, Nebdal D, et al. miRNA expression changes during the course of neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy treatment in breast cancer. *Molecular Oncology*. 2019;13 (10): 2278-96.
69. To KK, Tong CW, Wu M, Cho WC. MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24 (27): 2949-73.

70. Rasmussen MH, Jensen NF, Tarpgaard LS, Qvortrup C, Rømer MU, Stenvang J, et al. High expression of microRNA-625-3p is associated with poor response to first-line oxaliplatin based treatment of metastatic colorectal cancer. *Molecular Oncology*. 2013;7 (3): 637-46.
71. Rapado-González Ó, Álvarez-Castro A, López-López R, Iglesias-Canle J, Suárez-Cunqueiro MM, Muínelo-Romay L. Circulating microRNAs as Promising Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2019;11 (7).
72. Schou JV, Johansen JS, Nielsen D, Rossi S. Circulating microRNAs as Prognostic and Predictive Biomarkers in Patients with Colorectal Cancer. *Noncoding RNA*. 2016;2 (2).
73. Pesta M, Kucera R, Topolcan O, Karlikova M, Houfkova K, Polivka J, et al. Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients. *Cancers*. 2019;11 (6).
74. Yang IP, Tsai HL, Miao ZF, Huang CW, Kuo CH, Wu JY, et al. Development of a deregulating microRNA panel for the detection of early relapse in postoperative colorectal cancer patients. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14 (1): 108.
75. Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW, et al. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene*. 2010;30 (7): 806-21.
76. Fu X, Tian J, Zhang L, Chen Y, Hao Q. Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Letters*. 2012;586 (9): 1279-86.
77. Wu H, Liu L, Zhu JM. MiR-93-5p inhibited proliferation and metastasis of glioma cells by targeting MMP2. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2019;23 (21): 9517-24.
78. Chen X, Chen S, Xiu YL, Sun KX, Zong ZH, Zhao Y. RhoC is a major target of microRNA-93-5P in epithelial ovarian carcinoma tumorigenesis and progression. *Molecular Cancer*. 2015;14: 31.
79. Lyu X, Fang W, Cai L, Zheng H, Ye Y, Zhang L, et al. TGF β R2 is a major target of miR-93 in nasopharyngeal carcinoma aggressiveness. *Molecular Cancer*. 2014;13: 51.
80. Yang W, Bai J, Liu D, Wang S, Zhao N, Che R, et al. MiR-93-5p up-regulation is involved in non-small cell lung cancer cells proliferation and migration and poor prognosis. *Gene*. 2018;647: 13-20.
81. Liu MX, Liao J, Xie M, Gao ZK, Wang XH, Zhang Y, et al. miR-93-5p Transferred by Exosomes Promotes the Proliferation of Esophageal Cancer Cells via Intercellular Communication by Targeting PTEN. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2018;31 (3): 171-85.
82. Cai Y, Ruan W, Ding J, Wei N, Wang J, Zhang H, et al. miR-93-5p regulates the occurrence and development of esophageal carcinoma epithelial cells by targeting TGF β R2. *International Journal of Molecular Medicine*. 2021;47 (3).
83. Li J, Chu ZP, Han H, Zhang Y, Tian F, Zhang JQ, et al. Suppression of miR-93-5p inhibits high-risk HPV-positive cervical cancer progression via targeting of BTG3. *Human Cell*. 2019;32 (2): 160-71.
84. Sun XY, Han XM, Zhao XL, Cheng XM, Zhang Y. MiR-93-5p promotes cervical cancer progression by targeting THBS2/MMPS signal pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2019;23 (12): 5113-21.
85. Li L, Zhao J, Huang S, Wang Y, Zhu L, Cao Y, et al. MiR-93-5p promotes gastric cancer-cell progression via inactivation of the Hippo signaling pathway. *Gene*. 2018;641: 240-7.
86. Ma DH, Li BS, Liu JJ, Xiao YF, Yong X, Wang SM, et al. miR-93-5p/IFNAR1 axis promotes gastric cancer metastasis through activating the STAT3 signaling pathway. *Cancer Letters*. 2017;408: 23-32.
87. Zhang S, He Y, Liu C, Li G, Lu S, Jing Q, et al. miR-93-5p enhances migration and invasion by targeting RGMB in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Cancer*. 2020;11 (13): 3871-81.
88. Shi X, Liu TT, Yu XN, Balakrishnan A, Zhu HR, Guo HY, et al. microRNA-93-5p promotes hepatocellular carcinoma progression via a microRNA-93-5p/MAP3K2/c-Jun positive feedback circuit. *Oncogene*. 2020;39 (35): 5768-81.
89. Fang L, Du WW, Yang W, Rutnam ZJ, Peng C, Li H, et al. MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle*. 2012;11 (23): 4352-65.
90. An G, Lu F, Huang S, Bai J, He L, Liu Y, et al. Effects of miR-93 on epithelial to mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in triple negative breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2021;23 (1).
91. Perut F, Roncuzzi L, Zini N, Massa A, Baldini N. Extracellular Nanovesicles Secreted by Human Osteosarcoma Cells Promote Angiogenesis. *Cancers*. 2019;11 (6).

Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona

Marijana B. Živković

Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Centar za hemiju, Njegoševa 12, 11000 Beograd, Republika Srbija
Kontakt: marijana.zivkovic@ihtm.bg.ac.rs

Apstrakt

Kako maligne ćelije vremenom mutiraju i postaju rezistentne na postojeće lekove postoji stalna potreba za novim antitumorskim lekovima. Steroidni molekuli igraju vrlo važne uloge u biološkim sistemima. Usled hidrofobnosti nesmetano prolaze kroz ćelijske membrane pa su pogodan polazni materijal za dizajn novih lekova. Transformacijama krutog tetracikličnog steroidnog skeleta nastaju biološki aktivni molekuli sa novim fiziološkim funkcijama. Sa druge strane, hidrazoni sadrže heteroatome i smatraju se značajnim intermedijerima pri sintezi heterocikličnih jedinjenja. Stoga je sintetisano i okarakterisano pedeset novih derivata steroidnih hidrazona, a zatim je određena njihova citotoksičnost i ispitani su mehanizmi citotoksičnog delovanja.

Prema testiranim malignim ćelijskim linijama (HeLa, K562, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS174, A549), naročito prema HeLa ćelijama adenokarcinoma cerviksa i prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije, nova jedinjenja su ispoljila selektivnu citotoksičnost zavisnu od koncentracije na mikrogramskoj skali, u mnogim slučajevima bolju od hemioterapeutika cisplatina. Nasuprot tome, pokazala su vrlo slabu citotoksičnost na humane PBMC, što se ogleda u koeficijentima selektivnosti daleko višim od vrednosti 2,5. Morfološkom analizom HeLa ćelija tretiranih novim derivatima utvrđeno je njihovo pro-apoptotsko dejstvo što je potvrđeno rezultatima protočne citometrije. Određivanjem ciljnih kaspaza ustanovljeno je da do apoptoze dolazi posredstvom kaspaze-3, -8 i -9. Svi ispitivani derivati su pokazali sposobnost da inhibiraju angiogenezu ćelija EA.hy926 in vitro. Testirani tiazolidin-4-oni nisu prouzrokovali značajne promene u nivoima ekspresije gena MMP2, MMP9 i VEGFA u tretiranim HeLa ćelijama.

Rezultati sprovedenih in vitro istraživanja mogu da ukažu na značajan antitumorski potencijal što ova jedinjenja ubraja u potencijalne kandidate za in vivo ispitivanja.

Ključne reči: steroidni hidrazoni, citotoksičnost, apoptoza, angiogeneza, ekspresija gena, ćelijski ciklus.

Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives

Marijana B. Živković

University of Belgrade – Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy,
Department of chemistry, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Republic of Serbia
Correspondence: marijana.zivkovic@ihtm.bg.ac.rs

Abstract

As malignant cells mutate over time and become resistant to existing drugs, there is a constant need for new antitumor drugs. Steroid molecules play very important roles in biological systems. Due to hydrophobicity, they pass through cell membranes unhindered, so they are a suitable starting material for the new drugs design. Biologically active molecules with new physiological functions are created by transformations of the solid tetracyclic steroid skeleton. Therefore, fifty new steroidal hydrazone derivatives were synthesized and characterized, afterwards their cytotoxicity was determined, and the mechanisms of cytotoxic action were investigated.

According to the tested malignant cell lines (HeLa, K562, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS174, A549), especially according to HeLa cells of cervical adenocarcinoma, and K562 cells of chronic myeloid leukemia, the new compounds showed concentration-dependent selective cytotoxicity on a microgram scale, in many cases better than chemotherapeutic cisplatin. In contrast, they showed very low toxicity to human PBMC, which is reflected in selectivity coefficients far higher than 2.5. By morphological analysis of HeLa cells treated with new derivatives their pro-apoptotic effect was determined, which was confirmed by the results of flow cytometry. By determining the target caspases, it was established that apoptosis is mediated by caspases-3, -8, and -9. All derivatives tested showed the ability to inhibit EA.hy926 cells angiogenesis in vitro. Thiazolidin-4-ones tested did not cause significant changes in MMP2, MMP9, and VEGFA gene expression levels in treated HeLa cells.

The results of in vitro studies may indicate significant anticancer potential, which makes these compounds potential candidates for in vivo testing.

Keywords: steroidal hydrazones, cytotoxicity, apoptosis, angiogenesis, gene expression, cell cycle

1. UVOD

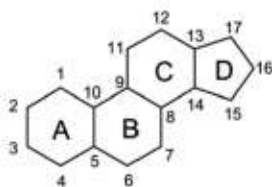
Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije rak, što po učestalosti pojavljivanja što po smrtnosti, zauzima drugo mesto na listi nezaraznih bolesti – odmah posle kardiovaskularnih oboljenja. Brza mutacija malignih ćelija i pojava rezistencije na postojeće lekove opravdavaju postojanje ogromnog broja istraživanja na polju raka i nastojanje da se pronađu novi lekovi protiv ove opake bolesti.

Steroidi predstavljaju grupu široko rasprostranjenih biološki aktivnih molekula koji imaju veoma važne uloge u biološkim sistemima. Zbog toga su transformacije krutog tetracikličnog sistema koje izazivaju promene u njihovim fiziološkim funkcijama i koje vode ka stvaranju novih biološki aktivnih molekula postale jedan od glavnih ciljeva današnje steroidne hemije. U tom pogledu naročito se ističu modifikacije koje uključuju uvođenje heteroatoma (azot, sumpor, kiseonik), novih funkcionalnih grupa i heterocikličnih prstenova.

Tako je u okviru disertacije iz koje proističe ovaj revijalni rad, u nadi da će posedovati značajan potencijal za razvijanje novih selektivnih antikancerskih agenasa, sintetisano i detaljno okarakterisano pedeset novih derivata steroidnih hidrazona, a zatim je određena njihova citotoksičnost i ispitani su mehanizmi citotoksičnog delovanja.

2. STEROIDNI MOLEKULI

Steroidi spadaju u klasu lipida sa tetracikličnim jezgrom prikazanim na **Shemi 1**. Razlikuju se po bočnim nizovima i funkcionalnim grupama koje sadrže.



Shema 1. Tetraciklično jezgro zajedničko za sve steroidne molekule

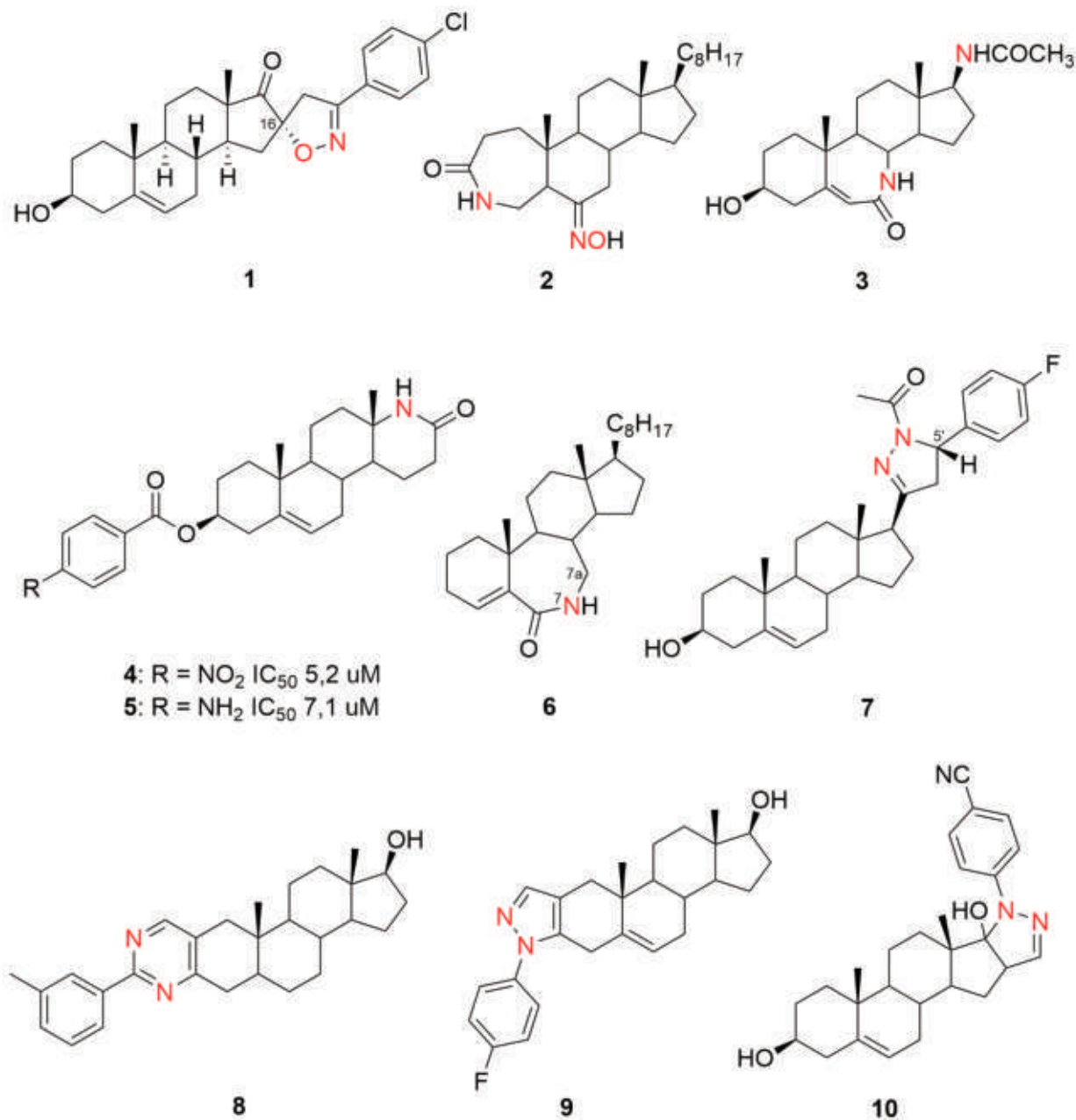
Ugljovodonični skelet steroida je hidrofoban što im omogućava neometan prolazak kroz ćelijske membrane. Upravo zbog toga predstavljaju značajan polazni skelet za dizajniranje antikancerskih lekova. Polarne funkcionalne grupe endogenih steroida, hidroksilna, fenil- ili keto-grupa, od ključnog su značaja za vezivanje steroida za receptore pri čemu njihovo prisustvo ne menja hidrofobnu prirodu steroidnog molekula kao celine [1]. Steroidni molekuli su uglavnom hormoni, osim holesterola koji ima i mnoštvo ne-hormonskih uloga, te su u telu prisutni u miligramskim količinama [2]. Ogroman interes naučne zajednice današnjice za steroidne hormone je posledica njihove uloge u kancerogenezi hormonski zavisnih tumora kao što su maligni tumori dojke, jajnika, prostate i testisa. Kako je rak kao skup oboljenja pri samom vrhu liste nezaraznih bolesti na globalnom nivou [3] opravdana su mnogobrojna nastojanja naučnika da pronađu nove antikancerske lekove.

2.1. FUNKCIONALIZACIJA STEROIDNIH MOLEKULA

Promenom strukture steroidnih molekula menjamo biološka svojstva istih. Jedan od najznačajnijih načina za funkcionalizaciju steroidnih molekula, a samim tim i za proširenje već širokog spektra bioloških aktivnosti steroida, jeste uvođenje heteroatoma (N, O, S, P), bočnih nizova koji sadrže heteroatome i heterocikličnih prstenova u steroidni skelet. Heteroatomi u krutom steroidnom skeletu igraju ulogu donora i

akceptora vodoničnih veza čime omogućavaju efikasno povezivanje sa ciljnim enzimima i receptorima. Uvođenjem heteroatoma u neki molekul menja se njegova lipofilnost ili povećava rastvorljivost u vodi čime se poboljšavaju farmakokinetička i farmaceutska svojstva tog molekula [4]. Prednosti steroidnih u odnosu na ostale hemioterapeutike su njihova visoka biodostupnost u ćeliji, manja toksičnost od ostalih i manja verovatnoća za razvoj rezistencije na veliki broj lekova (*multidrug resistance*, MDR) [5].

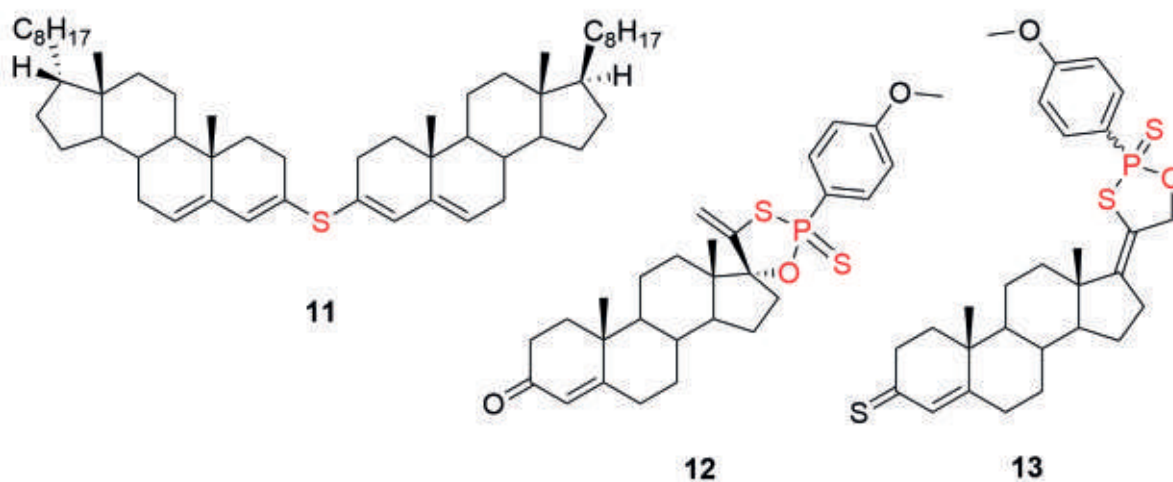
Na **Shemi 2** prikazano je nekoliko heterosteroidnih molekula iz literature za koje se ispostavilo da ispoljavaju antitumorsku aktivnost.



Shema 2. Heterosteroidi sa antikancerskom aktivnošću [6–13]

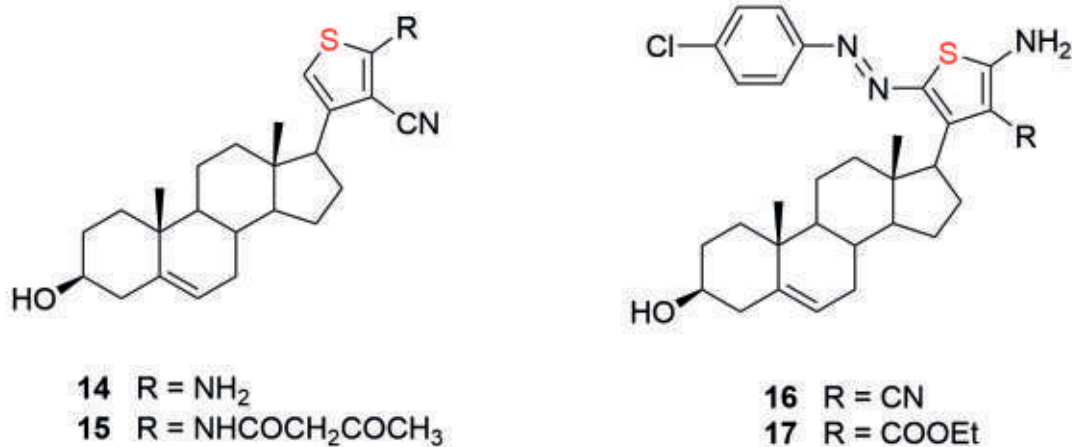
Naime, 16-spiroizoksazolin (**1**) autorke Frank i saradnika je pokazao značajnu antikancersku aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma cerviksa HeLa (IC_{50} 7,4 μ M) [6]. Huang i saradnici su sintetisali holestanski A-aza-heterosteroid (**2**) čiji se mehanizam antikanskog delovanja ogleda u pokretanju unutrašnjeg puta apoptoze u malignim ćelijama prostate [7]. Počev od 3 β -acetoksipregnenolona Koutsourea i saradnici su sinteisali B-laktam (**3**) koji karakteriše smanjena toksičnost i impresivan antikancerski potencijal prema ćelijskoj liniji leukemije P388. Ovaj heterosteroid dovodi do izlečenja 4/6 miševa podvrgnutih eksperimentu [8]. 5-Androstenski D-laktami (**4** i **5**) Dhingre i saradnika ispoljili su dobru aktivnost na humanoj ćelijskoj liniji karcinoma prostate DU-145 u odnosu na lek finasterid kao pozitivnu kontrolu [9]. B-Laktam (**6**) enamidnog tipa autorke Krstić i saradnika ispoljio je citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama na mikrogramskoj skali pri čemu je aktivacija apoptoze bila jedan od mehanizama citotoksičnog dejstva [10]. Iványi i saradnici sintetisali su aza-egzonuklearne pirazolinil-pregnenolone koji inhibiraju rast malignih ćelija za više od 90% pri čemu se ispostavilo da je 5'S-epimer jedinjenja (**7**) daleko aktivniji [11]. A-kondenzovani piri-midin (**8**) Baji-ja i saradnika ispoljio je antikancersku aktivnost prema malignim ćelijskim linijama prostate, od kojih je izuzetno značajna aktivnost prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma prostate PC-3 koja vodi poreklo od metastaza u kostima (IC_{50} 9,1 μ M) [12]. Isti autori su ustanovili da uvođenje voluminoznih heteroprstenova kondenzovanih u položaju 2,3 ili 16,17 prisutnih u jedinjenjima **9** i **10** može da dovede do redukcije ili pak eliminacije hormonskog efekta androgena. Jedinjenje **9** ispoljilo je značajnu antikancersku aktivnost prema trostruko negativnom adenokarcinomu dojke MDA-MB-231 (IC_{50} 4,5 μ M), dok je jedinjenje **10** delovalo približno istim intenzitetom na ćelijsku liniju duktalnog karcinoma dojke T47D [13].

Pored najzastupljenijih aza-heterosteroida, steroida koji sadrže azot kao heteroatom, postoji značajan broj steroidnih jedinjenja sa uvedenim atomom sumpora ili fosfora [14-17].



Shema 3. Neki sumporni i fosforni heterosteroidi [15-17]

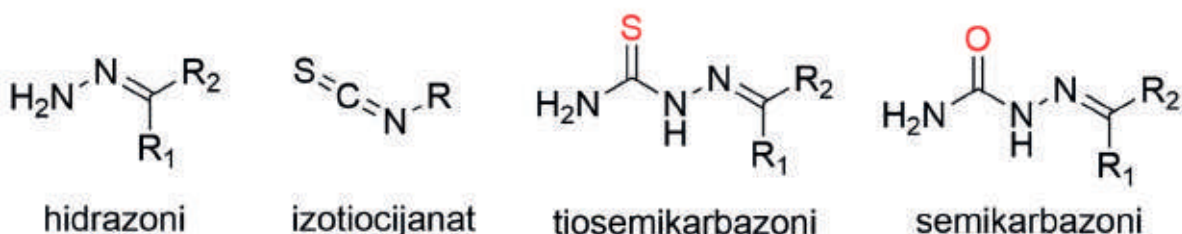
Holestanski sulfidni dimer (**11**, **Shema 3**) pokazao je dobru selektivnost za tumorske u odnosu na normalne ćelije pri čemu je citotoksična aktivnost na HeLa ćelije iznosila IC_{50} 21,2 μ M [17]. Kako u prirodi postoji mnoštvo organofosfornih jedinjenja sa značajnim biološkim aktivnostima [15] to je bio podstrek da autorka Krstić i saradnici sintetišu fosforne heterociklične derivate androst-4-ena (**12** i **13**) i ispitaju njihovu antikancersku aktivnost [15-16]. Ispostavilo se da derivat **13** sa tiokso-grupom u položaju C-3 ispoljava jaču antikancersku aktivnost prema K562 ćelijama od svog 3-okso analoga [16]. Mohareb i saradnici su sintetisali sumporne heterosteroide (**14-17**, **Shema 4**) koji se izdvajaju po svojoj antikancerskoj aktivnosti jačoj od aktivnosti doksorubicina [18].



Shema 4. Sumporni heterosteroidi sa antikancerskom aktivnošću [18]

2.2. HIDRAZONI

Hidrazoni su klasa organskih jedinjenja koja sadrže strukturni fragment prikazan na **Shemi 5**. Oni nastaju zamenom karbonilnog kiseonikovog atoma aldehida i ketona =NNH₂ grupom.

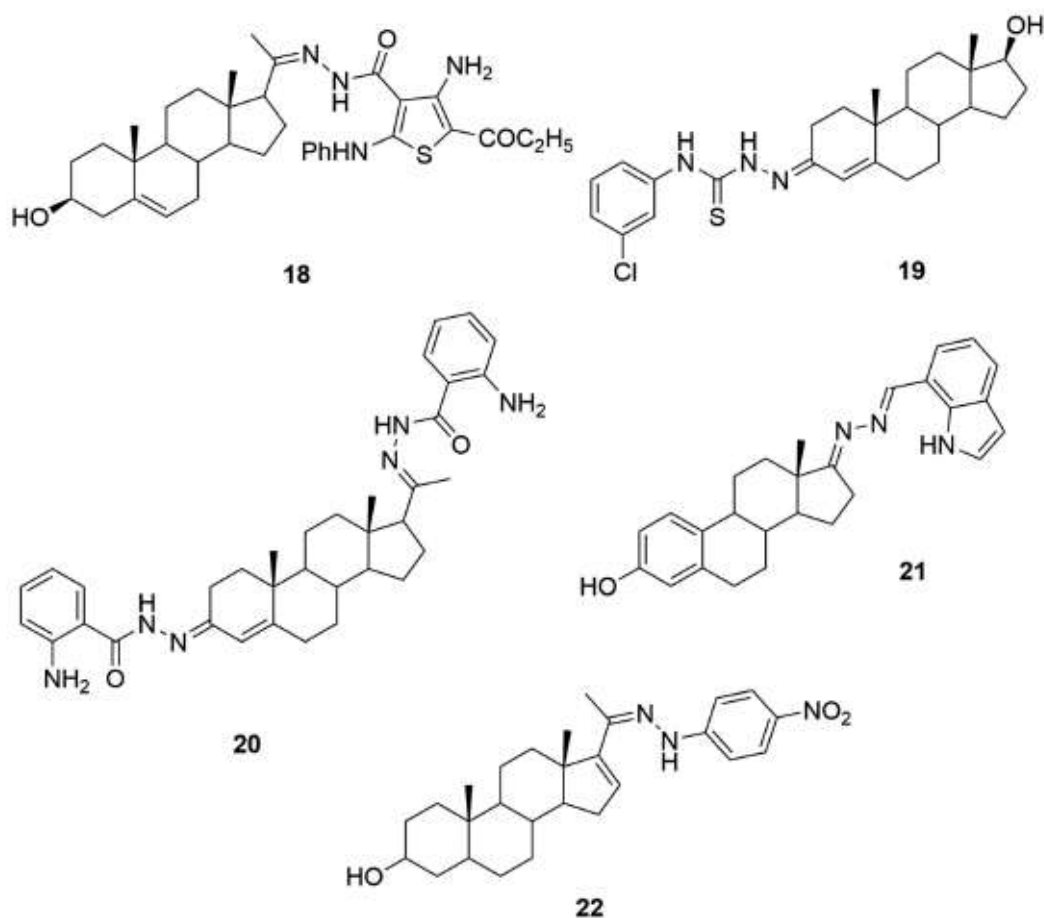


Shema 5. Opšta formula hidrazona, tiosemi- i semikarbazona

Hidrazoni se smatraju značajnim intermedijerima pri sintezi heterocikličnih jedinjenja [19]. Ispoljavaju mnoštvo različitih bioloških efekata od kojih su neki antituberkulozni [20], antifungalni [21] i antikancerski [22-24]. Dakle, hidrazoni čine važnu klasu jedinjenja za razvoj lekova čija je toksičnost svedena na minimum.

2.3. DERIVATI STEROIDNIH HIDRAZONA SA ANTITUMORSKOM AKTIVNOŠĆU

Mohareb i saradnici su sintetisali čitav niz različitih derivata steroidnih hidrazona kojima je potom određena citotoksična aktivnost. Mnoga od tih jedinjenja, među kojima i jedinjenje **18** prikazano na **Shemi 6**, ispoljila su bolju citotoksičnu aktivnost od doksorubicina na ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke MCF-7 i liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 (IC₅₀ 0,01 μM) [5]. Jabeen i saradnici su ispitali antikancerska svojstva hidrazona dobijenih iz progesterona i testosterona. Testosteronski tiosemikarbazon (**19**) bio je aktivan prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke, MCF-7 (IC₅₀ 4,8 μM), dok je progesteronski semikarbazon (**20**) pokazao značajnu aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma prostate PC-3 (IC₅₀ 4 μM) [25]. Steroidne 17-hidrazone sa heterocikličnim prstenovima u bočnom nizu sintetisali su Cui i saradnici. Od njih, jedinjenje **21**, sa indolnim prstenom u bočnom lancu, ispoljilo je citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama (IC₅₀ < 5 μM) bolju od kontrolnog citostatika, cisplatina [26]. Od serije hidrazona koje su sintetisali Nadaria i saradnici izdvaja se hidrazon (**22**) koji je na ćelijskoj liniji karcinoma pluća A549 ispoljio citotoksičnu aktivnost (IC₅₀ 17,4 μM) u rangju kontrole, etoposida [27].



Shema 6. Steroidni hidrazoni koji poseduju antikancersku aktivnost [5, 25–27]

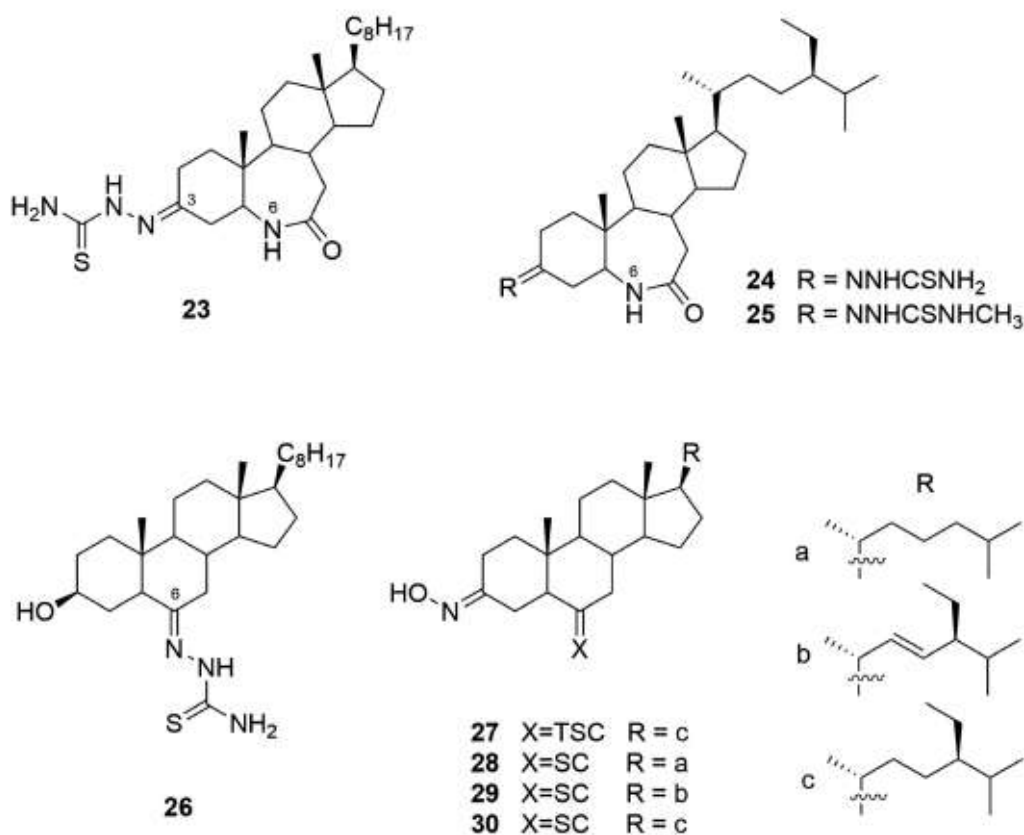
2.3.1. TIOSEMI/SEMIKARBAZONI I NJIHOVI DERIVATI

Tiosemikarbazoni i njihovi kiseonični analozi, semikarbazoni, su derivati hidrazona koji sadrže strukturne fragmente prikazane na **Shemi 5**.

Tiosemikarbazoni su vrlo korisni intermedijeri pri sintezi različitih heterocikličnih jedinjenja i helirajući su ligandi za metalne jone [28–37]. Pored toga, ispoljavaju čitav niz različitih bioloških efekata kao što su: smirujuće [38], miorelaksantsko, psihoanaleptičko i hipnotičko [39–41], antidepresivno [20], antimikrobno [21,23,42], antiameboidno [22], analgetičko, antiinflamatorno [24,43] i citotoksično dejstvo [44]. Farmakofora tiosemikarbazona sadrži izotiocijanatni motiv za koji je poznato da ima hemioprotektivno dejstvo [45].

Na **Shemi 7** su navedene strukture nekoliko steroidnih tiosemi- i semikarbazona iz literature koji su ispoljili bolju antikancersku aktivnost od hemioterapeutika cisplatina.

Tiosemikarbazon (**23**) Huang-a i saradnika bio je aktivan prema mnoštvu različitih malignih ćelijskih linija [46]. Cui i saradnici su, polazeći od sitosterola i stigmasterola, sintetisali B-homosteroidne laktame sa tiosemikarbazonskim fragmentom smeštenim u položaj C-3. Derivati sitosterola pokazali su se kao bolji citotoksični agensi od kojih su jedinjenja **24** i **25** ispoljila izuzetnu citotoksičnu aktivnost na ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma jetre, Bel-7404 (IC₅₀ 3,9 i 5,6 μM, redom) [47]. Derivati holesterola i stigmasterola, 6-tiosemi/semi-karbazoni (**26–30**) Gan-a i saradnika, takođe su ispoljili jaču citotoksičnu aktivnost od cisplatina prema Bel-7404 ćelijama [48].

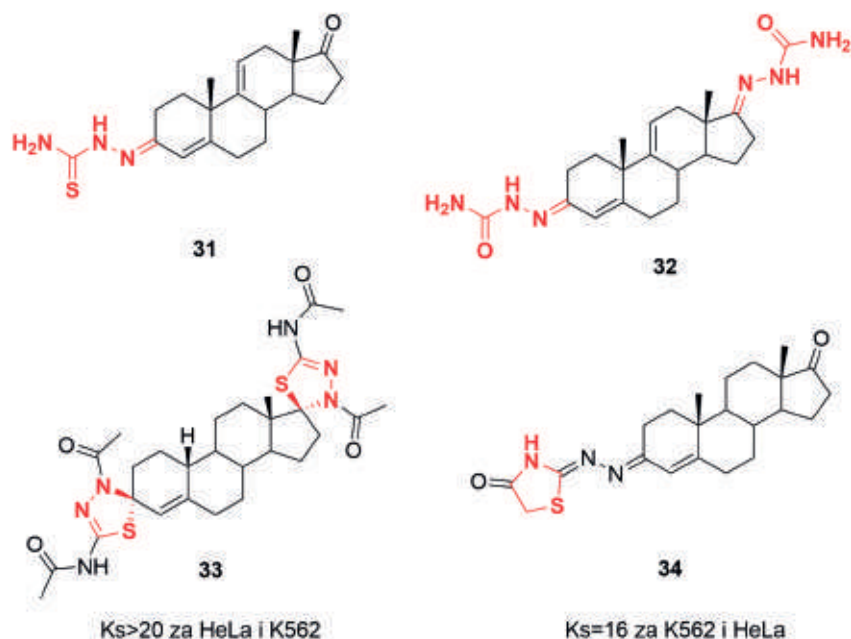


Shema 7. Steroidni tiosemi/semi-karbazoni sa antikancerskom aktivnošću [46–48]

U okviru disertacije iz koje proističe ovaj revijalni rad sintetisano je i okarakterisano pedeset novih α,β -nezasićenih steroidnih tiosemi/semi-karbazona i njihovih derivata nakon čega im je određena citotoksičnost, a potom su za najaktivnija jedinjenja ispitani mehanizmi citotoksičnog delovanja. 3-Tiosemikarbazon (**31**, Shema 8) je na tri maligne ćelijske linije, K562, MDA-MB-452 i A549, ispoljio citotoksičnost sa IC₅₀ vrednostima nižim od 10 μ M [49]. Za sintetisane semikarbazone i njihove derivate ispostavilo se da su imali daleko nižu citotoksičnu aktivnost od njihovih sumpornih analoga te je 3,17-bis(semikarbazon) (**32**) ispoljio umerenu citotoksičnost na ćelije HeLa [50].

1,3,4-Tijadiazolini, petočlani heterocikli koji sadrže dva atoma azota i atom sumpora, nastaju transformacijama tiosemikarbazona. Njihova strukturna podjedinica je sastavni deo prirodnih proizvoda kao što su hormoni, vitamini, antibiotici i alkaloidi. Literaturni podaci svedoče da tijadiazolini ispoljavaju mnoštvo različitih bioloških svojstava i ponašaju se kao analgetici, deluju antiinflamatorno, antimikrobno i antitumorski [33,51]. Novi 3,17-bis(tijadiazolin) (**33**) sintetisan u okviru ove disertacije ispoljio je citotoksičnu aktivnost prema ćelijama HeLa i K562 na mikrogramskoj skali, dok su koeficijenti selektivnosti (Ks) za navedene maligne u odnosu na zdrave ćelije iznosili preko 20 [49].

1,3-Tiazolidin-4-oni, još jedna klasa organskih jedinjenja koja nastaje ciklizacijom tiosemikarbazona, derivati su petočlanog zasićenog tiazolidina koji je u prirodi prisutan u penicilinu [52]. Vođeni ovom činjenicom istraživači sintetišu tiazolidinone i ispituju njihov biološki profil. Tako su iz ove disertacije proistekle dve serije novih steroidnih tiazolidinona, među kojima je i jedinjenje **34**, koji su ispoljili izuzetnu citotoksičnost prema ispitivanim malignim ćelijskim linijama i imali Ks vrednosti daleko više od vrednosti 2,5 [53].

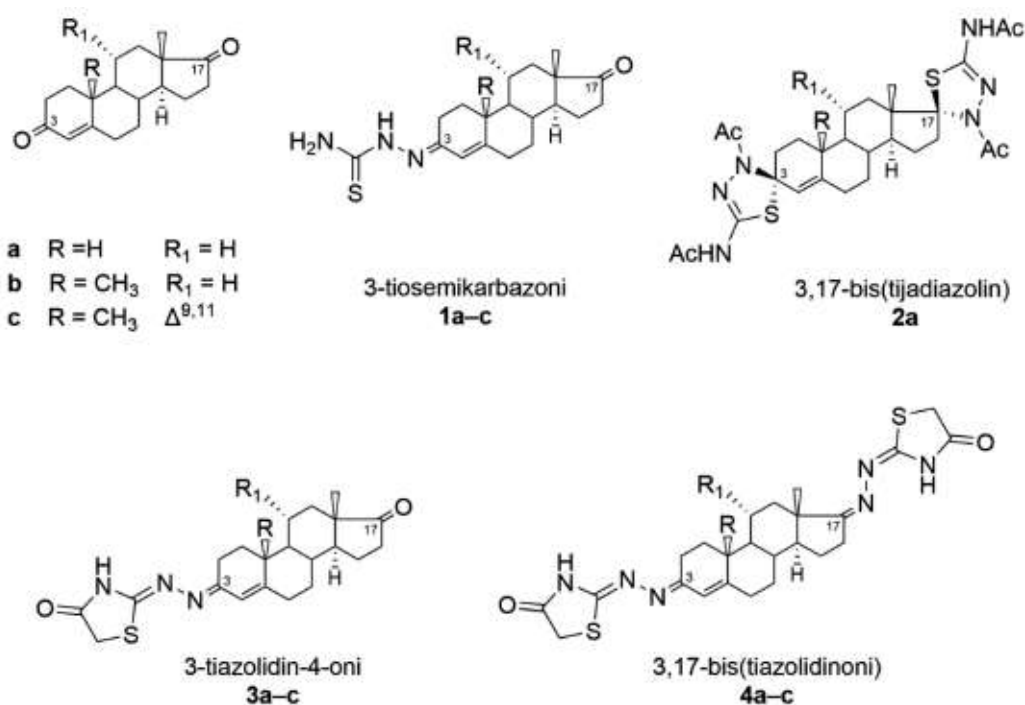


Shema 8. Tiosemi/semi-karbazoni i njihovi derivati sintetisani u okviru disertacije koji ispoljavaju citotoksičnu aktivnost [49,50,53]

3. CITOTOKSIČNOST I MEHANIZMI CITOTOKSIČNOG DELOVANJA

3.1. Citotoksična aktivnost novih derivata steroidnih hidrazona

Za sva nova jedinjenja urađena je *in vitro* citotoksična aktivnost na humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), K562 (hronična mijeloidna leukemija), MDA-MB-361 (adenokarcinom dojke), MDA-MB-453 (karcinom dojke), LS174 (adenokarcinom kolona) i A549 (karcinom pluća). Pored toga, citotoksičnost ovih jedinjenja ispitana je i na normalnim humanim fibroblastima pluća, MRC-5 [49,53]. Dobile IC₅₀ vrednosti za odabrana jedinjenja čije su strukture prikazane na **Shemi 9** nalaze se u **Tabeli 1**.



Shema 9. Strukture novih jedinjenja koja su ispoljila najbolju citotoksičnost na ispitivanim malignim ćelijskim linijama [49,53]

Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)						
	HeLa	K562	MDA-MB-361	MDA-MB-453	LS174	A549	MRC-5
1a	18,1 ± 3,3	11,3 ± 2,2	144,1 ± 36,6	44,4 ± 2,9	61,3 ± 13,0	10,3 ± 0,7	7,7 ± 1,1
1b	7,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2	20,7 ± 6,0	6,8 ± 0,2	35,2 ± 11,6	8,9 ± 0,5	6,5 ± 0,1
1c	17,3 ± 6,8	6,7 ± 0,3	18,7 ± 8,9	6,9 ± 0,3	26,2 ± 6,0	9,5 ± 0,5	7,2 ± 1,3
2a	7,8 ± 0,3	8,8 ± 1,3	> 200	11,0 ± 1,9	12,6 ± 3,8	20,6 ± 1,3	12,7 ± 2,0
cisplatin	2,1 ± 0,2	5,4 ± 0,3	17,1 ± 1,2	3,6 ± 0,5	17,8 ± 0,6	14,4 ± 0,7	9,2 ± 0,2
3a	8,9 ± 1,9	8,8 ± 1,1	12,7 ± 2,0	23,7 ± 2,7	48,2 ± 4,9	22,3 ± 4,7	62,7 ± 6,2
3b	10,7 ± 2,5	8,7 ± 1,1	25,6 ± 4,6	23,8 ± 1,7	49,7 ± 0,5	49,5 ± 0,6	44,8 ± 7,3
3c	9,5 ± 0,9	8,8 ± 1,2	19,6 ± 2,2	26,2 ± 2,7	51,3 ± 3,2	40,4 ± 7,5	49,9 ± 9,3
4a	13,5 ± 0,1	8,9 ± 1,1	36,0 ± 6,3	30,9 ± 6,2	42,6 ± 6,4	25,3 ± 4,0	58,1 ± 2,6
4b	12,9 ± 2,9	10,5 ± 1,3	30,2 ± 7,3	37,3 ± 2,5	21,8 ± 5,1	27,6 ± 7,2	53,4 ± 9,0
4c	11,2 ± 1,6	9,6 ± 1,7	24,6 ± 0,4	33,5 ± 6,3	47,8 ± 3,9	24,9 ± 0,2	48,8 ± 1,6
cisplatin	5,2 ± 0,5	5,7 ± 0,6	21,5 ± 1,5	6,5 ± 0,5	18,6 ± 2,0	17,4 ± 1,8	13,0 ± 1,7

Tabela 1. *In vitro* citotoksičnost novih steroidnih tiosemikarbazona (**1a–c**) i njihovih derivata, tijadiazolina **2a** i tiazolidin-4-ona (**3a–c**, **4a–c**) [49,53].

3-Tiosemikarbazoni **1b** i **1c** su na K562 ćelije ispoljili citotoksičnost u rangu hemioterapeutika cisplatina koji je služio kao pozitivna kontrola (IC₅₀ < 10 μM). Derivat **1b** ispoljio je dobru citotoksičnost na HeLa ćelije, dok su preostala dva jedinjenja ove serije ispoljila umerenu aktivnost. Na MDA-MB-361 ćelije dva tiosemikarbazona su ispoljila citotoksičnost u rangu cisplatina. Kada su u pitanju ćelije MDA-MB-453, na njima su dva derivata ovog tipa ispoljila citotoksičnost nižu od 10 μM, ali su bila duplo manje citotoksična od cisplatina. Slabu citotoksičnu aktivnost tiosemikarbazoni su ispoljili na ćelijama LS174. Tiosemikarbazoni su bili izuzetno citotoksični na ćelije A549, jače od cisplatina, ali su bili još jače citotoksični na normalne humane fibroblasti pluća MRC-5 što znači da izostaje selektivnost za maligne u odnosu na zdrave ćelije. Ipak, i cisplatin, hemioterapeutik koji se decenijama koristi za lečenje mnogih tipova malignih tumora, uključujući i karcinom pluća, bio je jednako neselektivan za A549 ćelije u odnosu na MRC-5 ćelije.

3,17-Bis(tijadiazolin) **2a** se pokazao kao citotoksičan za K562, HeLa i MDA-MB-453 ćelije dok za drugu ćelijsku liniju raka dojke, MDA-MB-361, nije bio citotoksičan. Na ćelije LS174 pomenuti tijadiazolin je bio citotoksičan jače od cisplatina. Dobra citotoksičnost na ćelije A549 ostaje u senci činjenice da je jedinjenje **2a** još jače citotoksično za normalne ćelije MRC-5.

3-Tiazolidin-4-oni su na K562 i HeLa ćelije ispoljili citotoksičnost sa IC₅₀ vrednostima od oko 10 μM. Derivati **3a** i **3c** su na ćelije MDA-MB-361 ispoljili citotoksičnu aktivnost bolju od cisplatina, a **3b** u rangu cisplatina. Na preostale testirane maligne ćelijske linije, MDA-MB-453, LS174 i A549, tiazolidinoni su ispoljili umerenu, slabu, odnosno slabu do umerenu citotoksičnost, redom.

3,17-Bis(tiazolidin-4-oni) su bili citotoksični na HeLa i K562 ćelije dok su na ostale ćelije bili umereno aktivni. Umerena citotoksičnost utvrđena je i za A549 ćelije, ali je bila duplo jača na maligne u odnosu na zdrave humane MRC-5 ćelije.

Ukupno uzevši, K562 i HeLa ćelije su bile najosetljivije na citotoksičnost novih derivata steroidnih hidrazona zbog čega je ispitivanje mehanizama citotoksičnog delovanja istih rađeno upravo na tim ćelijama.

Sumiranjem prikazanih rezultata može da se dođe do zaključka da su α,β-nezasićeni supstituenti u C-3 položaju tiosemikarbazona ili tiazolidin-4-ona, spiro-heterociklični prsten ili okso-grupa u položaju C-17 i tiazolidinonski prsten u poziciji C-17 strukturni fragmenti koji su u najvećoj meri odgovorni za citotoksičnu aktivnost novosintetisanih steroidnih hidrazona i njihovih derivata.

3.2. Ispitivanje citotoksičnosti na PBMC

Derivati steroidnih hidrazona koji su ispoljili najviši intenzitet citotoksične aktivnosti na ispitivanim malignim ćelijskim linijama odabrani su za dalja ispitivanja citotoksičnosti na normalnim humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (*eng. Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), pri čemu je kao pozitivna kontrola korišćen hemioterapeutik cisplatin (**Tabela 2**). Na osnovu ovih rezultata tiosemikarbazoni (serija **1**), nasuprot preostalim testiranim jedinjenjima, ispoljavaju umerenu do dobru citotoksičnost na PBMC.

Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)	Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)
	PBMC ^a		PBMC ^a
1a	44,1 ± 13,7	3a	145,8 ± 2,5
1b	15,7 ± 3,0	3b	>200
1c	24,9 ± 14,8	3c	123,4 ± 4,4
2a	>200	4a	188,8 ± 15,9
/	/	4b	87,1 ± 0,5
/	/	4c	>200
Cisplatin	60,8 ± 12,6	Cisplatin	71,3 ± 8,20

^aIz četiri nezavisna eksperimenta (zdravi donori krvi)

Tabela 2. *In vitro* citotoksičnost prema PBMC za najaktivnije tiosemikarbazone (**1a–c**), tijadiazolin **2a** i tiazolidin-4-one (**3a–c**, **4a–c**) [49,53].

Jasnije značenje rezultata ovog eksperimenta dobija se uvidom u izračunate koeficijente selektivnosti (Ks), odnose IC₅₀ vrednosti dobijenih za normalne PBMC i maligne ćelijske linije, što je prikazano u **Tabelama 3 i 4**.

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC/ HeLa	PBMC/ K562	PBMC/ MDA-MB-361	PBMC/ MDA-MB-453	PBMC/ LS174	PBMC/ A549
1a	2,4	3,9	0,3	1,0	0,7	4,3
1b	2,1	2,4	0,8	2,3	0,5	1,8
1c	1,4	3,7	1,3	3,6	1,0	2,6
2a	>25,5	>22,8	> 1	>18,1	> 15,9	> 9,7
Cisplatin	28,9	11,3	3,6	16,9	3,4	4,2

Tabela 3. Koeficijent selektivnosti (Ks) u citotoksičnom dejstvu mono-tiosemikarbazona **1a–c** i bis(tijadiazolina) **2a** u odnosu na PBMC [49].

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC/ HeLa	PBMC/ K562	PBMC/ MDA-MB-361	PBMC/ MDA-MB-453	PBMC/ LS174	PBMC/ A549
3a	16,3	16,6	11,5	6,2	3	6,5
3b	> 18,6	> 23	> 7,8	> 8,4	> 4	> 4,0
3c	13	14	6,3	4,7	2,4	3,1
4a	14	21,3	5,2	6,1	4,4	7,5
4b	6,7	8,3	2,9	2,3	4,0	3,2
4c	> 17,8	> 20,8	> 8,1	> 6	> 4,2	> 8,0
Cisplatin	13,6	12,6	3,3	11,1	3,8	4,1

Tabela 4. Koeficijent selektivnosti (Ks) u citotoksičnom dejstvu odabranih tiazolidin-4-ona, jedinjenja **3a–c** i **4a–c** u odnosu na PBMC [53]

Naime, smatra se da ukoliko su vrednosti koeficijenata selektivnosti iznad 2,5 jedinjenja za koja su isti dobijeni svrstavaju se u grupu onih jedinjenja koja imaju potencijal da se, u cilju dalje procene njihove antitumorske efikasnosti, ispituju *in vivo*.

Tiosemikarbazoni (serija **1**, **Tabela 3**) [49] su pokazali višu citotoksičnost na HeLa, K562, MDA-MB-453 i A549 ćelije u odnosu na normalne PBMC, dok za LS174 ćelije to ne važi. Jedinjenje **1a** je za K562 i A549 ćelije imalo Ks vrednosti iznad 2,5, dok je za jedinjenje **1c** to važno i za MDA-MB-453 ćelije.

Ks dobijeni za najbolji od testiranih bis(tijadiazolina), jedinjenje **2a**, ukazuju na višu citotoksičnu aktivnost na sve ispitane maligne ćelijske linije u odnosu na normalne PBMC. Ks ovog derivata su za sve ćelijske linije osim za MDA-MB-361 veći od 2,5 i imaju najviše vrednosti od svih novih derivata, tačnije kreću se u intervalu 9,7–25,5, što ovo jedinjenje ubraja u grupu potencijalnih kandidata za *in vivo* ispitivanja antikancerske aktivnosti.

Kada su u pitanju tiazolidin-4-oni (**Tabela 4**) [53], sva ispitivana jedinjenja ispoljila su viši intenzitet citotoksične aktivnosti na sve maligne ćelijske linije, naročito na HeLa, K562, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, u odnosu na PBMC. Selektivnost pri antikancerskoj aktivnosti tiazolidin-4-ona bila je veoma visoka, u velikom broju slučajeva bolja nego za cisplatin, pri čemu su HeLa i K562 ćelijske linije bile najosetljivije na citotoksične efekte ove klase jedinjenja. Pored toga, jedinjenja **3a**, **3b**, **4a** i **4c** su takođe ispoljila vrlo dobru selektivnost pri antikancerском delovanju na humane ćelijske linije kancera dojke, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, kao i na ćelije karcinoma pluća A549.

Efikasno i selektivno ubijanje malignih ćelija uz ispoljavanje minimalne toksičnosti na normalne ne-transformisane ćelije, a naročito na ćelije imunskog sistema koje učestvuju u antikancerском imunskom odgovoru, izuzetno su važna svojstva pri razvoju novih antikancerских lekova. Stoga, vrlo dobra selektivnost pri citotoksičnom delovanju ispitivanih derivata steroidnih hidrazona za humane maligne ćelijske linije (posebno za K562 i HeLa ćelije) u poređenju sa normalnim humanim PBMC, ukazuje na značajan antikancerški potencijal ovih jedinjenja, koji bi trebalo dalje da se ispituje *in vivo*.

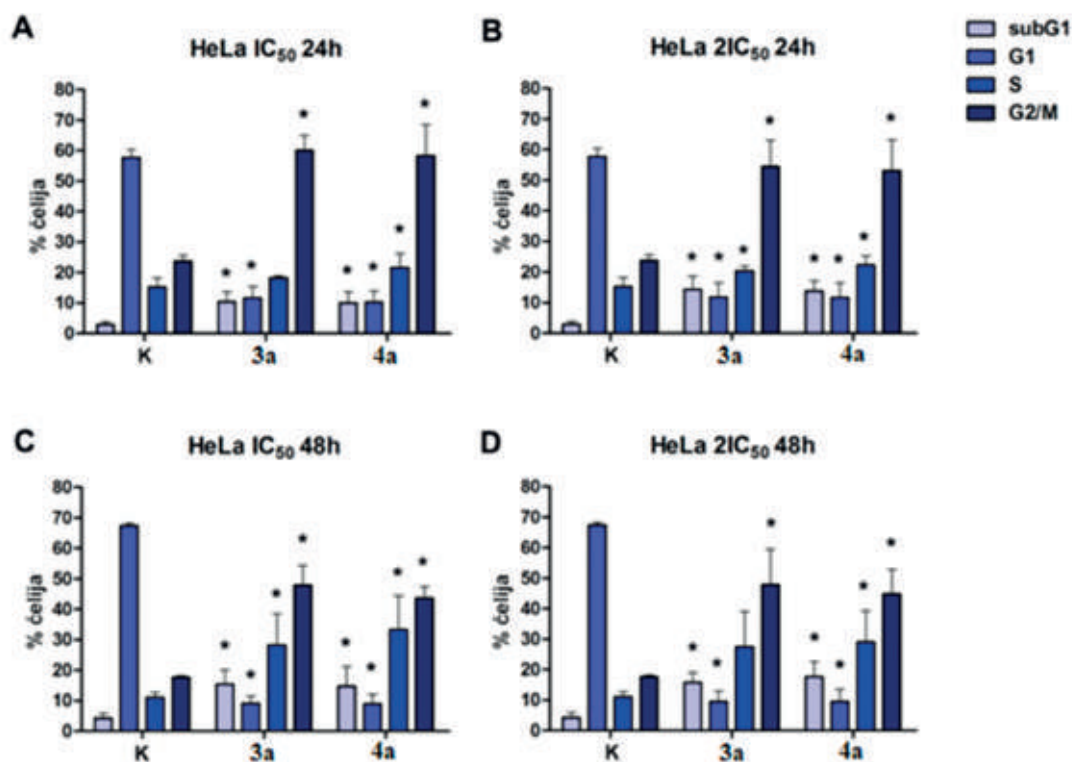
3.3. Promene u distribuciji HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

S ciljem da se rasvetle mehanizmi citotoksičnog delovanja novih steroidnih derivata ispitivane su promene u raspodeli HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nastale kao posledica tretiranja ćelija IC₅₀ i dvostrukim IC₅₀ koncentracijama jedinjenja **3a** i **4a** u trajanju od 24 i 48 h [53].

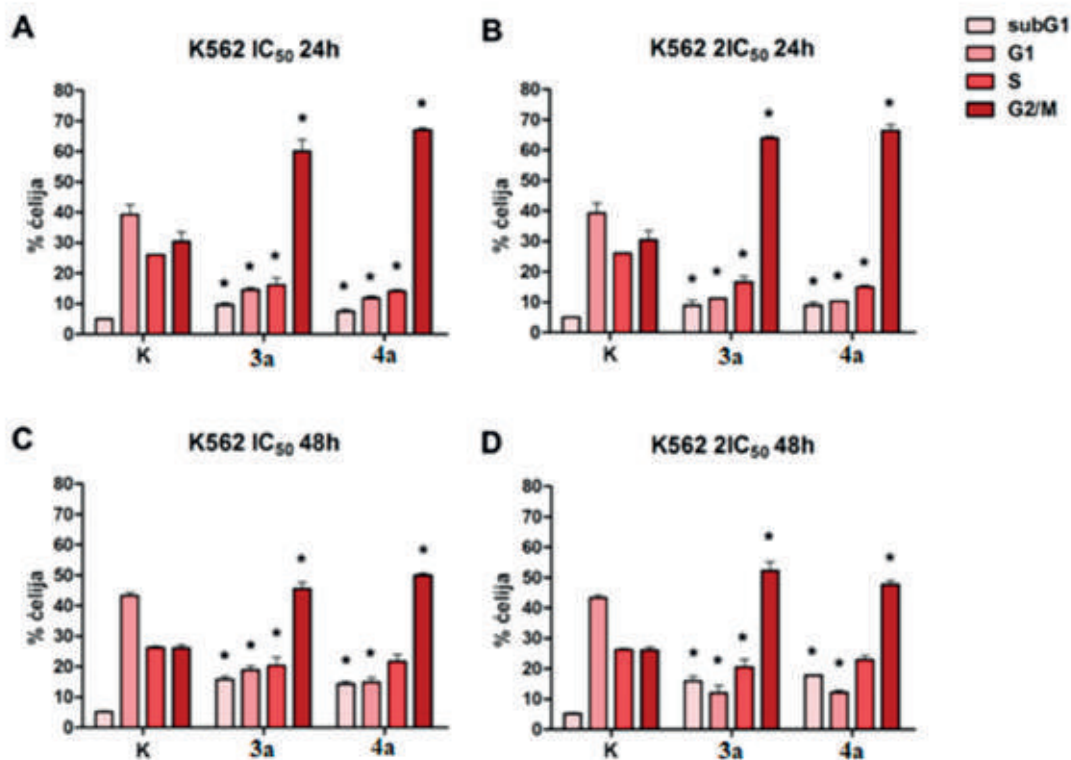
Oba ispitana derivata steroidnih hidrazona, bilo da su primenjeni u IC₅₀ ili 2IC₅₀ koncentracijama pri periodu inkubiranja od 24 ili 48 h, dovela su do promena u distribuciji HeLa i K562 ćelija po određenim fazama ćelijskog ciklusa.

Tiazolidin-4-oni **3a** i **4a** primenjeni pri IC₅₀ i dvostrukim IC₅₀ koncentracijama u trajanju od 24 h ili 48 h indukovali su statistički značajno povećanje procenta HeLa ćelija u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim uzorkom ćelija (**Slika 1**). Ove promene su praćene značajnim smanjenjem procenta tretiranih HeLa ćelija u G1 fazi. Pored toga, izloženost jedinjenju **3a** 2IC₅₀ koncentraciji u trajanju od 24 h i IC₅₀ koncentraciji u trajanju od 48 h dovela je do značajne akumulacije HeLa ćelija u S fazi, dok je statistički značajno povećanje procenta ćelija u S fazi primećeno u HeLa ćelijama tretiranim sa obe koncentracije jedinjenja **4a** u trajanju od 24 h ili 48 h.

U ćelijama humane mijeloidne leukemije K562 tretman IC₅₀ i 2IC₅₀ koncentracijama mono-tiazolidin-4-ona **3a** u trajanju od 24 h i 48 h prouzrokovao je statistički značajno povećanje procenta ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, kao i značajno povećanje u G2/M fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim ćelijama (**Slika 2**). Takođe je evidentirano i značajno smanjenje procenta K562 ćelija u fazama G1 i S. Bis(tiazolidin-4-on) **4a** u obe primenjene koncentracije doveo je do značajne akumulacije K562 ćelija u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Pored toga, primećen je i statistički značajan pad procenta K562 ćelija u G1 fazi, dok je redukovani broj ćelija u S fazi bio statistički značajan samo ukoliko je tretman trajao 24 h.



Slika 1. Promene u distribuciji HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Analiza ćelijskog ciklusa je vršena na HeLa ćelijama koje su bile tretirane IC₅₀ ili 2IC₅₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** [53] u trajanju od 24 ili 48 h. Rezultati eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Za statističku obradu podataka je korišćen program ANOVA pri čemu su statistički značajne vrednosti ($p < 0,05$) označene zvezdicom (*).



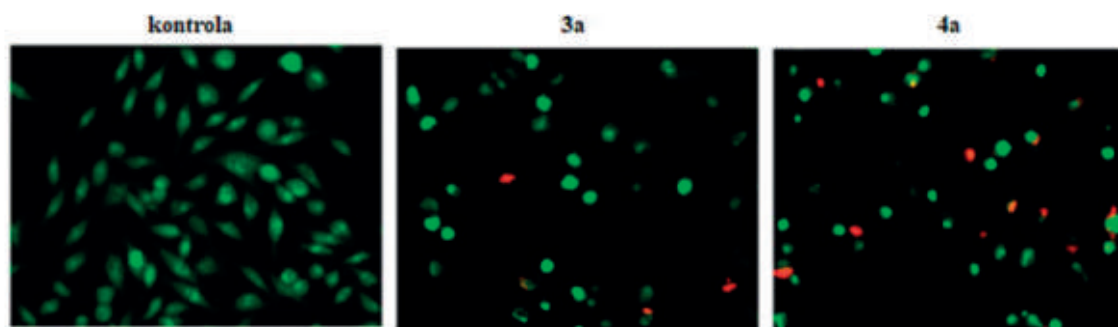
Slika 2. Promene u distribuciji K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Analiza ćelijskog ciklusa je vršena na K562 ćelijama tretiranim IC₅₀ ili 2IC₅₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** [53] u trajanju od 24 ili 48 h. Rezultati eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Program ANOVA je korišćen za statističku obradu podataka pri čemu su statistički značajne vrednosti ($p < 0,05$)

3.4. Detekcija tipa ćelijske smrti HeLa ćelija

3.4.1. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti fluorescentnom mikroskopijom

Tip ćelijske smrti koju indukuju jedinjenja **3a** i **4a** na HeLa ćelijama ispitan je morfološkom analizom fluorescentnom mikroskopijom ciljnih ćelija obojenih smešom boja akridin-oranž i etidijum-bromid (**Slika 3**). Kao pozitivna kontrola korišćen je hemioterapeutik cisplatin [53].

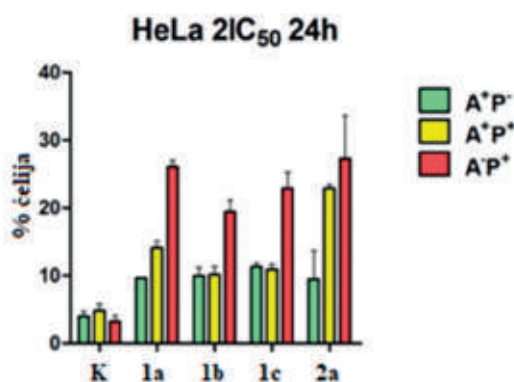
Na fotomikrografijama HeLa ćelija koje su bile tretirane $2IC_{50}$ koncentracijama (određene MTT testom nakon 72 h delovanja) steroidnih jedinjenja u trajanju od 24 h mogla su da se uoče tipična morfološka obeležja apoptoze - skupljanje ćelija, kondenzacija hromatina, smanjivanje i fragmentacija nukleusa, prisustvo narandžasto-crvenoobojenih ćelija u kasnoj fazi apoptoze ili sekundarne nekroze. Kružni oblik HeLa ćelija koji je zapažen pri tretmanu jedinjenjima **3a** i **4a** jednim delom je uzrokovan i zaustavljanjem u G2/M fazi ćelijskog ciklusa o čemu svedoči eksperiment analize ćelijskog ciklusa.



Slika 3. Indukovanje apoptoze HeLa ćelija tiazolidin-4-onima **3a** i **4a** [53].

3.4.2. Detekcija tipa ćelijske smrti protočnom citometrijom

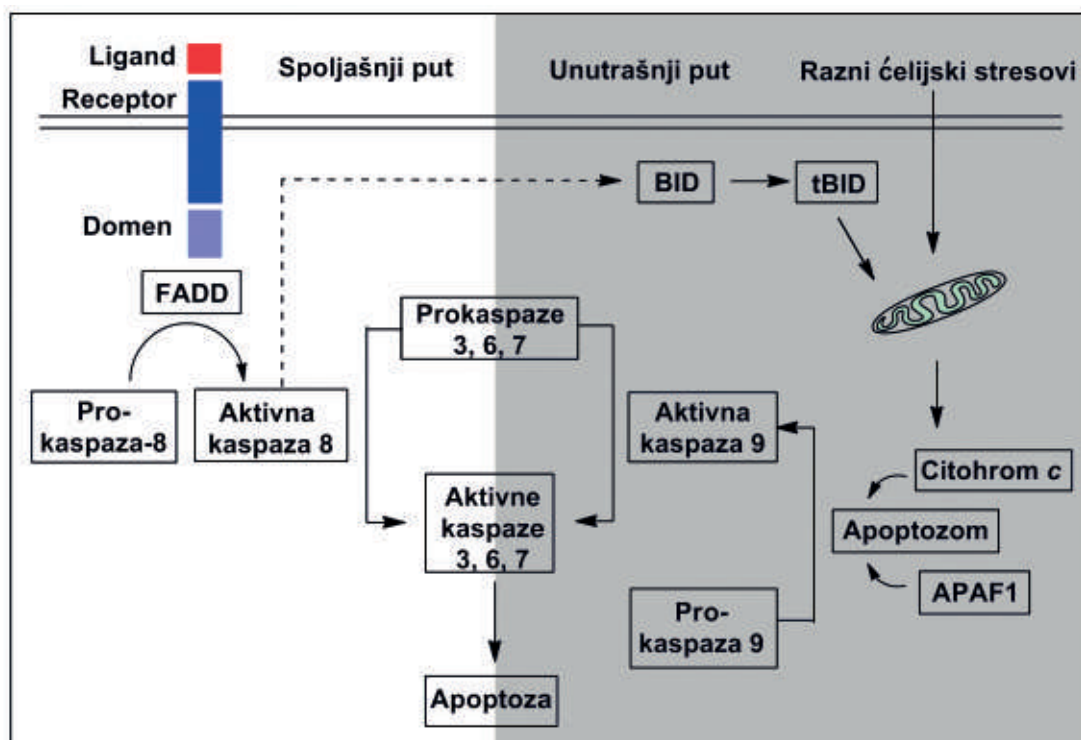
Identifikacija HeLa ćelija u različitim stadijumima apoptoze indukovane ispitivanim steroidnim derivatima urađena je protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija smešom boja aneksin V–FITC (A) i propidijum-jodid (P) [49]. Frakcija živih ćelija (A^-P^-) koja nije prikazana na **Slici 4** najzastupljenija je u netretiranim kontrolnim ćelijama. Tretman HeLa ćelija $2IC_{50}$ koncentracijama ovih steroidnih derivata je doveo do povećanja procenta ćelija u ranoj fazi apoptoze (A^+P^-), ćelija u kasnoj fazi apoptoze ili sekundarne nekroze, (A^+P^+), kao i mrtvih ćelija (A^-P^+). Dakle, ovaj eksperiment je pokazao da novosintetisana jedinjenja prouzrokuju apoptozu HeLa ćelija.



Slika 4. Analiza protočnom citometrijom kontrolnih i tretiranih HeLa ćelija obojenih aneksin V FITC-om i propidijum-jodidom. HeLa ćelije su bile tretirane $2IC_{50}$ koncentracijama steroidnih tiosemikarbazona **1a–c** i tijadiazolina **2a** u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ S.D. dva nezavisna eksperimenta [49].

3.5. Određivanje ciljnih kaspaza

Kaspaze, aspartat-specifične cistein-proteaze, izuzetno su značajni učesnici signalnih puteva apoptoze. Proizvode se u obliku neaktivnih monomernih prokaspaza koje zahtevaju dimerizaciju i razlaganje za aktivaciju. Od apoptotskih kaspaza -3, -8 i -9, kaspaze -8 i -9 su inicijatorske, dok je kaspaza-3 jedna od glavnih egzekutorskih (efektorskih) kaspaza. Kaspaza-8 je učesnik spoljašnjeg puta apoptoze kojeg pokreću ligandi koji se vezuju za receptore smrti. Kao posledica raznih ćelijskih stresova mitohondrije otpuštaju citohrom c, formira se apoptozom i na taj način se pokreće unutrašnji ili mitohondrijski put apoptoze posredstvom kaspaze-9 (**Slika 5**) [54,55].

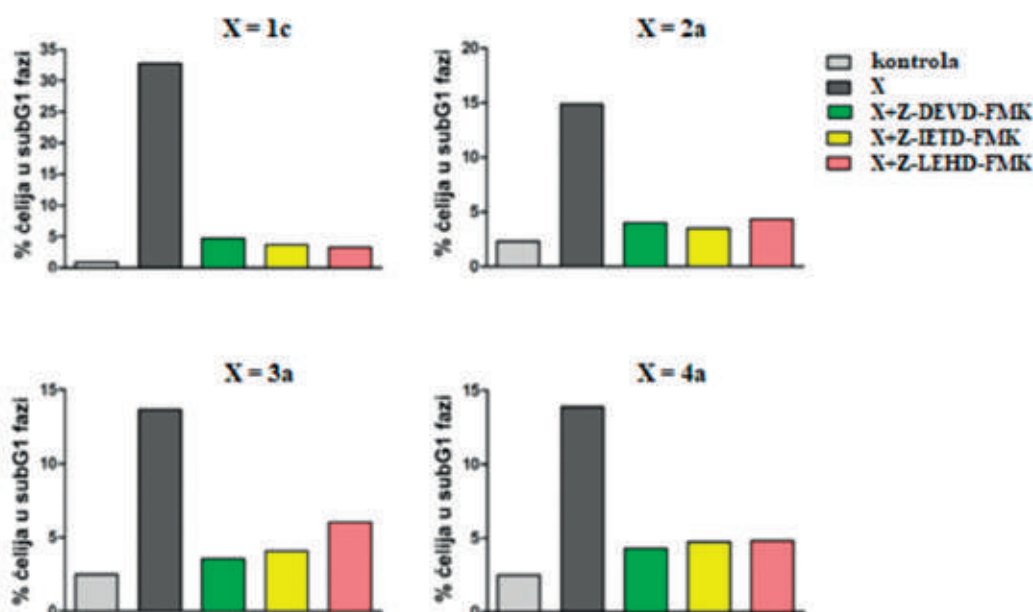


FADD – domen smrti povezan sa ligandom Fas; APAF1 – apoptotski proteazno aktivirajući faktor 1;
 BID – proapoptotski Bcl-2 protein koji sadrži samo BH₃ domen; tBID – kaspazom-8 aktivirani BID

Slika 5. Spoljašnji i unutrašnji put apoptoze

Odgovor na pitanje koje od apoptotskih kaspaza-3, -8 i -9 učestvuju u indukciji apoptoze HeLa ćelija izloženih dejstvu sintetisanih derivata steroidnih hidrazona dobijen je upotrebom specifičnih inhibitora tih kaspaza, fluormetil-ketoni derivatizovanih peptida, Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze-9) pri čemu je meren procenat HeLa ćelija u subG1 fazi, odnosno procenat apoptotskih ćelija (**Slika 6**).

Za svako od ispitivanih steroidnih jedinjenja pokazano je značajno smanjenje procenta HeLa ćelija u subG1 fazi u uzorcima koji su prvo tretirani specifičnim inhibitorom kaspaze-3, -8 ili -9, a zatim tretirani 2IC₅₀ koncentracijom jedinjenja, u odnosu na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi u uzorcima koji su tretirani samo jedinjenjem. Dakle, upotrebom bilo kojeg od tri korišćena inhibitora kaspaza povećano je preživljavanje HeLa ćelija što je dokaz da su ispitivana jedinjenja sposobna da posredstvom kaspaza aktiviraju kako spoljašnji tako i unutrašnji put apoptoze.



Slika 6. Određivanje ciljnih kaspaza, učesnika u signalnim putevima apoptoze, indukovano najaktivnijim derivatima steroidnih hidrazona. Efekat primene specifičnih inhibitora kaspaza (Z-DEVD-FMK – inhibitor kaspaze-3; Z-IETD-FMK – inhibitor kaspaze-8; Z-LEHD-FMK – inhibitor kaspaze-9) na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretiranja 2IC50 koncentracijama novih derivata [49, 53].

3.6. *In vitro* test za angiogenezu ili test građenja cevi od endotelih ćelija

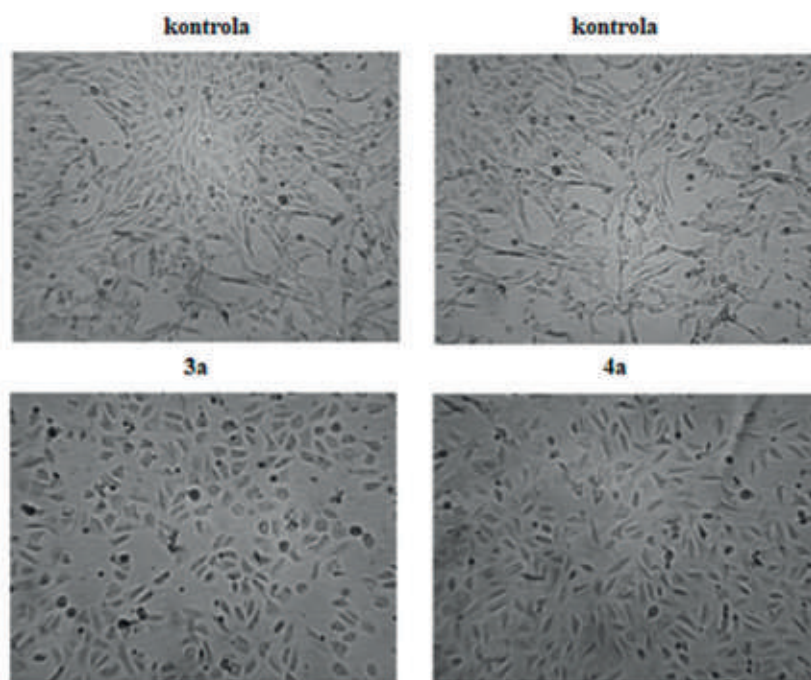
Kako bi maligna ćelija neometano dopremila nutrijente i kiseonik potrebne za opstanak ona teži da proširi i razgrana mrežu krvnih sudova odnosno započinje proces angiogeneze. Novonastali krvni sudovi su strukturno neorganizovani, prošireni i propustljivi tako da povećavaju verovatnoću metastaziranja tumora. Pored toga, luče materije koje sprečavaju proces apoptoze. Stoga je jedna od strategija borbe protiv malignih tumora upravo inhibiranje procesa angiogeneze. Inhibitori angiogeneze su manje toksični od standardno korišćenih hemioterapeutika i koriste se paralelno uz operaciju, hemioterapiju ili zračenje [1].

Kada se humane endotelne ćelije pupčane vene, EA.hy926 ćelije, zaseju na površinu matriksnog matrigela one počinju da se šire, povezuju i reorganizuju tako da formiraju tubularne strukture nalik na kapilare i poligonalne strukture [56]. Ovaj esej primenjuje se za ispitivanje sposobnosti jedinjenja da inhibira proces angiogeneze *in vitro* odnosno za ispitivanje antiangiogenetskog potencijala jedinjenja.

Reprezentativne fotomikrografije kontrolnih EA.hy926 ćelija i ćelija izloženih dvadesetočasovnom delovanju suptoksičnih IC₂₀ koncentracija novih najaktivnijih i najselektivnijih steroidnih derivata, tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** [53], prikazane su na **Slici 7**.

Svi ispitivani derivati su pokazali sposobnost da inhibiraju angiogenezu EA.hy926 ćelija *in vitro*.

In vitro esej angiogeneze ukazao je na antiangiogenetske efekte tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** primenjenih pri niskim suptoksičnim koncentracijama. Oba tiazolidin-4-ona inhibirala su širenje i povezivanje EA.hy926 ćelija kao i formiranje tubularnih struktura što svedoči o njihovom antiangiogenetskom potencijalu.



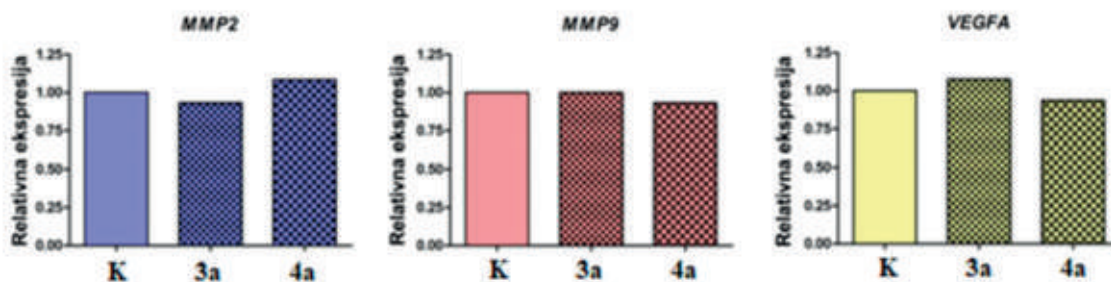
Slika 7. Efekti derivata steroidnih hidrazona na *in vitro* angiogenezu EA.hy926 ćelija. Fotomikrografije kontrolnih EA.hy926 ćelija i ćelija izloženih suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** u trajanju od 20 h.

3.7. Efekat steroidnih derivata na ekspresiju gena u HeLa ćelijama

Matriksne metaloproteinaze (MMP) su familija cink-zavisnih proteinaza čiji su predstavnici MMP-2 i MMP-9. Ovi proteini se aktiviraju hidrolizom. Geni *MMP-2* i *MMP-9* kodiraju enzime koji vrše degradaciju kolagena tipa IV, glavne strukturne komponente bazalne membrane, i samim tim utiču na svojstva bazalne membrane da ometa pokretljivost malignih ćelija. Istraživanja su pokazala da MMP-2 i MMP-9 igraju ključnu ulogu u degradaciji ekstracelularnog matriksa kao i u promovisanju invazije tumora i metastaziranja [57].

Kako bi maligna ćelija obezbedila kiseonik i nutrijente neophodne za opstanak i rast, ona formira mrežu kapilara iz postojećih krvnih sudova odnosno aktivira proces angiogeneze. *VEGFA* je gen koji kodira protein vaskularnog endotelnog faktora rasta A. Spada u najmoćnije specifične angiogene faktore, a aktivan je u formi glikozilovanog homodimernog proteina. *VEGFA* inhibira apoptozu i dovodi do proliferacije endotelinih ćelija, njihove migracije, organizovanja u tubule i povećanja permeabilnosti što su sastavni delovi angiogene kaskade [58].

U cilju istraživanja antimetastatskih i antiangiogenetskih svojstava novih steroidnih tiazolidin-4-onskih derivata **3a** i **4a**, ispitan je njihov uticaj na ekspresiju gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u HeLa ćelijama. Poređen je nivo ekspresije kontrolnih gena kod HeLa ćelija tretiranih steroidnim tiazolidin-4-onima (**Slika 8**). Tretman jedinjenjima **3a** i **4a** jedva da je uticao na nivoe ekspresije gena *MMP2* i *MMP9*. Pored toga, ova jedinjenja nisu uzrokovala značajne izmene ekspresije gena proangiogenog faktora rasta *VEGFA* u HeLa ćelijama. Dakle, ispitivani tiazolidin-4-oni ne podstiču angiogenezu niti povećavaju verovatnoću nastanka metastaza.



Slika 8. Nivo ekspresije gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u kontrolnim HeLa ćelijama (K) i HeLa ćelijama izloženim suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** u trajanju od 24 h.

4. ZAKLJUČAK

Derivati steroidnih hidrazona ispoljavaju mnoštvo bioloških efekata, a odlikuje ih snižena toksičnost u odnosu na druge vrste lekova. Iz tog razloga mnoge istraživačke grupe bave se sintezom i ispitivanjem bioloških svojstava ovih jedinjenja.

Za nove derivate utvrđeno je da su strukturni fragmenti koji pozitivno utiču na njihovu antikancersku aktivnost α,β -nezasićena tiosemikarbazona strukturna jedinica u položaju C-3, spiro heterociklični supstituent u položaju C-17 bis(tijadiazolina) i heterociklični tiazolidinonski prsten uveden u položaj C-3, a naročito u položaj C-17.

Zahvaljujući njihovom jakom antiproliferativnom i proapoptotskom efektu prema malignim ćelijskim linijama, kao i visokoj selektivnosti u citotoksičnom delovanju na maligne u odnosu na normalne ćelije, rezultati sprovedenih *in vitro* istraživanja mogu da ukažu na značajan antitumorski potencijal steroidnih tiosemikarbazona **1a–c**, tijadiazolina **2a** i tiazolidin-4-ona **3a** i **4a**, što ova jedinjenja ubraja u potencijalne kandidate za *in vivo* ispitivanja.

Na osnovu dobijenih rezultata nameće se zaključak da bi valjalo da se već postojeći derivati steroidnih hidrazona koji su pokazali citotoksični potencijal podvrgnu dodatnim *in vitro* i *in vivo* testovima, kao i da se sintetišu i ispitaju nova jedinjenja ove klase koja bi bila potencijalni budući hemioterapeutici.

5. ZAHVALNICA

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj ugovora 451-03-68/2022-14/200026).

6. LITERATURA

1. Patrick G. An Introduction to Medicinal Chemistry. 5th Edition ed.; OUP Oxford: 2013.
2. Fieser L, Fieser M. *Steroids*. Reinhold Pub.: 1967.
3. <https://www.who.int/cancer/en/>, poslednja poseta 20.05.2022.
4. Wallin K, Wood R. Anabolic-androgenic steroids impair set-shifting and reversal learning in male rats. *European Neuropsychopharmacology* 2015; 25: 583-90.
5. Mohareb R, Al-Omran F. Reaction of pregnenolone with cyanoacetylhydrazine: Novel synthesis of hydrazide-hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids* 2012; 77: 1551-59.
6. Frank É, Kovács D, Schneider G, Wölfling J, Bartók T, Zupkó I. Synthesis of novel steroidal 16-spiroisoxazolines by 1,3-dipolar cycloaddition, and an evaluation of their antiproliferative activities in vitro. *Molecular Diversity* 2014; 18: 521-34.
7. Huang Y, Cui J, Zheng Q, Zeng C, Chen Q, Zhou A. 6-Hydroximino-4-aza-A-homo-cholest-3-one and related analogue as a potent inducer of apoptosis in cancer cells. *Steroids* 2012; 77: 829-34.
8. Koutsourea A, Fousteris M, Arsenou E, Papageorgiou A, Pairas G, Nikolaropoulos S. Rational design, synthesis, and in vivo evaluation of the antileukemic activity of six new alkylating steroidal esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; 16: 5207-15.
9. Dhingra N, Bhardwaj T, Mehta N, Mukhopadhyay T, Kumar A, Kumar M. Synthesis, antiproliferative, acute toxicity and assessment of antiandrogenic activities of some newly synthesized steroidal lactams. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 45: 2229-36.
10. Krstic N, Bjelakovic M, Zizak Z, Pavlovic M, Juranic Z, Pavlovic V. Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities. *Steroids* 2007; 72: 406-14.
11. Iványi Z, Szabó N, Huber J, Wölfling J, Zupkó I, Szécsi M et al. Synthesis of D-ring-substituted (5'R)- and (5'S)-17 β -pyrazolinylandrosterone epimers and comparison of their potential anticancer activities. *Steroids* 2012; 77: 566-74.
12. Baji Á, Kiss T, Wölfling J, Kovács D, Igaz N, Gopisetty, M et al. Multicomponent access to androstano-arylpyrimidines under microwave conditions and evaluation of their anti-cancer activity in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2017; 172: 79-88.
13. Baji Á, Kovács F, Mótyán G, Schneider G, Wölfling J, Sinka I et al. Investigation of pH and substituent effects on the distribution ratio of novel steroidal ring D- and A-fused arylpyrazole regioisomers and evaluation of their cell-growth inhibitory effects in vitro. *Steroids* 2017; 126: 35-49.
14. Krstic N, Bjelakovic M, Dabovic M, Pavlovic V. Thionation of Some α,β -Unsaturated Steroidal Ketones. *Molecules* 2010; 15: 3462-77.
15. Krstic N, Bjelakovic M, Pavlovic V, Robeyns K, Juranic Z, Matić I et al. New androst-4-en-17-spiro-1,3,2-oxathiaphospholanes. Synthesis, assignment of absolute configuration and in vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *Steroids* 2012; 77: 558-65.
16. Krstic N, Pavlovic V, Novakovic I, Matic I, Sladic D. Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel P-heterocyclic androst-4-ene derivatives. *Molecular Diversity* 2013; 17: 547-61.
17. Krstic N, Matic I, Juranic Z, Novakovic I, Sladic D. Steroid dimers - In vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2014; 143: 365-75.
18. Mohareb R, Wardakhan W, Elmegeed G, Ashour R. Heterocyclizations of pregnenolone: Novel synthesis of thiosemicarbazone, thiophene, thiazole, thieno[2,3-b]pyridine derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids* 2012; 77: 1560-69.
19. Verma G, Marella A, Shaquiquzzaman M, Akhtar M, Ali M, Alam M. A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 2014; 6: 69-80.
20. Ergenç N, Günay N, Demirdamar R. Synthesis and antidepressant evaluation of new 3-phenyl-5-sulfonamidoindole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1998; 33: 143-48.
21. Khan S, Asiri A. Novel Steroidal (6R)-Spiro-1,3,4-thiadiazoline Derivatives as Anti-bacterial Agents. *Chinese Journal of Chemistry* 2012; 30: 1901-05.
22. Singh S, Athar F, Maurya M, Azam A. Cyclooctadiene Ru(II) complexes of thiophene-2-carboxaldehyde-derived thiosemicarbazones: synthesis, characterization and antiamoebic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 41: 592-98.

23. Bermejo E, Carballo R, Castineiras A,; Dominguez R, Liberta A, Maichle-Mössmer C et al. Complexes of Group 12 Metals with 2-Acetylpyridine 4N-Dimethylthiosemicarbazone and with 2-Acetylpyridine-N-oxide 4N-Dimethylthiosemicarbazone: Synthesis, Structure and Antifungal Activity. *Zeitschrift für Naturforschung B* 1999; 54: 777-87.
24. Verma K, Pandeya S, Singh U, Gupta S, Sharma P, Chaudhary A et al. Synthesis and Pharmacological Activity of Some Substituted Menthone Semicarbazone and Thiosemicarbazone Derivatives. *International journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 2009; 1: 357-62.
25. Jabeen M, Choudhry M, Miana G, Rahman K, Rashid U, Khan H et al. Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of progesterone and testosterone derivatives as anticancer agents. *Steroids* 2018; 136: 22-31.
26. Cui J, Liu L, Zhao D, Gan C, Huang X, Xiao Q et al. Synthesis, characterization and antitumor activities of some steroidal derivatives with side chain of 17-hydrazone aromatic heterocycle. *Steroids* 2015; 95: 32-38.
27. Nadaraia N. Synthesis and Biological Activity of Steroidal Tigogenin Hydrazones and Pyrazolines. *Chemistry of Natural Compounds* 2018; 54: 926-29.
28. Benmohammed A, Khoumeri O, Djafri A, Terme T, Vanelle P. Synthesis of Novel Highly Functionalized 4-Thiazolidinone Derivatives from 4-Phenyl-3-thiosemicarbazones. *Molecules* 2014; 19: 3068-83.
29. Pérez J, Matesanz A, Martín-Ambite A, Navarro P, Alonso C, Souza P. Synthesis and characterization of complexes of p-isopropyl benzaldehyde and methyl 2-pyridyl ketone thiosemicarbazones with Zn(II) and Cd(II) metallic centers. Cytotoxic activity and induction of apoptosis in Pam-ras cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1999; 75: 255-61.
30. Krishna P, Shankara B, Reddy N. Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Binuclear Copper(II) Complexes of (2E)-2-(2-Hydroxy-3-Methoxybenzylidene)-4N-Substituted Hydrazinecarbothioamides. *International Journal of Inorganic Chemistry* 2013; 2013: 1-11.
31. Liberta A, West D. Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status. *Biometals* 1992; 5: 121-26.
32. West D, Liberta A, Padhye S, Chikate R, Sonawane P, Kumbhar A et al. Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. *Coordination Chemistry Reviews* 1993; 123: 49-71.
33. Yusuf M, Jain P. Synthesis and biological significances of 1,3,4-thiadiazolines and related heterocyclic compounds. *Arabian Journal of Chemistry* 2014; 7: 525-52.
34. Hall I, Chen S, Jo Barnes B, West D. The Hypolipidemic Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones, Thioureas and Their Metal Complexes in Sprague Dawley Male Rats. *Metal-Based Drugs* 1999; 6: 143-47.
35. Brousse B, Moglioni A, Martins Alho M, Álvarez-Larena Á, Moltrasio G, D'Accorsob N. Behavior of thiosemicarbazones derived from some terpenones under acetylating conditions. *ARKIVOC: Archive for Organic Chemistry* 2002; 2002: 14-23.
36. Kelly P, Slawin A, Soriano-Rama A. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* 1996; 53-59.
37. West D, Pardhye S, Sonawane P. Structural and physical correlations in the biological properties of transition metal heterocyclic thiosemicarbazone and S-alkyldithiocarbazate complexes. In *Complex Chemistry* 1991; 76: 1-50.
38. Ostrovskaya R, Voronina T. Antagonistic effect of bicuculline and thiosemicarbazide on the tranquilizing action of diazepam. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1977; 83: 332-34.
39. Voronina T, Tozhanova N. Effect of stimulants on tranquilizing, hypnotic and myorelaxant effects of phenazepam. *Farmakologiya i Toksikologiya (Moscow)* 1981; 44: 155-59.
40. Swathi K, Sarangapani M. Synthesis and sedativehypnotic activity of novel series of isatin hydrazone and isatin thiosemicarbazone derivatives. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014; 3: 2720-29.
41. Pandeya S, Mishra V. Analgesic activity and hypnotic effect of (±)-3-mentone semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *Acta Pharmaceutica* 2001; 51: 183-88.
42. Khan S, Kumar P, Joshi R, Iqbal P, Saleem K. Synthesis and in vitro antibacterial activity of new steroidal thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 43: 2029-34.
43. Asif M, Husain A. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antiplatelet Profile of Hydrazones Containing Synthetic Molecules. *Journal of Applied Chemistry* 2013; 2013: 1-7.
44. Lessa J, Mendes I, da Silva P, Soares M, dos Santos R, Speziali N et al. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 45: 5671-77.

45. Adsule S, Banerjee S, Ahmed F, Padhye S, Sarkar F. Hybrid anticancer agents: isothiocyanate-progesterone conjugates as chemotherapeutic agents and insights into their cytotoxicities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20: 1247-51.
46. Huang Y, Cui J, Chen S, Lin Q, Song H, Gan C et al. Synthesis and Evaluation of Some New Aza-B-homocholestane Derivatives as Anticancer Agents. *Marine Drugs* 2014; 12: 1715-31.
47. Cui J, Lin Q, Huang Y, Gan C, Yao Q, Xiao Q et al. Design, synthesis and antiproliferative evaluation of some B-homo steroidal lactams. *Medicinal Chemistry Research* 2015; 24: 2906-15.
48. Gan C, Cui J, Su S, Lin Q, Jia L, Fan L et al. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. *Steroids* 2014; 87: 99-107.
49. Zivkovic M, Matic I, Rodic M, Novakovic I, Sladic D, Krstic N. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic activities of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines. *RSC Advances* 2016; 6: 34312-33.
50. Zivkovic M, Novakovic I, Matic I, Sladic D, Krstic N. Synthesis and preliminary screening for the biological activity of some steroidal Δ^4 -unsaturated semicarbazone derivatives. *Steroids* 2019; 148: 36-46.
51. Khan S, Asiri A. Synthesis and In Vitro Antibacterial Activity of Novel Steroidal (6R)-Spiro-1,3,4-thiadiazoline Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2012; 49: 1452-57.
52. Jain A, Vaidya A, Ravichandran V, Kashaw S, Agrawal R. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012; 20: 3378-95.
53. Zivkovic M, Matic I, Rodic M, Novakovic I, Krivokuca A, Sladic D et al. Anticancer potential of new steroidal thiazolidin-4-one derivatives. Mechanisms of cytotoxic action and effects on angiogenesis in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2017; 174: 72-85.
54. Vilipic J. Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona i tert-butihinona i ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2017.
55. McIlwain D, Berger T, Mak T. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013; 5: a008656.
56. Aranda E, Owen G. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biological Research* 2009; 42: 377-89.
57. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 2010; 141: 52-67.
58. Mueller M, Vigne J, Minchenko A, Lebovic D, Leitman D, Taylor R. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 10972-77.

Molekularna dijagnostika glioblastoma –klinički uticaji IDH mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti MGMT gena

Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović

Departman za Biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

Kontakt: nikolajov90@gmail.com

Apstrakt

Savremeni terapijski pristupi u lečenju pacijenata obolelih od glioblastoma (GBM) oslanjaju se na primenu alkilirajućih agenasa poput Temozolomida ("Stupp"-ov protokol). Sveobuhvatnim studijama izučavanja genomske asocijacije (GWAS) i randomizovanim kliničkim ispitivanjima otkriven je uticaj statusa nekoliko važnih molekularnih markera na terapijski odgovor i klinički ishod kod GBM pacijenata. Najvažnijim takvim markerom smatra se status mutacije gena za izocitrat-dehidrogenazu 1 (*IDH1-R132H*), koji je uvršten u važeću Klasifikaciju tumora centralnog nervnog sistema Svetske zdravstvene organizacije. Određivanjem njegovog statusa moguće je razlikovati primarne od sekundarnih GBM koje odlikuju značajne razlike u toku i ishodu bolesti. Takođe, pokazano je da je *IDH1-R132H* mutacija usko povezana sa mehanizmima epigenetičkog utišavanja aktivnosti gena za reparacioni enzim O⁶-metilguanin-metiltransferazu (MGMT) putem metilacije njegovog promotornog regiona. Zbog direktnog suprotstavljanja MGMT enzima dejstvu alkilirajućih agenasa, navedena inaktivacija njegove aktivnosti predstavlja povoljan prognostički i predikcioni faktor GBM. Predmet ovog revijskog rada biće pregled aktuelnih saznanja o ulozi navedenih markera u etiologiji GBM, značaja njihove udružene evaluacije i problema šire implementacije njihovog određivanja u kliničkoj praksi.

Ključne reči: glioblastom, molekularni markeri, epigenetika, *MGMT*, *IDH1*

Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of IDH mutations and epigenetic silencing of MGMT

Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović

Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics,
University of Niš, 18000 Niš, Serbia
Correspondence: nikolajov90@gmail.com

Abstract

Current therapy protocols for the management of glioblastoma (GBM) patients mostly rely on the use of alkylating agents, such as Temozolomide (Stupp protocol). During the past several decades, comprehensive genome-wide association studies (GWAS) and randomized clinical trials have revealed and confirmed the impact of numerous molecular markers on the therapy response in GBM patients. Among them, the mutation status of the isocitrate dehydrogenase 1 gene (IDH1-R132H) was presented as the most important molecular marker of GBM. Due to its importance, in 2016 it was introduced to the World Health Organisation (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System (CNS), which is still valid. Through IDH1-R132H mutation evaluation, it is possible to distinguish the primary from the secondary GBM which significantly differ in the clinical course and outcome. Moreover, it was shown that IDH1-R132H mutation is closely related to the molecular mechanisms which drive epigenetic silencing of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase gene (MGMT) through methylation of its promoter region. Due to the direct opposition of the MGMT enzyme to the alkylating agents' activity, its inactivation represents a favorable prognostic and predictive factor in GBM. This review article discusses the current insights on the role of IDH1 mutation and MGMT epigenetic silencing in GBM etiology, the importance of their mutual evaluation, and the challenges of their evaluation in clinical practice.

Keywords: glioblastoma, molecular markers, epigenetics, MGMT, IDH1

KLINIČKI NAJZNAČAJNIJA GENETIČKA I MOLEKULARNA OBELEŽJA GBM

U jeku ubrzanog razvoja molekularnih metoda istraživanja humanog genoma začetog s kraja XX veka, klinička dijagnostika i klasifikacija glioblastoma (GBM) pretrpela je korenite promene s ciljem unapređenja prognostičke stratifikacije i predikcije odgovora na terapiju. Tome je doprinelo pronalaženje pouzdanih molekularnih markera GBM poput statusa mutacije gena za izocitrat dehidrogenazu 1 i 2 (*IDH1/2*) i statusa metilacije promotornog regiona gena za O⁶-metilguanin-DNK metil-transferazu (*MGMT*) koji se, uz amplifikaciju *EGFR* gena i prisustva kodelecije p kraka hromozoma 1 (1p) i q kraka hromozoma 19 (19q) ubrajaju u najizraženija molekularna obeležja GBM od kliničkog značaja [1]. Zbog njihove važnosti je "Klasifikacija tumora centralnog nervnog sistema" (CNS) iz 2016. godine, iz koje stoji Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO), prvi put uključila i molekularne parametre u nomenklaturu tumora, nakon čitavog veka klasifikacije tumora pretežno na osnovu mikroskopske analize eozin/hematoksilin obojenih histoloških preparata. Ova nomenklatura podrazumeva da se histopatološkom nazivu tumora, koje se prvo navodi, u nastavku nakon zapete i u obliku opisnog prideva dodaje specifična genetička osobina (npr. Glioblastoma, IDH mutant) [2]. Najkrupnije promene u ovoj klasifikaciji u odnosu na prethodnu (iz 2007. godine) ogledaju se u klasifikaciji difuznih glioma (gliomi II-IV gradusa). Dok su ranije svi astrocitni tumori bili u jednoj zasebnoj grupi, prema trenutno važećoj klasifikaciji svi tipovi difuznih glioma svrstani su u jednu grupu [2]. Grupi difuznih glioma pripadaju astrocitni tumori II i III gradusa WHO, oligodendrogliomi II i III gradusa kao i glioblastomi (gradus IV). Ova grupa je definisana na osnovu zajedničkih osobina rasta ali i na osnovu zajedničkih molekularnih karakteristika i to upravo obrazaca mutacija gena *IDH 1* i *IDH 2* [2]. Rasvetljavanje uloge mutacije *IDH1/2* u procesu gliomogeneze, izazivanju globalnih epigenetičkih modifikacija i korelaciji sa metilacijom promotornog regiona *MGMT* omogućilo je dodatno prilagođavanje terapijskih procedura individualnim karakteristikama GBM pacijenata - personalizovanoj terapiji, konceptu lečenja koji predstavlja jedan od najaktuelnijih trendova savremene medicine.

IDH1/2 MUTACIJE

Izocitrat dehidrogenaza predstavlja metabolički enzim - enzim Krebsovog ciklusa koji katalizuje oksidativnu dekarboksilaciju izocitrata do α-ketoglutarata, uz istovremenu redukciju NAD koenzima do NADH [3]. Ovaj enzim egzistira u tri izoforme (*IDH 1-3*) pri čemu je *IDH1* izoforma lokalizovana u citoplazmi i peroksizomima, dok su *IDH2/3* izoforme smeštene u mitohondrijama. Pored uloge u Krebsovom ciklusu i smanjenju oksidativnog stresa, *IDH1* ima funkciju u metabolizmu lipida i glukoze [3].

Mutacije *IDH1/2* gena mogu biti monoalelske, somatske i "missense" mutacije (*missense*, eng. - mutacije promene smisla). Otkrivene su 2009. godine prilikom analize genoma uzoraka GBM, a kasnije studije identifikovale su prisustvo ovih mutacija u različitim tipovima tumora poput kancera prostate, holangiokarcinoma, akutne mijeloidne leukemije, kartilaginoznih tumora, papilarnog karcinoma dojke, akutne limfoblastne leukemije, angioimunoblastičnog T-ćelijskog limfoma i primarne mijelofibroze [1,4].

Najčešća i klinički najznačajnija *IDH* mutacija u GBM ćelijama je *IDH1-R132H* (G395A), mutacija u *IDH1* genu smeštenom na hromozomu 2 (2q33) koja za posledicu ima „missense“ supstituciju kodona 132 za aminokiselinu arginin [1]. Kodon za arginin na poziciji 132 je evoluciono konzervisan i odgovoran za interakciju sa supstratom enzima – izocitratom. *IDH1-R132H* mutacija predstavlja najvažnije molekularno obeležje sekundarnih glioblastoma (prisutna je kod 80% niskogradusnih glioma) dok se ona znatno ređe javlja kod primarnih GBM (5%) [5]. Određivanje statusa mutacije *IDH1-R132H* ključno je za razlikovanje sekundarnih od primarnih GBM, koje nije moguće razlikovati na osnovu histopatoloških karakteristika. Do-

datni pozitivni prognostički značaj ovoj mutaciji daje činjenica da je ona obično asocirana sa mutacijom u *TP53* i kodelecijom *del(1p)/del(19q)* koji predstavljaju tipične molekularne odlike sekundarnih GBM. Pored toga, prisustvo *IDH1* mutacije povezano je sa metilacijom *MGMT* promotornog regiona i odsustvom amplifikacije *EGFR* i gubitka hromozoma 10. Mutacije u *IDH2* genu (hromozom 15q26) pogađaju kodone R172 i R140. One su u GBM retko zastupljene i međusobno isključive u odnosu na *IDH1* mutacije.

IDH MUTACIJE – POKRETAČKE MUTACIJE GBM?

Povezanost *IDH* mutacija sa povećanim vremenom preživanja GBM pacijenata otvorilo je pitanje njihove prirode: Da li se radi o pokretačkim (*driver, eng.*) mutacijama gliomogeneze, usputnim (*passenger, eng.*) mutacijama, ili čak korisnim mutacijama po tok bolesti? Brojne studije su potvrdile ulogu *IDH1/2* mutacija kao direktnih pokretača gliomogeneze niskogradusnih glioma i sekundarnih GBM. U prilog „onkogenoj“ teoriji govori činjenica da je somatski mozaicizam za *IDH1* i *IDH2* mutacije odgovoran za sindrome enhondromatoze, Olijerov i Mafučijev sindrom. Ovi sindromi se odlikuju pojavom hemangioma i kartilaginoznih tumora i povezani su sa povećanim rizikom od nastanka glioma. Takođe, introdukcija mutirane forme *IDH* gena u normalne ćelijske linije podstiče njihovu proliferaciju i formiranje kolonija ćelija uz smanjenje sposobnosti diferencijacije [4].

Mutacije *IDH* gena predstavljaju neomorfične mutacije. One rezultuju zadobijanjem novih funkcija (*gain-of-function, eng.*) *IDH* enzima koje su ključne za pokretanje onkogene transformacije u GBM. *IDH1-R132H* mutacija rezultuje zadobijanjem sposobnosti enzima da katalizuje reakciju redukcije 2-oksoglutarata do (D)-2-hidroksiglutarata (D-2HG) [4,6].

Trenutno preovlađujuće stanovište jeste da je mutacija *IDH1-R132H* onkogene prirode i da spada u najranije genetičke događaje koji podstiču inicijaciju i rast niskogradusnih glioma odnosno sekundarnih GBM [6,7]. U prilog tome govore dokazi da se ova mutacija u sekundarnim glioblastomima može registrovati pre *TP53* mutacija i izmena u broju kopija *PTEN* i *EGFR* gena koji takođe nastupaju rano u gliomogenezi. Pored toga, ona predstavlja jedinu genetičku karakteristiku koju dele inicijalni sekundarni glioblastomi i njihovi recidivi [6].

Uzimajući u obzir njihovu potencijalnu ulogu kao pokretača onkogeneze, intrigantno je da je prisustvo *IDH* mutacija povezano sa poboljšanjem vremena preživljavanja GBM pacijenata. Iako sekundarni GBM dele zajedničke kliničke karakteristike sa primarnim glioblastomima, ispostavilo se da se oni jasno razlikuju u molekularnoj patogenezi i izmenama u signalnim putevima. Te razlike za posledicu imaju smanjenu stopu infiltracije, progresije i rasta GBM, kao i povoljnije parametre toka bolesti u odnosu na primarne GBM. U cilju otkrivanja mehanizma uticaja *IDH* mutacija u gliomima, izvršena je komparativna analiza TCGA podataka za 286 slučajeva *IDH1*-mutiranih i *IDH1*-nemutiranih (*wildtype, eng.*) glioma [8]. Otkriveno je da je *IDH1-R132H* asocirana sa pozitivnim prognostičkim faktorima glioma: povećanjem ekspresije tumor-supresornih gena *NF1*, *PTEN* i *PIK3R1* (*phosphoinositide-3-kinase regulatory Subunit 1, eng.* – regulatorna subjedinica 1 fosfatidilinozitol 3-kinaze) i smanjenjem ekspresije onkogenih *AKT2* (AKT serine/threonine kinase 2, eng. – AKT serin/treonin kinaza 2), *ARAF* (*serine/threonine protein kinase A-Raf, eng.* – serin/treonin proteinska kinaza A-Raf), *ERBB2* (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2, eng.* – Erb-B2 receptor proteinske kinaze 2), *FGFR3* i *PDGFRB* (*platelet derived growth factor receptor beta, eng.* – receptor trombocitnog faktora rasta beta) kao i gena koji podstiču progresiju glioma *FOXM1* (*forkhead box M1, eng.*), *IGFBP2* (*insulin-like growth factor binding protein 2, eng.* – protein vezivanja faktora rasta nalik insulinu) i *WWTR1* (*WW domain containing transcription regulator 1, eng.* – regulator transkripcije 1 sa WW domenom) [8].

D-2HG KAO ONKOMETABOLIT

Smatra se da je *IDH1-R132H* jedan od ključnih pokretača gliomageneze zahvaljujući produkciji „onkometabolita“ D-2HG koji indukuje epigenetičke, metaboličke i transkripcione promene u mutiranim ćelijama. Prisustvo D-2HG je i do stotinu puta povišeno kod *IDH1-R132H* mutiranih glioma u odnosu na nemutirane gliome [4,6]. D-2HG predstavlja kompetitivni inhibitor 2-oksoglutarat-zavisnih dioksigenaza, u koje spadaju prolil hidroksilaze (PHD), histon demetilaze i TET (*Ten-eleven translocation, eng.*) familija 5-metilcitozin hidroksilaza [6,9]. Od navedenih grupa enzima, najveću senzitivnost na D-2HG pokazuju histon-demetilaze (i do 200 puta više u odnosu na PHD). D-2HG indukuje metilaciju histona i direktno zaustavlja proces ćelijske diferencijacije. Otkriveno je da je prisustvo D-2HG korelisano sa povećanom akumulacijom represivne trimetilacije lizinskog ostatka na poziciji 9 histona 3 (H3K9me3) koja prethodi promenama u obrascu DNK metilacije genoma [9]. Takođe, prisustvo inhibitora *IDH1-R132H*, AGI-5198 rezultovalo je demetilacijom histona H3K9me3 i indukcijom ekspresije gena koji regulišu ćelijsku diferencijaciju [10]. Introdukcija *IDH1-R132H* mutacije u immortalizovane ćelijske linije humanih astrocita bila je dovoljna za izazivanje epigenetičkog šablona sličnog CpG metilacionom fenotipu (G-CIMP) koji je karakterističan za GBM sa prisustvom *IDH1* mutacije [8].

Međutim, ponuđeni su i dokazi da D-2HG nije ključan za progresiju glioma i da utiče na smanjenje stope ćelijske proliferacije glijalnih ćelija, makar u *in vitro* uslovima [11,12]. Ovim se može objasniti uloga *IDH* mutacija kao pozitivnih prognostičkih faktora. Otkriveno je da D-2HG predstavlja inhibitor enzima ATP sintaze i aktivator AMPK signalnog puta koji snižavaju aktivnost mTOR. signalnog puta koji podstiče proliferaciju tumorskih ćelija (*Mammalian target of rapamycin complex 1, eng.*- proteinski kompleks u sisarskim ćelijama koje inhibira rapamycin, imunosupresorni lek koji deluje tako što inhibira progresiju iz G1 i S fazu ćelijskog ciklusa B i T limfocita) [7].

KONTRADIKTORNA PRIRODA IDH MUTACIJA – MOGUĆE OBJAŠNENJE

Iako preovlađujuće, trenutno shvatanje o ulozi *IDH* mutacija kao pokretača gliomageneze nailazi na suprotstavljena mišljenja. Jedno o objašnjenja porekla zabune o kontradiktornoj prirodi *IDH1-R132H* mutacija tiče se različitih model-sistema kojima su istraživači pribegavali: upotrebe egzogene transdukcije *IDH1-R132H* mutiranog gena nasuprot endogene, heterozigotne *IDH1-R132H* [6].

Endogena, heterozigotna *IDH1-R132H* mutacija je česta u gliomima. Međutim, ona se gubi i izuzetno teško održava u ćelijskim kulturama ili ksenograftima (transplantacija organa ili tkiva s jednog živog bića na drugo) poreklom od pacijenata. Zbog toga je transdukcija ćelijskih kultura egzogenom *IDH1-R132H* postala standard u istraživanjima, a većina dostupnih podataka o onkogenoj prirodi *IDH* mutacija dobijena je primenom egzogene *IDH1-R132H* u eksperimentalnim model sistemima glioma. Pokazano je da transdukcija egzogenom *IDH1-R132H* rezultuje sferoidnim rastom *MYC*-immortalizovanih humanih neuralnih progenitornih ćelija (*Myelocytomatosis viral oncogen, eng.*- protoonkogen čije mutacije imaju ulogu u razvijanju Burkittovog limfoma, kodira transkripcioni faktor, nuklearni fosfoprotein koji ima ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze, humani homolog virusnog onkogeno mijelocitomatoze ili v-myc), kao i rastom nezavisnim od podloge (anchorage-independent growth, eng.) kod immortalizovanih ćelijskih linija humanih astrocita u poređenju sa *IDH1* nemutiranom kontrolom. [13, 14]. Ove osobine su jaki i dokazani pokazatelji tumorgenosti i govore u prilog onkogenoj teoriji [13].

Sa druge strane, takve rezultate nije bilo moguće reprodukovati u eksperimentalnim model sistemima koji su uključivali endogenu heterozigotnu *IDH1-R132H*. Štaviše, takve studije su navodile na potpuno

suprotne zaključke. Zapanjujuće je da su heterozigotne *IDH1-R132H* ćelijske linije pokazale suprotan efekat na rast neuralnih progenitorskih ćelija, sprečavajući sferoidni rast [13]. Uticaj heterozigotne *IDH1-R132H* na inhibiciju rasta nezavisnog od podloge objasnilo je poreklo problema spomenutog održavanja heterozigotne *IDH1-R132H* u ksenograftima i ćelijskim kulturama, ali i pružilo uvid u drugačiji funkcionalni značaj *IDH1-R132H* i moguću antitumorsku i antiproliferativnu, odnosno blagotvornu ulogu na tok bolesti.

U prilog tome govori da je kod *IDH1-R132H* heterozigotnih miševa zabeleženo odsustvo razvijanja tumora, uprkos visokoj koncentraciji D-2HG. Takođe, pacijenti oboleli od D-2-hidroksiglutarne acidurije, retkog autozomno-recesivnog sindroma koji se karakteriše visokom koncentracijom D-2HG u urinu, krvnoj plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti, nisu pokazali predispoziciju za razvoj tumora [11]. Ovakvi dokazi govore u prilog tvrdnji da je *IDH1-R132H* mutacija u suštini tumor-supresivna i da ne poseduje sposobnost direktne inicijacije i promocije gliomogeneze [12].

Pokazano da inaktivacija *TP53* i *RB* signalnih puteva (karakteristika sekundarnih GBM) u imortalizovanim ćelijskim linijama humanih astrocita prikriva *IDH1-R132H* tumor-supresivnu aktivnost te je najverovatnije da tumor-supresivnu aktivnost *IDH1-R132H* poništava prisustvo drugih genetičkih i mikrosredinskih činioca uključenih u proces gliomogeneze [15]. Takođe, visoka koncentracija ekstracelularnog glutamata poništava *IDH1-R132H* indukovanu supresiju rasta nezavisnog od podloge i podstiče proliferaciju tumora [12]. To otkriće je naročito značajno ukoliko su uzme u obzir da su *IDH1-R132H* mutirani glioblastomi najčešće lokalizovani u čeonom režnju mozga za koji je karakterističan visok protok ovog neurotransmitera.

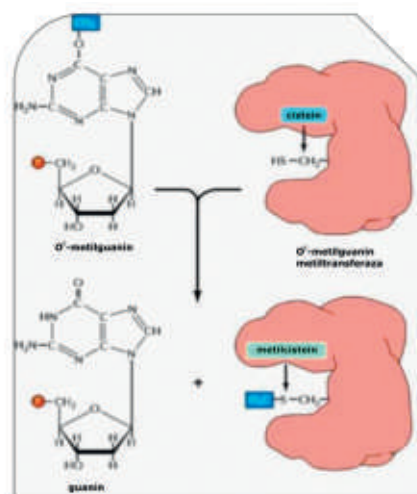
Navedeni rezultati studija navode na zaključak da je funkcionalni gubitak aktivnosti *IDH1-R132H* enzima, a ne nedostatak funkcije divljeg tipa *IDH1* enzima razlog za zastupljenost i očuvanje *IDH1-R132H* mutacija od stadijuma inicijacije do progresije GBM. Zbog toga istraživanja usmerena na mehanizme poništavanja *IDH1-R132H* tumor-supresivne funkcije predstavljaju izuzetno važan pristup u razvijanju načina prevencije progresije glioma i definisanju personalizovanih terapijskih protokola [6].

HIPERMETILACIJA PROMOTORNOG REGIONA MGMT

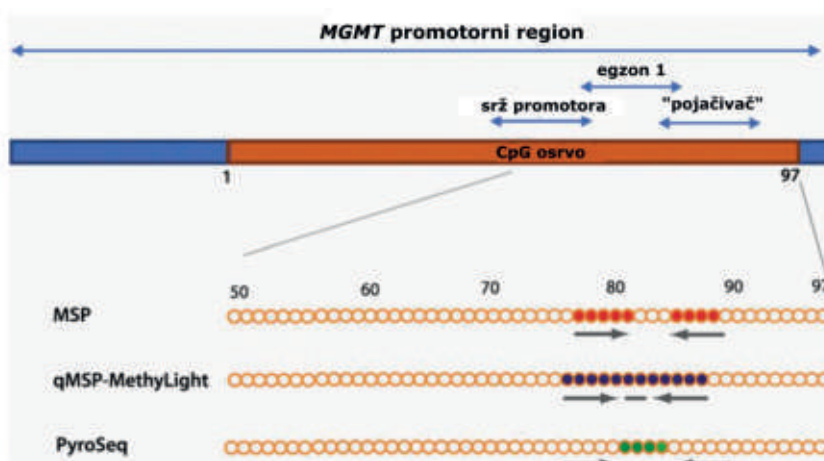
Status metilacije promotornog regiona *MGMT* predstavlja jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora GBM i moćan predikcioni faktor odgovora na terapiju alkilirajućim agensima, derivatima nitrozouree i TMZ, ili njihovom kombinacijom [1,16]. Ovi lekovi deluju citotoksično na proliferativne ćelije dodavanjem alkil-grupe (alkil-adukata) na nekoliko pozicija u molekulu DNK, od kojih je najčešća O⁶-pozicija guanina. Alkilacija guanina dovodi do mutacije pogrešno sparenih baza (*missmatch mutation*, eng.), dvostrukog prekida u molekulu DNK i apoptoze proliferativnih ćelija GBM. Gen *MGMT*, smešten na q kraku hromozoma 10 (10q26.3), kodira evoluciono visoko-konzervisani reparacioni enzim O⁶-metilguanin-DNK metil-transferazu. Ovaj enzim otklanja alkil-adukate sa O⁶-pozicije guanina, poništavajući citotoksičnost spomenutih alkilirajućih agenasa. Tokom tog procesa alkil-grupa biva ireverzibilno prebačena sa molekula DNK na *MGMT* (samoubilačka inhibicija), čime *MGMT* postaje nepovratno inhibiran (Slika 1).

U čak 50% slučajeva GBM je aktivnost *MGMT* epigenetički utišana putem metilacije specifičnih CpG pozicija (*Cytosine-phosphate-guanine*, eng. - citozin-fosfat-guanin) od ukupno 97 pozicija unutar CpG niza koji čini CpG ostrvo (*CpG island*, eng.) dužine 777bp, smeštenog u promotornom regionu *MGMT* gena (Slika 2.) [17,18,19].

Metilacija CpG pozicija u rasponu od -251 do -101 pozicije promotornog regiona *MGMT* ključna je za njegovo transkripciono utišavanje. Taj region je dobio naziv DMR1 (*differentially methylated region 1*, eng. - diferencijalno metilovan region 1). Uz njega, otkriveno je prisustvo i regiona od +97 do +196 koji je nazvan



Slika 1. Mehanizam direktne reparacije DNK oštećenja koju katalizuje enzim MGMT (preuzeto sa <https://www.slideshare.net/aljeirou/mutation-and-dna-repair-mechanisms>)



Slika 2. Mehanizam direktne reparacije DNK oštećenja koju katalizuje enzim MGMT (preuzeto sa <https://www.slideshare.net/aljeirou/mutation-and-dna-repair-mechanisms>)

DMR2 region [18]. Epigenetičko utišavanje *MGMT* za posledicu ima smanjenje funkcije *MGMT* enzima čime se onemogućava adekvatna reparacija oštećenja DNK prouzrokovanih alkilirajućom terapijom.

Hipermetilacija *MGMT* je kod primarnih GBM najčešće praćena gubitkom jedne kopije alela usled delecije q kraka hromozoma 10 (*chromosome 10q deletion*, eng.) koji nosi *MGMT* lokus (10q26) [18]. U takvim slučajevima, metilacija preostalog *MGMT* alela u potpunosti inhibira reparacionu funkciju *MGMT* što potvrđuje značaj epigenetičkog vida regulacije ekspresije *MGMT* gena [4,19].

Zbog visoke zastupljenosti u GBM i potencijalnog direktnog uticaja na uspeh hemioterapije, prognostički i predikcioni značaj metilacije *MGMT* promotora je intenzivno ispitivan. Prve dokaze o uticaju metilacije *MGMT* promotora na terapijski odgovor pružilo je „Stupp“-ovo kliničko ispitivanje u kome je pozitivan status metilacije povezan sa dužim vremenom preživljavanja pacijenata bez obzira na vid terapije, radiote-

rapiju ili radioterapiju kombinovanu sa TMZ [20]. Prognostička uloga metilacije *MGMT* promotora u slučajevima terapije Temozolomidom dodatno je potvrđena potonjim kliničkim ispitivanjima (RTOG0525) [21]. Sa druge strane, pokazano je da je pozitivan status metilacije *MGMT* promotora takođe povoljan predikcioni faktor odgovora na radioterapiju u odsustvu hemioterapije kod GBM pacijenata [22]. To navodi na zaključak da je *MGMT* potencijalno uključen i u reparaciju oštećenja DNK prouzrokovanih radioterapijom [1].

EVALUACIJA METILACIJE PROMOTORNOG REGIONA *MGMT* U KLINIČKOJ PRAKSI

Uprkos pouzdanim dokazima o povoljnom prognostičkom značaju metilacije promotornog regiona *MGMT*, rutinska laboratorijska evaluacija ovog markera GBM nije široko zastupljena, najpre zbog nedostataka tehničke standardizacije. Opštu usaglašenost oko načina evaluacije ovog biomarkera onemogućavaju varijacije u metodama detekcije između različitih laboratorija i razlike u definicijama graničnih vrednosti pozitivnog statusa metilacije *MGMT* [18]. Standardizaciju dodatno onemogućava visoka heterogenost uzoraka GBM kao i nedostatak preciznije identifikacije promotornih regiona *MGMT* čija metilacija ima prediktivni značaj [23]. Takođe, postoje dokazi da je šablon ekspresije *MGMT* nezavisan od metilacionog statusa i ishoda lečenja, ukazujući na moguću regulaciju njegove ekspresije putem drugih molekularnih mehanizama izuzev metilacije promotornog regiona i delecije q kraka hromozoma 10 [1]. Uz to, visoka pouzdanost statusa metilacije *MGMT* kao nezavisnog prognostičkog markera otežava njegovu evaluaciju kao samostalnog predikcionog faktora [24, 25, 26].

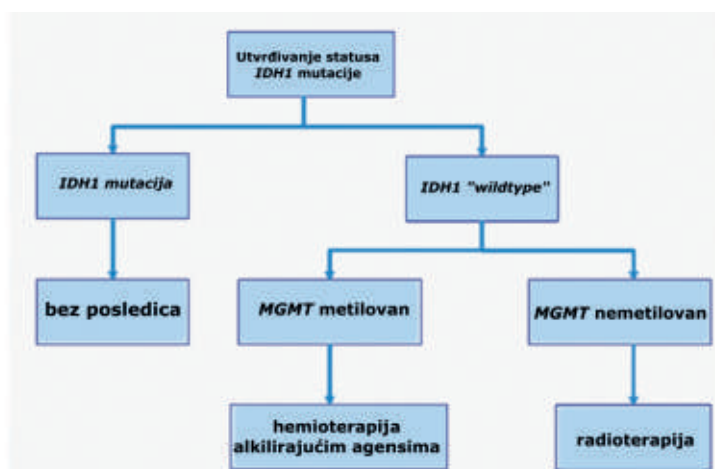
Zbog svega navedenog, implementacija evaluacije ovog parametra u kliničkom donošenju odluka je znatno usporena. Kako terapija temozolomidom može biti od koristi i u odsustvu metilacije *MGMT* promotora, standardni vid tretmana svih GBM pacijenata, bez obzira na status metilacije *MGMT* predstavlja spomenuti „Stupp“ protokol, odnosno radioterapija kombinovana sa primenom TMZ [1,27].

KOMBINACIJA *IDH1-R132H* I STATUSA METILACIJE *MGMT*

Sve više dokaza upućuje na to da status metilacije *MGMT* može imati znatno pouzdaniji predikcioni značaj u kombinaciji sa drugim molekularnim markerima GBM [18]. Najvažniji takav marker predstavlja status mutacije *IDH1-R132H*. Pokazano je da je kod gotovo svih visokorizičnih *IDH1-R132H* pacijenata obolelih od niskogradusnih glioma registrovana i hipermetilacija *MGMT* promotornog regiona. [28;29]. Randomizovano kliničko ispitivanje Neuroonkološke radne grupe NOA-04 (*The Neurooncology Working Group of the German Cancer Society*, eng.) i NOA-08 pokazali su da je kod *IDH1-R132H* mutiranih GBM (sekundarnih GBM) status metilacije *MGMT* povezan sa poboljšanim vremenom preživljavanja bez progresije tumora (PFS) bez obzira na primenjeni vid terapije - hemioterapije, radioterapije li njihove kombinacije [30]. To dokazuje prognostičku vrednost statusa metilacije *MGMT* kod sekundarnih GBM [31].

Sa druge strane, kod *IDH1* „wildtype“ GBM (primarnih GBM), status metilacije *MGMT* povezan je sa poboljšanjem PFS vremena kod pacijenata koji su primali hemioterapiju alikilirajućim agensima, ali ne i onih koji su primali isključivo radioterapiju kao inicijalni vid terapije GBM [32]. To ukazuje na ulogu statusa metilacije *MGMT* promotora kao predikcionog markera odgovora na hemioterapiju kod *IDH1* „wildtype“ GBM (primarnih GBM) [31].

Na osnovu rezultata NOA-04 kliničkog ispitivanja, predstavljen je interaktivni model formiranja terapijske strategije zasnovan na biomarkerima *IDH1-R132H* mutacije i statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* (Slika 3) [30,31]. Takav model omogućava prilagođavanje modela terapije (alikilirajući agensi, radioterapija) u zavisnosti od statusa metilacije promotora *MGMT* i tipa GBM (primarni ili sekundarni GBM).



Slika 3. NOA-04 interaktivni model izbora terapijske strategije zasnovan na najvažnijim biomarkerima GBM (preuzeto iz rada Rhun i sar., 2015.) [31]

Širu implementaciju ovog modela u kliničkoj praksi onemogućava činjenica da za razliku od pouzdanih metoda utvrđivanja statusa mutacije *IDH1-R132H* (metode sekvenciranja DNK, imunohistohemija), dogovor oko optimalne metode evaluacije statusa metilacije *MGMT* promotora još uvek nije postignut [18]. Kao jedno od mogućih rešenja, predložen je algoritam evaluacije statusa ovog markera koji uključuje više različitih metoda detekcije u zavisnosti od čistoće uzorka, statusa *IDH1* mutacije i kliničkih parametara pacijenta [18].

METODE DETEKCIJE METILACIJE *MGMT* PROMOTORNOG REGIONA

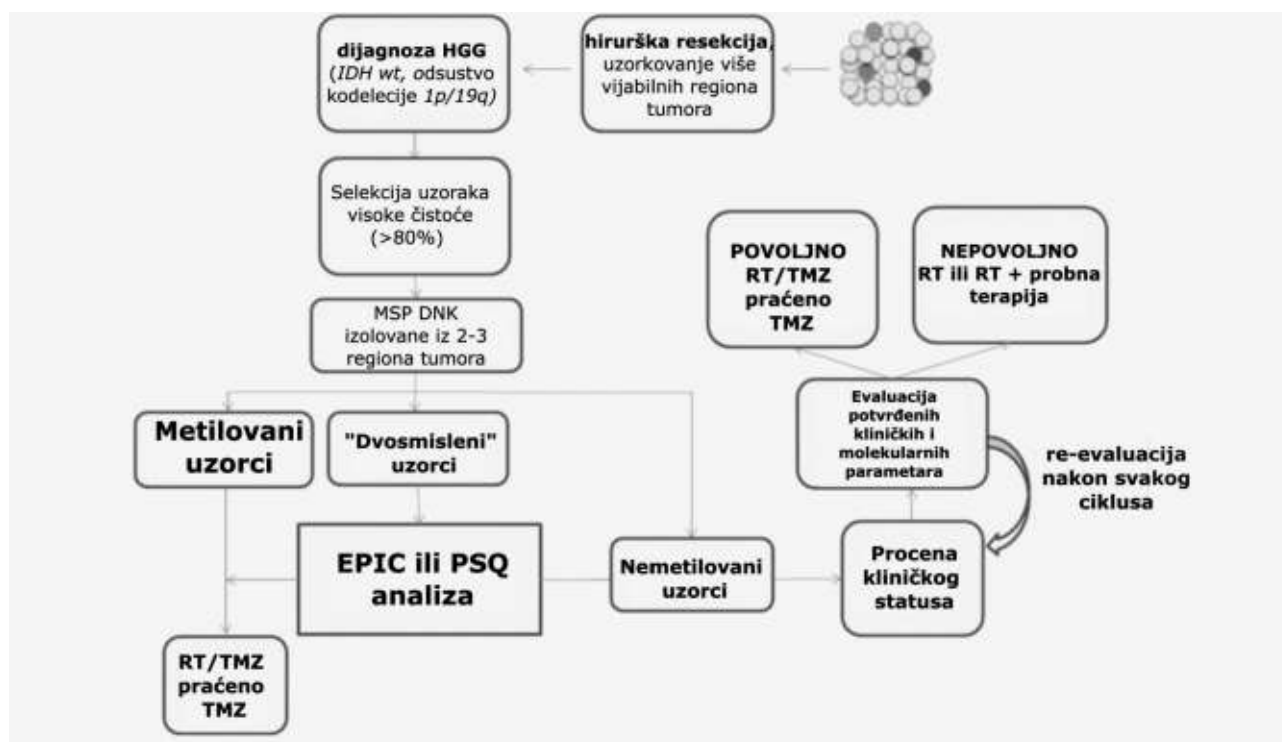
U najzastupljenije metode detekcije statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona ubrajaju se: metilaciono specifična polimerazna lančana reakcija ili MSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*, eng.), kvantitativni „real-time“ MSP ili qMSP (*Quantitative MSP*, eng.), bisulfitno sekvenciranje i pirosekvenciranje ili PSQ (*Pyrosequencing*, eng.) i HMR (*High-resolution melt*, eng. – Real-Time PCR sa analizom topljenja visoke rezolucije). Uprkos razlikama u principu očitavanja rezultata, kvantitativnoj ili kvalitativnoj evaluaciji i ceni analize, ove metode dele zajedničke inicijalne korake: izolaciju genomske DNK, kvalitativnu i kvantitativnu proveru izolata DNK i bisulfitnu konverziju DNK izolata. U tabeli 1 prikazane su prednosti i mane različitih metoda određivanja statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona. U metode evaluacije metilacionog statusa *MGMT* promotora koje se ne oslanjaju na proces bisulfitne konverzije spada imunohistohemijska detekcija, MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*, eng. – metilaciono specifično višestruko umnožavanje proba nezavisno od ligacije), zatim metode hromatinske imunoprecipitacije (Chip) poput „Infinium MethylationEPIC BeadChip“ tehnologije i druge (Tabela 1) [18].

Pirosekvenciranje se smatra najpouzdanijom metodom ili „zlatnim standardom“ evaluacije statusa metilacije, zbog mogućnosti analize individualnih CpG pozicija unutar CpG ostrvaca. Međutim, u kliničkoj rutini interpretacija i određivanje značaja takvih rezultata mogu biti otežani usled pojave uzoraka sa parcijalno metilovanim promotornim regionom *MGMT* [18,33]. Takođe, ova metoda zahteva intenzivni laboratorijski rad, veliko iskustvo i podrazumeva značajna inicijalna ulaganja u opremu. Zbog toga je, uprkos svojim prednostima, PSQ metoda slabo zastupljena u kliničkoj praksi i istraživanjima [18, 33]. U poređenju sa PSQ, MSP i qMSP metode su isplativije, podrazumevaju manji utrošak vremena i korišćenje jednostavnije i dostupnije opreme, zbog čega predstavljaju najbolje kandidate za uvođenje u svakodnevnu kliničku praksu [33]. Na Slici 4. nalazi se šematski prikaz postupka evaluacije metilacionog statusa DMR2 regiona.

Metoda	Vreme izvođenja	Prednosti	Nedostaci	Procenjeni troškovi po uzorku (USD)
Konvencionalni MSP	2 dana	- Pokazana prediktivna i prognostička vrednost - Pristupačna cena	- Nepouzdanost rezultati - Slaba pouzdanost analize FFPE uzoraka	\$5/uzorak
Real-Time MSP	2 dana	- Granične vrednosti potvrđene u kliničkim ispitivanjima	- Nepouzdanost rezultati za uzorke sa mozaičnim šablonom metilacije - Slaba pouzdanost analize FFPE uzoraka	\$10–20/uzorak
Pirosekvenciranje	5 dana	- Kvantitativna evaluacija	- Visoka cena - Duže vreme do dobijanja rezultata - Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima - neophodan centralni objekat za visokoprotočne (<i>high-throughput</i> , eng.) analitičke metode	\$10–30/uzorak
Real-Time PCR sa analizom topljenja visoke rezolucije	2 dana	- Kvantitativna evaluacija	- Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima	\$20–30 /uzorak
EPIC	5 dana	- Omogućava analiziranje dodatnih biomarkera (1p/19q, G-CIMP) - Kompatibilna sa različitim načinima pripreme uzoraka	- Duže vreme dobijanja rezultata - Visoka cena - neophodan centralni objekat za visokoprotočne (<i>high-throughput</i> , eng.) analitičke metode - Granične vrednosti nisu potvrđene u kliničkim ispitivanjima	\$500–700/uzorak
IHC	2 dana	- Niska cena	- Varijabilnost u evaluaciji od strane različitih posmatrača - Nekonzistentna korelacija sa kliničkim ishodima	\$10–30/uzorak
MLPA	2 dana	- Nije neophodna bisulfitna konverzija uzoraka - Niska cena	- Prediktivna upotrebljivost nije dokazana	\$10–30/uzorak

Tabela 1. Prednosti i mane različitih metoda određivanja statusa metilacije *MGMT* promotornog regiona [18]

Mansouri i saradnici su 2019. godine na osnovu dostupnih podataka o pristupima evaluaciji statusa metilacije *MGMT*, predložili optimalni model njegove kliničke evaluacije. Oni su pritom naglasili važnost uzimanja u obzir drugih molekularnih markera GBM, poput *IDH1* mutacije i predložili dijagnostički protokol za slučajeve gde je evaluacija statusa *MGMT* nejasna (Slika 5.) [18].



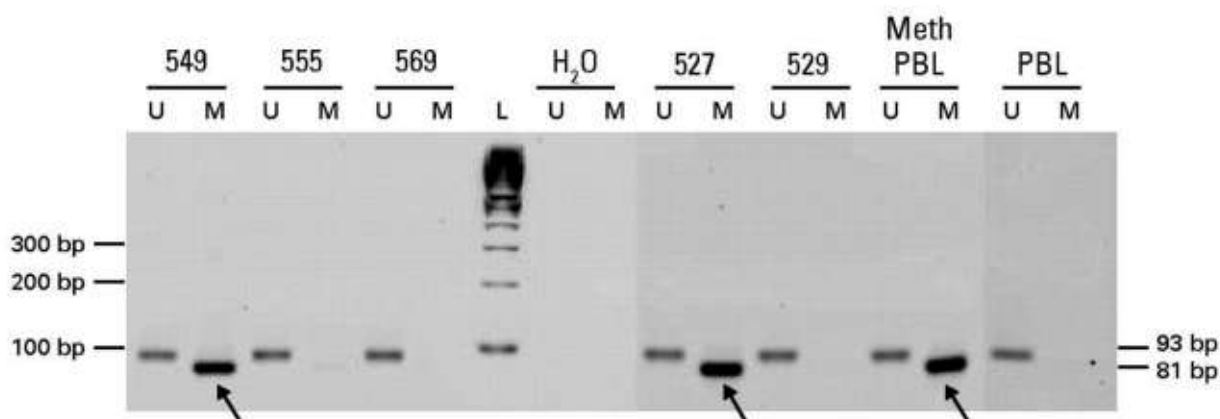
Slika 5. Predloženi algoritam lečenja GBM pacijenata zasnovan na statusu metilacije *MGMT* i drugih kliničkih parametara; HGG – high grade glioma, eng. – gliomi visokog gradusa (preuzeto iz rada Mansouri i sar., 2019) [18]

METILACIONO-SPECIFIČNA POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA

Metilaciono-specifična polimerazna lančana reakcija ili MSP predstavlja najranije opisanu i najzastupljeniju metodu detekcije metilacije *MGMT* promotornog regiona, a njena validnost je više puta dokazana randomizovanim studijama [18,34,35,36].

Suštinu ove tehnike čini bisulfitna konverzija DNK izolata kojom se postiže konvertovanje nemetilovanog citozina u uracil. Bisulfitna konverzija je praćena amplifikacijom *MGMT* alela (ili druge sekvence DNK od interesa) metodom polimerazne lančane reakcije PCR (*polymerase chain reaction*, eng.), uz korišćenje posebno dizajniranih oligonukleotida koji prepoznaju i vezuju specifična CpG mesta unutar DMR1/2 regiona [37]. Amplifikacija se izvršava istovremeno u dve zasebne PCR reakcije - u jednoj dolazi do umnožavanja metilovanog PCR produkta, a u drugoj nemetilovanog PCR produkta. Pri tome se koriste dva seta oligonukleotida, od kojih jedan set prepoznaje metilovanu formu promotorne sekvence, a drugi njenu nemetilovanu formu. Oligonukleotidi za metilovanu formu omogućavaju amplifikaciju isključivo potpuno metilovanih regiona *MGMT* koji imaju biološku funkciju utišavanja *MGMT* transkripcije. Drugačiji šabloni metilacije (nepotpuna metilacija) ovih CpG pozicija koji bi mogli imati biološku ulogu utišavanja transkripcije se zbog toga ne mogu detektovati, što umanjuje senzitivnost metode. Najpouzdaniji i najčešće korišćeni setovi oligonukleotida za *MGMT* promotorni region definisali su Esteller i saradnici pre dve decenije [38]. PCR produkti koji se dobijaju njihovom primenom obuhvataju CpG mesta od pozicije 73 do pozicije 90 unutar DMR2 regiona [38,39].

Umnožene sekvence se vizuelizuju metodom gel-elektroforeze u cilju kvalitativne interpretacije signala (utvrđivanja prisustva PCR produkta određene dužine) (Slika 6.) [38,40].



Slika 5. Vizuelizacija MSP rezultata na gel-elektroforetskom snimku; strelice označavaju metilovanu M formu *MGMT* promotornog regiona; U – nemetilovana forma *MGMT* promotornog regiona; L – (*ladder*, eng.) 100 bp DNK marker; PBL – *peripheral blood lymphocytes*, eng. – uzorak DNK izolovane iz leukocita periferne krvi; Meth PBL – *methylated peripheral blood lymphocytes*, eng. – metilovani uzorak DNK izolovane iz leukocita periferne krvi (preuzeto iz rada Hegi i sar., 2008.) [40]

Uspeh bisulfitne konverzije zavisi od kvaliteta DNK izolata i tipa uzoraka tkiva. Iako su uzorci FFPE tkiva (*formalin-fixed and paraffin-embedded Tissue*, eng. - tkiva fiksirana u formalinu i ukalupljena u parafinske blokove) zbog nezahtevnih uslova skladištenja najuobičajeniji izvor DNK materijala pri MSP analizama (i molekularno-biološkim analizama uopšte), izolate DNK poreklom iz njih često odlikuje nizak kvalitet odnosno visok stepen degradacije. Zbog toga se pri izvođenju MSP metode savetuje izbegavanje ovakvih uzoraka, kada god je to moguće [23,41].

Originalna MSP metoda je pouzdana jedino u detekciji izrazito metilovanih ili nemetilovanih uzoraka zbog toga što zavisi od subjektivne interpretacije (uočavanja traka PCR produkta na elektroforetskom gelu). Međutim, evaluacija slabije metilovanih uzoraka pokazala se nepouzdanom, a takvi uzorci se označavaju kao „dvosmisleni“. Pored toga, deo uzoraka (DNK izolata) može pokazati različiti status metilacije za više replikata, što se označava kao „nekonzistentni“ status metilacije. Pokazano je da stopa nekonzistentnosti MSP metode iznosi 12%, a pronađeno je da se vreme preživljavanja pacijenata kod kojih je utvrđen „nekonzistentni“ status metilacije poklapalo sa vremenom preživljavanja pacijenata sa nemetilovanim *MGMT* promotornim regionom [42].

Ova metoda ne omogućava preciznu kvantitativnu evaluaciju metilacije promotornog regiona *MGMT* gena. Kvantitativna evaluacija sa ciljem detekcije manjih grupa ćelijskih klonova sa metilovanim promotrom *MGMT* može imati predikcioni i prognostički značaj usled visoke intratumorske heterogenosti GBM uzoraka. U prilog tome govori saznanje da čak i pacijenti sa niskim nivoom metilacije *MGMT* promotora mogu imati korist od terapije alikilirajućim agensima. To je podržano činjenicom da GBM mogu sadržati male populacije glioma-inicirajućih ćelija (GIC) koje se karakterišu visokom stopom metilacije *MGMT*. [18, 43]. Uprkos tome, rezultati većeg broja studija ukazuju na „dozno-zavisni“ trend, po kome je porast stepena metilacije asociran sa boljim vremenom preživljavanja [43].

Računarskom obradom gel-elektroforetskih snimaka uz pomoć softvera poput „ImageJ“ (ImageJ software analysis (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), eng.) moguće je donekle unaprediti interpretaciju MSP rezultata i dobiti semi-kvantitativne vrednosti statusa metilacije, što povećava potencijal ove metode za širu kliničku primenu u dijagnostičkim procedurama. Tako su Christians i saradnici na osnovu odnosa intenziteta metilovanih (M – *methylated*, eng.) i nemetilovanih (U – *unmethylated*, eng.) PCR amplikona *MGMT* promotornog regiona na elektroforetskom gelu definisali tri nivoa metilacije: jako metilovani- ukoliko je M/U vrednost veća od 1, slabo metilovani – ukoliko je M/U vrednost između 0 i 1 i nemetilovani - M/U vrednost jednaka 0 [44].

Uprkos navedenim ograničenjima, MSP predstavlja najčešće korišćenu i visoko standardizovanu metodu koja pruža čvrste i pouzdane rezultate u roku od nekoliko sati, uz minimalne troškove analize.

KVANTITATIVNA METILACIONO-SPECIFIČNA POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA (qMSP)

Kvantitativna MSP analiza deli isti princip analize sa konvencionalnom MSP, uz dodatak upotrebe „Real-time“ PCR tehnologije odnosno fluorimetrije.

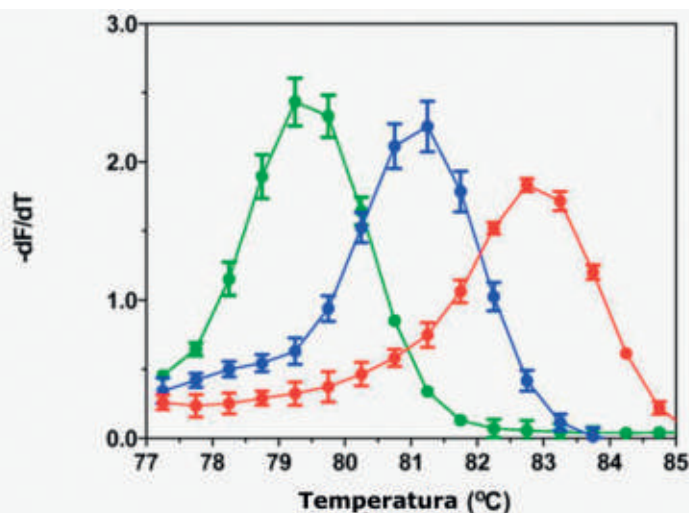
Zahvaljujući fluorimetrijskoj nadgradnji PCR sistema omogućena je kvantifikacija specifične sekvence DNK u uzorku i prevazilaženje ograničenja koja odlikuju konvencionalni kvalitativni PCR. U zavisnosti od prirode fluorimetrijskih reagenasa, postoje dva osnovna pristupa „Real-time“ PCR kvantifikaciji: direktni i indirektni pristup. Direktni pristup podrazumeva korišćenje fluoroforma (poput SYBR Green boje) koje se nespecifično vezuju za dsDNA (double stranded DNA, eng. – dvolančani DNK molekul). Indirektni pristup se zasniva na korišćenju specifičnih, fluorescentnim bojama obeleženih DNK proba koje prepoznaju i isključivo se vezuju za sekvencu od interesa u uzorku (FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, eng. - fluorescentni rezonantni transfer energije) tehnologija, *TaqMan*[®] probe).

Bez obzira na pristup, intenzitet emitovane fluorescencije detektuje se pomoću odgovarajućeg optičkog detekcionog sistema u cilju definisanja C_t (cycle threshold, eng.) (C_q) vrednosti i konstruisanja krive amplifikacije. C_t vrednost se definiše kao broj PCR ciklusa u kome se registruje značajna promena intenziteta fluorescencije (dRn) u odnosu na „pozadinski“ signal. Niska C_t vrednost ukazuje na visoku početnu koncentraciju sekvence od interesa u uzorku, i obratno. C_t vrednost predstavlja ključni parametar qPCR analize i na osnovu nje je moguće odrediti početnu koncentraciju sekvence od interesa u uzorku (apsolutna kvantifikacija) ili uporediti njenu koncentraciju sa koncentracijom neke druge sekvence ili gena u uzorku (relativna kvantifikacija). Upotreba ove metode pri evaluaciji statusa metilacije *MGMT* promotora se najčešće oslanja na relativnu kvantifikaciju (SYBR-Green), odnosno normalizaciju broja kopija metilovanog *MGMT* PCR produkta u odnosu na broj kopija nemetilovane forme *MGMT* promotora i/ili nekog gena „normalizatora“, „housekeeping“ gena poput ACTB (Beta-Actin, eng. - beta aktin) [18,39]. Na ovaj način je omogućena pouzdanija semikvantifikacija (semi-kvantitativni MS-MSP) odnosno kvantifikacija (kvantitativni MSP) statusa metilacije *MGMT* promotora u uzorcima tumora [33,45].

Kod indirektnog pristupa PCR kvantifikaciji, registrovanje amplifikacije tokom PCR reakcije predstavlja pouzdan i dovoljan dokaz za identifikaciju PCR produkta od interesa, zahvaljujući FRET probama dizajniranim za specifično prepoznavanje sekvence od interesa.

Sa druge strane, direktni pristup Real-Time PCR tehnologije uključuje konstruisanje „krive topljenja“ (*melting curve analysis*, eng.) koja omogućava identifikaciju specifičnog PCR produkta. Njen oblik je određen dužinom DNK fragmenta koji se amplifikuje, kao i njegovim nukleotidnim sastavom [46]. Svaki PCR produkt odlikuje karakteristična temperatura topljenja, odnosno temperatura na kojoj je denaturisano 50% molekula DNK. Karakteristična temperatura topljenja nekog PCR produkta se na grafiku krive topljenja uočava kao njen „pik“ koji dokazuje prisustvo tog PCR produkta u uzorku [47].

Direktna, semi-kvantitativna qMSP metoda dovodi do uštede vremena utrošenog na dokazivanje prisustva specifičnog PCR produkta, koje se kod konvencionalne MSP metode oslanja na metodu gel-elektroforeze. Ovom metodom se postiže evaluacija statusa metilacije *MGMT* korišćenjem ranije navedenih konvencionalnih MSP oligonukleotida pri direktnom Real-Time pristupu qMSP, gde je prisustvo „pik“-a na temperaturi od 81 °C grafika krive topljenja dokaz za prisustvo metilovane forme promotornog regiona *MGMT* (Slika 7.) [46,47].



Slika 3. NOA-04 interaktivni model izbora terapijske strategije zasnovan na najvažnijim biomarkerima GBM (preuzeto iz rada Rhun i sar., 2015.) [31]

Međutim, kako bi rezultati qMSP bili klinički relevantni, neophodno je precizirati granične vrednosti za razlikovanje metilovanih od nemetilovanih uzoraka. Tehnička granična vrednost koja označava verovatnoću prisustva/odsustva metilacije od 50% se najčešće koristi za razdvajanje pozitivnih i negativnih rezultata [18]. Ukoliko je dobijeni rezultat u blizini granične vrednosti, on se smatra „dvosmislenim“ ili „unutar sive zone“ [18].

Yoshioka i saradnici su u studiji koja se odnosila na semikvantitativnu qMSP evaluaciju, pored prisustva pika pri temperaturi od 81 °C na krivi topljenja, kao dodatni kriterijum za definisanje pozitivnog statusa metilacije definisali i ΔC_t granične vrednosti. ΔC_t granična vrednost izražava se kao razlika između dobijenih C_t vrednosti za nemetilovani i metilovani *MGMT* produkt. U navedenoj studiji zabeležene su statistički značajne razlike u kliničkom ishodu GBM pri korišćenju ΔC_t graničnih vrednosti koje su iznosile 0,2,4,6 [33].

PROCENAT METILOVANE REFERENCE *MGMT* – NAJPOUZDANIJI PRISTUP qMSP

Kao potencijalno najoptimalnija metoda qMSP kvantifikacije statusa metilacije izdvaja se ona koju su predstavili Havik i saradnici [45]. Ona podrazumeva kvantitativno izražavanje stepena metilacije promotornog regiona *MGMT* kao procenta metilovane reference (PMR, *percentage of methylated reference*, eng.), pri čemu se kao granična vrednost uzima PMR=0 [45]. PMR predstavlja relativni odnos količine metilovanog *MGMT* produkta u uzorku i količine metilovanog *MGMT* produkta u komercijalno dostupnoj metilovanoj kontroli (bisulfitno konvertovana *in vitro* metilovana humana DNK, Chemicon, Millipore). Kao kalibrator nulte PMR vrednosti preporučuju su uzorci meningioma koje karakteriše odsustvo metilacije *MGMT* promotora. Količine *MGMT* promotora u uzorku i kontroli normalizuju se korišćenjem oligonukleotida za *ALU-C4* repetitivnu sekvencu po sledećoj formuli.

$$PMR = \frac{M / ALU \text{ u uzorku}}{M / ALU \text{ u metilovanoj kontroli}}$$

Takođe, za uzorke koji imaju veću vrednost od granične C_t vrednosti (35), smatra se da je količina PCR produkta jednaka 0 [45].

U brojnim istraživanjima, ali i velikim kliničkim studijama, qMSP metoda je pokazala visok potencijal za primenu u kliničkoj praksi, pre svega zbog visoke reproducibilnosti rezultata i pouzdanosti, ali i pristupačnih troškova.

ZAKLJUČAK

Otkriće *IDH1 R132H* mutacije kao molekularnog markera glioblastoma značajno je unapredilo klasifikaciju difuznih glioma, a naročito glioma nižeg gradusa. Dokazi o direktnom uticaju ove mutacije na povećanje produkcije onkometabolita 2-HG povezanog sa ćelijskim preživljavanjem, epigenetičkim mehanizmima regulacije aktivnosti gena i metaboličkih procesa otvorili su mogućnost razvoja ciljane terapije putem inhibitora mutirane forme IDH enzima. Iako je još uvek nepoznato na koji način *IDH* mutacije promovišu procese inicijacije i progresije GBM, kao i razlog povoljnijeg kliničkog ishoda kod nosioca ove mutacije, evaluacija statusa ovog markera nezaobilazna je u kliničkoj praksi i prognostičkoj stratifikaciji GBM. Predloženi modeli kombinovane evaluacije statusa *IDH1 R132H* mutacije i statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* predstavljaju obećavajuću pomoć prilikom prilagođavanja terapijskih protokola pojedinačnim pacijentima – primene alkilirajućih agenasa odnosno radioterapijskih režima. Takođe, uzimajući u obzir dokazanu usku povezanost kliničkog ishoda kod GBM pacijenata i statusa metilacije *MGMT*, šira zastupljenost evaluacije statusa metilacije promotornog regiona *MGMT* MSP metodom pri dijagnostičkim laboratorijama postavlja se kao imperativ u unapređenju molekularnog profilisanja tumora kod GBM pacijenata.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije - broj ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO u 2022. godini: 451-03-68/2022-14/200124.

LITERATURA

1. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino MdC, Otero A, Lopes MC, et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *The American Journal of Pathology*. 2015;185(7):1820-33.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
3. Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *The Journal of Pathology*. 2014;232(2):165-77.
4. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(8):765-73.
5. Visser O, Ardanaz E, Botta L, Sant M, Tavilla A, Minicozzi P, et al. Survival of adults with primary malignant brain tumours in Europe; Results of the EURO CARE-5 study. *European Journal of Cancer*. 2015;51(15):2231-41.
6. Huang LE. Friend or foe—IDH1 mutations in glioma 10 years on. *Carcinogenesis*. 2019;40(11):1299-307.
7. Mansouri A, Karamchandani J, Das S. Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469981/> doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch2
8. Huang LE, Cohen AL, Colman H, Jensen RL, Fufts DW, Couldwell WT. IGF2BP2 expression predicts IDH-mutant glioma patient survival. *Oncotarget*. 2017;8(1):191-202.
9. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y-M, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO reports*. 2011;12(5):463-9.
10. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. 2013;340(6132):626-30.
11. Struys EA. D-2-Hydroxyglutaric aciduria: Unravelling the biochemical pathway and the genetic defect. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2006;29(1):21-9.
12. Tiburcio PDB, Xiao B, Berg S, Asper S, Lyne S, Zhang Y, et al. Functional requirement of a wild-type allele for mutant IDH1 to suppress anchorage-independent growth through redox homeostasis. *Acta Neuropathologica*. 2018;135(2):285-98.
13. Bardella C, Al-Dalahmah O, Krell D, Brazauskas P, Al-Qahtani K, Tomkova M, et al. Expression of Idh1(R132H) in the Murine Subventricular Zone Stem Cell Niche Recapitulates Features of Early Gliomagenesis. *Cancer Cell*. 2016;30(4):578-94.
14. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 2012;483(7390):484-8.
15. Izquierdo-Garcia JL, Viswanath P, Eriksson P, Cai L, Radoul M, Chaumeil MM, et al. IDH1 Mutation Induces Reprogramming of Pyruvate Metabolism. *Cancer Res*. 2015;75(15):2999-3009.
16. Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann R-D, et al. Phase II Trial of Lomustine Plus Temozolomide Chemotherapy in Addition to Radiotherapy in Newly Diagnosed Glioblastoma: UKT-03. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(27):4412-7.
17. Cankovic M, Nikiforova MN, Snuderl M, Adesina AM, Lindeman N, Wen PY, et al. The Role of MGMT Testing in Clinical Practice: A Report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15(5):539-55.
18. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncology*. 2019;21(2):167-78.
19. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*. 2014;10(7):372-85.
20. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(10):987-96.
21. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi M, Jaeckle KA, et al. RTOG 0525: A randomized phase III trial comparing standard adjuvant temozolomide (TMZ) with a dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM). *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(15_suppl):2006-.

22. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2010;12(2):116-21.
23. Jovanović NM, Nikolov V, Vidović N, Vitorović J, Cvetković VJ, Mitrović T, et al. Optimizing conditions for MGMT promoter methylation status analysis in glioblastoma FFPE samples. *Biologica Nyssana* 2020; 11: 139–147.
24. Jovanović N, Mitrović T, Cvetković VJ, Tošić S, Vitorović J, Stamenković S, et al. The Impact of MGMT Promoter Methylation and Temozolomide Treatment in Serbian Patients with Primary Glioblastoma. *Medicina*. 2019;55(2).
25. Jovanović N, Mitrović T, Cvetković VJ, Tošić S, Vitorović J, Stamenković S, et al. Prognostic significance of MGMT promoter methylation in diffuse glioma patients. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019;33(1):639-44.
26. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(11):1148-59.
27. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(11):1027-37.
28. Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, von Deimling A, Gorlia T, Hoang-Xuan K, et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *Lancet Oncol*. 2016;17(11):1521-32.
29. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(5):1597-604.
30. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 Randomized Phase III Trial of Sequential Radiochemotherapy of Anaplastic Glioma With Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(35):5874-80.
31. Le Rhun E, Rhun EL, Taillibert S, Chamberlain MC. The future of high-grade glioma: Where we are and where are we going. *Surgical neurology international*. 2015;6(Suppl 1):S9-s44.
32. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(7):707-15.
33. Yoshioka M, Matsutani T, Hara A, Hirono S, Hiwasa T, Takiguchi M, et al. Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma. *Oncotarget*. 2018;9(45).
34. Bujko M, Kowalewska M, Danska-Bidzinska A, Bakula-Zalewska E, Siedlecki JA, Bidzinski M. The promoter methylation and expression of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in uterine sarcoma and carcinosarcoma. *Oncol Lett*. 2012;4(3):551-5.
35. Cho B, Lee H, Jeong S, Bang Y-J, Lee HJ, Hwang KS, et al. Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene CAGE is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;307(1):52-63.
36. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(5):1827-31.
37. Grossman R, Burger P, Soudry E, Tyler B, Chaichana KL, Weingart J, et al. MGMT inactivation and clinical response in newly diagnosed GBM patients treated with Gliadel. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2015;22(12):1938-42.
38. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999;59(4):793-7.
39. Johannessen LE, Brandal P, Myklebust T, Heim S, Micci F, Panagopoulos I. MGMT Gene Promoter Methylation Status - Assessment of Two Pyrosequencing Kits and Three Methylation-specific PCR Methods for their Predictive Capacity in Glioblastomas. *Cancer genomics & proteomics*. 2018;15(6):437-46.
40. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(25):4189-99.

41. Tournier B, Chapusot C, Courcet E, Martin L, Lepage C, Faivre J, et al. Why do results conflict regarding the prognostic value of the methylation status in colon cancers? the role of the preservation method. *BMC Cancer*. 2012;12(1):12.
42. Xia D, Reardon DA, Bruce JL, Lindeman NI. The Clinical Implications of Inconsistently Methylated Results from Glioblastoma MGMT Testing by Replicate Methylation-Specific PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2016;18(6):864-71.
43. Sciuscio D, Diserens AC, van Dommelen K, Martinet D, Jones G, Janzer RC, et al. Extent and patterns of MGMT promoter methylation in glioblastoma- and respective glioblastoma-derived spheres. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(2):255-66.
44. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma. *PloS one*. 2012;7(3):e33449.
45. Håvik AB, Brandal P, Honne H, Dahlback H-SS, Scheie D, Hektoen M, et al. MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):36.
46. Lorente A, Mueller W, Urdangarín E, Lázcoz P, von Deimling A, Castresana JS. Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semiquantitative real time PCR. *BMC Cancer*. 2008;8(1):61.
47. Smith E, Jones ME, Drew PA. Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC Cancer*. 2009;9(1):123.

Molekularni profil timoma

Jelena Perić

Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd

Kontakt: jelena.kostic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Timomi, timusni karcinomi (TC) i timusni neuroendokrini kanceri su najčešće neoplazije lokalizovane u timusu i pripadaju retkim formama tumora. Timomi su indolentne forme tumora, a klasifikovani su u A, AB, B1, B2, B3 kategorije. Novije genetičke studije timoma pokazale su da je jedan od dominantnih markera ove bolesti, gen *GTF2I* sa najčešćim 'drajver' varijantama Chr7 c.1211T>A, p. Leu404His i c.1271T>A, p. Leu424His. Pored *GTF2I*, u patogenezu timoma su uključeni *EGFR*, *TP53*, kao i Ras signalni putevi. Molekularna pozadina timoma još uvek nije dovoljno istražena, međutim sa sve većim napretkom novih tehnologija, poput sekvenciranja nove generacije (eng. NGS) došlo se do novih informacija koje ukazuju na uzrok, detektuju nove molekularne markere, a samim tim omogućuju uspešnije terapijske pristupe ovoj patologiji.

Ključne reči: timomi, sekvenciranje nove generacije, varijante

Molecular profile of thymoma

Jelena Perić

Laboratory for molecular biomedicine, Institute for molecular genetics and genetic engineering,
University in Belgrade, Belgrade

Correspondence: jelena.kostic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

Thymoma, thymic carcinoma (TC), and thymic neuroendocrine carcinoma are rare thymic epithelial tumors (TETs) and the most frequent thymus-specific neoplasia. Thymomas are indolent or the less aggressive forms of TETs classified into the following subgroups A, AB, B1, B2, and B3. The most recent studies suggest thymoma specific gene *GTF2I*, with Chr7 c.1211T> A, p. Leu404His and c.1271T>A, p. Leu424His, is considered driver variants for this disease. Additionally, in thymoma pathogenesis are included *EGFR*, *TP53* and Ras signaling pathways. The molecular background of thymoma is still obscure, but the advance of new technologies such as next-generation sequencing (eng. NGS) brings new information related to the molecular milieu of thymoma and other cancers. New information help to explore the cause of the disease, detection of new molecular markers, and better therapy approaches for thymoma.

Keywords: Thymoma, next-generation sequencing, variants

Uvod

Klinički parametri i dijagnostički pristupi kod timoma

Epitelni tumori timusa su timomi, timusni karcinomi i timusni neuroendokrini karcinomi koji su lokalizovani u timusu (1). Postoji značajna raznolikost u genetičkim i kliničkim svojstvima kada su u pitanju različiti tipovi epitelnih tumora timusa. Timomi su najmanje agresivni i prema WHO (World Health Organization) klasifikaciji su podeljeni na A, AB, B1, B2 i B3 subkategorije. Prema Masaoka-Koga kliničkim stadijumima podeljeni su na I, IIa, IIb, III, IVa, IVb subtipove. Timomi spadaju u retke bolesti sa godišnjom incidencom 0.15 na 100.000 ljudi (2, 3). Acocirani su često sa autoimunim oboljenjima poput miastenije gravis (MG). Predstavljaju histološki vrlo heterogenu grupu bolesti. Karakteriše ih dobra prognoza ishoda bolesti kod pacijenata. Kao i kod drugih tumora, mnogo faktora doprinosi timomagenezi, od kojih su mnogi još uvek nepoznanica koju treba rasvetliti, kako na nivou spoljašnjih faktora, tako i na nivou molekularno-genetičkih uzroka (4). Pored toga, status timoma i njegova progresija ne mogu se predvideti radiološkim metodama, to je moguće nakon hirurških zahvata i daljih histoloških analiza. Zbog toga su podaci o relevantnim molekularnim markerima značajni, kako bi se primenio odgovarajući terapijski pristup pacijentu.

U lečenju timoma potreban je multidisciplinarni pristup koji je rezultat bliske saradnje bolesnika i njegove porodice, kliničara, radiologa, bronhologa/hirurga, patologa, molekularnog biologa/genetičara. Preduslov uspešnog lečenja su procedure u pravovremenom detektovanju bolesti, što je, sa imperativom personalizovanog pristupa i izbora dijagnostičkih postupaka: anamneza i klinički pregled, krvna slika sa retikulocitima, LDH, beta HCG, alfa fetoprotein.

Testovi za detekciju autoimunih poremećaja prema kliničkom nalazu i ustanovljenom prisustvu paraneoplastičkih sindroma (npr. prisustvo antitela na acetilholinske receptore kod mijastenije gravis) su: serumski imunoglobulini (kvantitativno), imunoprecipitacija za detekciju monoklonalnih Ig, elektroforeza proteina, imunohistohemijski (IHH) i biološki markeri i invazivne procedure (biopsije, operacija).

Radiološka dijagnostika

Radiografije grudnog koša omogućuju dobru procenu verovatne vrste lezije, istovremeno služe i kao dobra smernica za izbor dopunskih dijagnostičkih postupaka.

Radiografijom grudnog koša timomi se uočavaju kao inkapsulirane mase, dobro ograničene od okolnog tkiva, grubo sferičnog izgleda i manje ili više lobulirani. Uobičajeno, oni su lokalizovani anteriorno, unilateralno, blizu aortnog luka. Krivolinijske, periferne kalcifikacije ukazuju na benignu formu. Pretežno amorfne kalcifikacije mogu da se pojave u obe forme, invazivnoj i neinvazivnoj (5).

Kompjuterizovana tomografija grudnog koša (CT toraksa) i nuklearna magnetna rezonanca (NMR).

Kompjuterizovanom tomografijom grudnog koša (CT), timom se najčešće uočava kao multilobularna formacija koja proizilazi iz jednog ili oba lobusa timusa, na taj način onemogućavajući vizuelizaciju uobičajene forme timusa. Odlikuje se homogenošću ili nehomogenošću usled prisustva kalcifikacija u timoma ili zbog prisustva nekrotičnog tkiva ili cističnih promena. *Zerhouni et al.* su objasnili značaj CT-a u evaluaciji širenja invazivnih timoma, što se loše vizuelizuje standardnim radiografijama grudnog koša (5). Takođe je sugerisano da je svim pacijentima sa invazivnim timomima koji angažuju dijafragmu potrebno uraditi CT gornjeg dela abdomena, da bi se imao jasan uvid u subdijafragmalno širenje bolesti (6). Nuklearnom ma-

gnetnom rezonancom (NMR) timomi se prezentuju kao hipodenzne ili hiperdenzne promene kao posledica formiranja cističnih, nekrotičnih ili hemoragičnih zona, kao potencijalno formiranje fibroznih septa unutar tumora. Kada je u pitanju utvrđivanje invazivnosti bolesti, MRI je informativnija u odnosu na CT pregled, i bolje prikazuje odnos tumora sa vaskularnim strukturama i limfnim žlezdama, što je od važnosti radi planiranja operativnog pristupa pacijenata. *Sakai et al.* su konstatovali da prisustvo nehomogene, lobulirane strukture ukazuje na invazivnu formu timoma (7, 8).

Date metode nemaju mogućnost histološkog prikaza, a samim tim i histološke dijagnoze. CT pruža dobru prostornu rezoluciju i pouzdana je u razlikovanju tumora medijastinuma od susednih patoloških promena pluća i pleure, i prikazuje raširenost neoplastičkog procesa. Detektuje i dilatacije velikih krvnih sudova, cistične oblasti i oblasti kalcifikacija u medijastinumu. MRI je senzitivna u dijagnostici patološki izmenjenih krvnih sudova i kompleksnih odnosa tumora sa medijastinalnim organima (6).

Tumorski markeri

Tumorski markeri su najčešće složeni makromolekuli ili, uopšteno rečeno, biološki parametri tumora. Metoda njihovog određivanja može biti korisna u izabranim slučajevima:

1. Predstavljaju potvrdu više za dijagnozu tumora
2. Ukazuju na efekat terapije
3. Ukazuju na pojavu recidiva tumora

Podeljeni su na sledeće grupe: produkti tumora (beta-humani horiogonadotropin- hCG-beta), citogenetske promene i molekularni markeri (onkogeni, tumor-supresorski geni).

Tumorski markeri su najčešće hormoni, enzimi, intracelularni proteini ili antigeni ćelijske membrane koji se otkrivaju i mere u serumu, plazmi, urinu ili drugim telesnim tečnostima. U serumu i urinu se imunološkim metodama otkrivaju beta – hCG, alfa – fetoprotein (AFP), kateholamini i njihovi raspadni produkti, i paratiroidni hormoni. Feohromicitomi i neki neurogeni tumori su udruženi sa povećanim nivoima urinarnih kateholamina, homovanilične kiseline, ili vanil - mandelične kiseline. Tkivni tumorski markeri su tkivni antigeni (proteini i hormoni). Za germinativne tumore medijastinuma se vezuje pojava AFP, placentalne alkalne fosfataze, hCG-beta, serumske LDH, neuron specifične enolaze (NSE) i teratokarcinomskog mucinu sličnog antigena (TRA-1-60). CD30 je dijagnostički marker za Hodgkinovu bolest, anaplastični limfom, embrionalni karcinom. Za timusne karcinoide i druge neuroendokrine tumore medijastinuma karakteristični su adeno-kortikotropni hormoni, hromogranin, citokeratin, sinaptofizin, bombesin, neuronspecifična enolaza (7, 8).

Molekularno-biološki aspekti timoma

Sa napretkom novih tehnologija poput sekvenciranja nove generacije (eng. NGS), doslo je do značajnog rasvetljavanja molekularne osnove timoma koja je dugo bila nepoznanica. Ipak, još mali broj radova na temu molekularnog profila ove retke bolesti sugerise na potrebu za daljim studijama. U studijama su korišćene različite tehnike sekvenciranja nove generacije poput sekvenciranja kompletnog genoma (eng. Whole genome sequencing-WGS), sekvenciranja kompletnog egzoma (eng. Whole exome sequencing-WES) i targetovanog sekvenciranja (eng. TS) koje se koristi za sekvenciranje ciljanog regiona jednog ili više gena, gde su najčešće u pitanju tzv. „hot-spot“ regioni u genomu (9, 10). Prednost sekvenciranja kompletnog genoma je to što se sekvencira ceo tumorski genom ili genom uopšte, dok su sekvenciranja egzoma i targetovano sekvenciranje ograničeni na egzome i sekvence koje su selektovane odgovarajućim odabirom regiona od in-

teresa za istraživanje ili dijagnostiku. Međutim, dubina čitanja koja se postiže sekvenciranjem kompletnog genoma je znatno niža (aproksimativno 30X) u odnosu na targetovano sekvenciranje koje, u zavisnosti od odabranog panela gena koji se sekvencira, može biti i preko 1000X, tako da se dobija uvid u somatske varijante karakteristične za tumorske subklonove, a nema ni potrebe za proverom pročitanih varijanti metodom Sangerovog sekvenciranja (11). Pored dubine čitanja, nedostaci sekvenciranja kompletnog genoma su ekonomski aspekti, kao i kompleksnost analiza dobijenih podataka. Targetovano sekvenciranje se koristi u istraživanjima gde je moguće odabrati komercijalno dostupni panel ili dizajnirati novi u zavisnosti od toga koji se geni analiziraju. Međutim, vrlo često se ovaj metodološki pristup koristi u dijagnostičke svrhe (12-14).

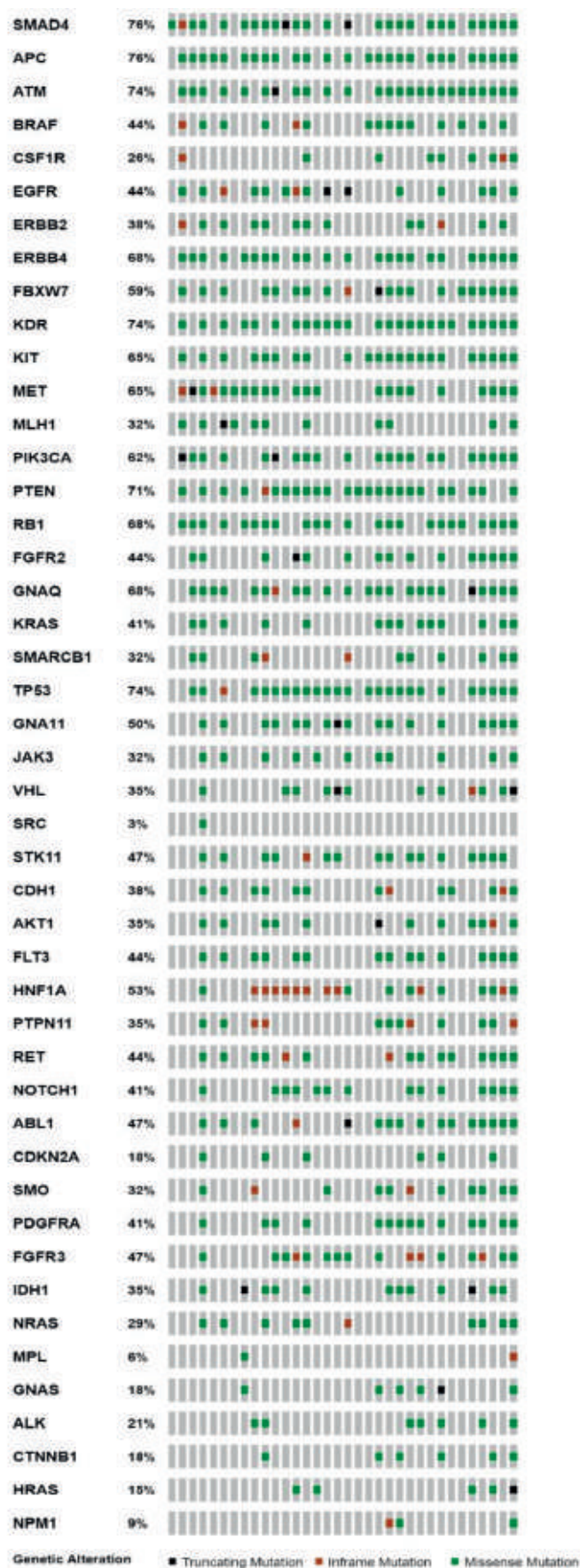
Targetovani paneli i sekvenciranje kompletnog genoma

Panelima koji pripadaju targetovanom sekvenciranju sprovedeno je nekoliko studija, gde su obično analizirani amplikoni gena koji su 'hot-spot' mesta u genima koji su najčešće mutirani u solidnim kancerima (15, 16). Jedan od često korišćenih amplikon panela je TruSeq Cancer Panel (TSACP) koji obuhvata 48 tumor-specifičnih gena sa 212 amplikona: *ABL1*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *JAK2*, *JAK3*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MLP*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53* i *VHL*. TSACP platforma omogućuje detekciju mutacija koje su zastupljene sa frekvencijom manjom od 5%, što je veoma značajno kada se imaju u vidu retke varijante i tumorska heterogenost (17). U jednoj od studija gde je korišćeno TS identifikovano je 168 rekurentnih varijanti (ponavljajuće varijante), koje su bile prisutne kod najmanje dva uzorka u analiziranoj kohorti pacijenata, od kojih je 25 varijanti uvelo stop kodon-nonsense varijante, 9 varijanti je menjalo okvir čitanja-frameshift, a 134 su bile substitucione varijante-missense. Varijante koje potencijalno mogu izazvati promene u strukturi i funkciji proteina detektovane su u *SMAD4*, *APC*, *ATM*, *PTEN*, *KDR* i *TP53* genima i bile su prisutne kod više od 70% analiziranih uzoraka. Distribucija tipova somatskih mutacija u 48 gena povezanih sa kancerom u ovoj grupi pacijenata predstavljena je u OncoPrint-u (Slika 1) (18). Potencijalno patogene varijante, čija je patogenost proveravana SIFT (19) i Poly-Phen-2 (20) softverskim algoritmima, prikazane su na Slici 2.

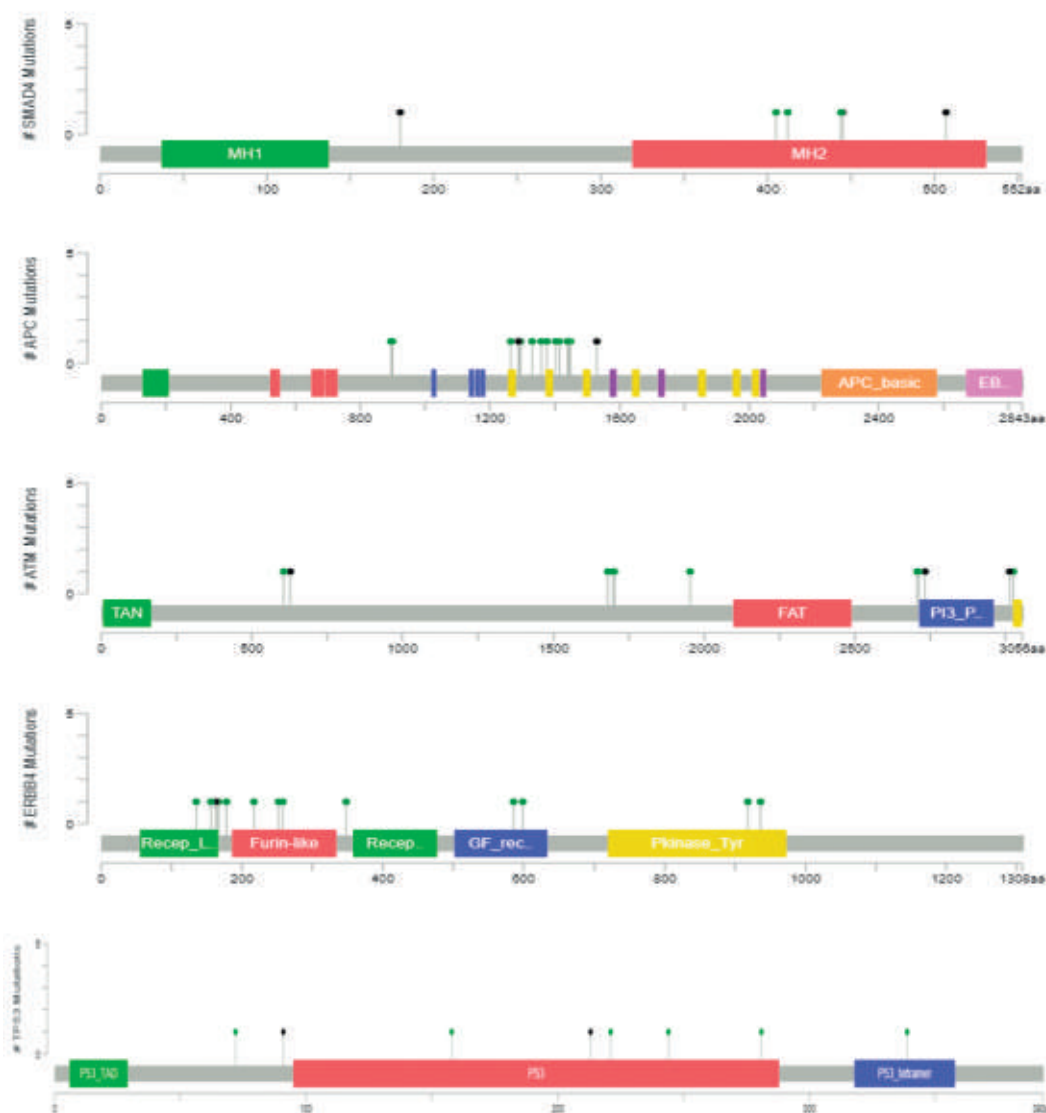
Jedna od studija u kojoj je primenjeno targetovano sekvenciranje (50 gena), korišćenjem Ion Ampli-Seq Cancer Hotspot Panel-a, detektovane su varijante u *HRAS* genu i to jedino u A1 subtipu timoma, dok su u B3 subtipu detektovane varijante u *SMARCB1* i *STK11* genima. Ostale varijante sa panela identifikovane su kod TC. FISH metodom u B3 subtipu timoma pokazana je delecija u *CDKN2A* genu (15).

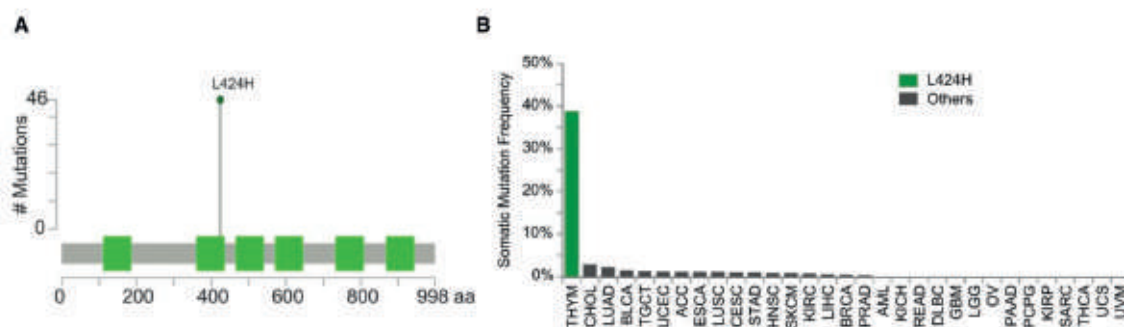
Prva sveobuhvatna studija koja je urađena na timomima metodom kompletnog sekvenciranja genoma koristila je Complete Genomics platformu. Analizirana je 55-to godišnja pacijentkinja koja je bolovala od IVA subtipa timoma. Na molekularnom nivou identifikovane su pojedinačne nukleotidne varijante (eng.SNV) i 2 male insercije/delecije (eng.InDel) koje dovode do promene na 'splajsing' mestima, kao i do promena na nivou proteina. Na hromozomima 1q, 5,7 i X detektovane su aberacije uzrokovane povećanim brojem ponovaka (eng. CNV), dok je smanjen broj ponovaka identifikovan na 3p, 6, 11q42.2 i q13. Dodatna translokacija t(11;X) je identifikovana metodom sekvenciranja kompletnog genoma uz dodatnu potvrdu Sangerovim sekvenciranjem (21).

Takođe, jedno od prvih istraživanja urađeno je metodom sekvenciranja kompletnog egzoma i sekvenciranja kompletnog genoma na jednom pacijentu sa B3 subtipom timoma i normalnim kariotipom. Pronađene su varijante u *DNMT3A* (p.G728D) i *ASXL1* (p.E657fs) genima koji su poznati tumor-supresorski geni u hematološkim malignitetima (22, 23).



Slika 1. OncoPrint prikazuje procenat pacijenata koji poseduju jednu od varijanti tipa nonsense (N), frameshift (F), missense (M) u jednom od 48 onkogena ili tumor- supresorskih gena kod 35 pacijenata u srpskoj populaciji. Tip mutacije je prikazan bojom, označenom u legendi, pojedinačni geni prikazani su u redovima, a uzorci tumora pacijenata u kolonama (16).





Slika 3. NOA-04 interaktivni model izbora terapijske strategije zasnovan na najvažnijim biomarkerima GBM (preuzeto iz rada Rhun i sar., 2015.) [31]

Pored *GTF2I* gena, ključnu ulogu u patologiji timoma imaju varijante u *HRAS*, *NRAS* i *TP53* genima i Chr16q loss (24). *HRAS*, *NRAS* i *TP53* imaju znatno manje rekurentnih varijanti, ali se zajedno sa *GTF2I* smatraju ključnim u nastanku bolesti. *HRAS* i *NRAS* pripadaju Ras signalnom putu. Velika većina varijanti u *HRAS* pripada „gain-of-function“ varijantama (kodon 12, 13, 117), a jedna od poznatih varijanti je G13V koja se nalazi i u drugim tumorima (26). Skorija studija Jovanović et al. takođe ukazuje na prisustvo rekurentnih mutacija u *HRAS* genu (27). *NRAS* varijante takođe pripadaju „gain-of-function“ varijantama i najčešće se javljaju u 61 kodonu.

Većina patogenih varijanti kod *TP53*, pripadaju klasi „gain-of-function“ varijantama. *TP53* gen je ključni tumor-supresorski gen koji učestvuje u regulaciji najvažnijih procesa poput ćelijskog ciklusa, apoptoze, senescencije, regulacije i reparacije DNK oštećenja (28). U skorijim istraživanjima detektovane su stop kodon varijante R213* and V91*, kao i četiri patogene missense varijante, D281N, G244S, R158C, E221K (16, 24, 29).

Prema podacima iz TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) baze iz 2021. godine, kod 27 pacijenata u kineskoj populaciji, najmutiraniji geni su *NF1* i *ATM* sa frekvencom od 11%. *GTF2I* mutacija je predominantno karakteristična za A, AB subtipove, dok je na nivou genske ekspresije *PD-L1* predominantno eksprimiran u B2 i B3 subtipu bolesti (30). U istraživanju koje su sprovedi Liu et al. koristeći širok spektar bioinformatičkih metoda, analizirani su rezultati mutacionog statusa, metilacionog statusu i iRNK sekvenciranja. Kao izvor podataka korišćena je TCGA baza podataka. Geni koji su se izdvojili kao važni za timome, asocirani su uglavnom za imunski odgovor. Neki od njih su *LIPE*, *MYH6*, *ACTG2*, *KLF4*, *SULT4A1* i *TF* (31).

Timomi i miastenia gravis (MS)

Timomi su često asocirani sa raznim paraneoplastičnim sindromima (PNS) i to u 50-70% slučajeva. Najčešće su asocirani sa miastenijom gravis (MG), koja predstavlja bolest kod koje je narušena funkcionalnost neuromotorne ploče (32). Odlikuje se slabošću i umorom, koji su posledica antitela na acetil-holinergičke receptore (AChR), koja direktno atakuju neuromuskularnu vezu (33). Timomi asocirani sa MG (TAMG) karakteristični su uglavnom za B subtipove, ređe za A i AB, a odsutni su kod TC. Inače, geni koji su uključeni u imunost i indukciju tolerancije nisu različito eksprimirani, kod različitih subtipova timoma, uključujući

gene na T ćelijama, proteaze koje igraju ulogu u njihovoj selekciji, apoptotske gene, koreceptore, kaskadne molekule i gene glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase I i klase II (eng. MHC). Primećeno je povećanje nivoa TLR3 - Toll-like receptora (34), i smanjenje proteinaze R i dvolančanih RNK (dsRNA) helikaza u pacijenata sa timomima asociranim sa MG. Pored toga, povećana je ekspresija CDNK2A, koji je marker HPV infekcije. Ono što je najupečatljivije je izrazito povećana ekspresija anti-interferon tipa I (IFN-I) antitela u timoma-MG asociranim patologijama (35, 36).

Autoimunost predstavlja jedno od osnovnih obeležja TAMG i prema podacima, ona je prisutna u blizu 30% od ukupnog broja slučajeva. Prema podacima TCGA baze, timomi su jedini tumori koji se proučavaju u kontekstu povezanosti sa autoimunošću. Prisustvo aneuploidija je tipičan nalaz za tumor-asociran sa autoimunošću, kao i blago povećana ekspresija autoantitela na titin, AchT i rianodin receptore - RYR1, RYR2 (37, 38).

Zaključak

Na osnovu svega navedenog, timomi su retki tumori sa relativno malim brojem studija na molekularnom nivou, čiji se broj povećava sa razvojem novih 'multi-omics' metodologija. U poslednjih par godina došlo se do mnogih novih saznanja u ovoj oblasti i otkrivanja novih molekularnih markera. Samim tim, omogućuje se bolje poznavanje molekularne pozadine ove bolesti i uspešniji personalizovani pristup kliničara kada je u pitanju izbor tretmana obolelih od ove bolesti.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržan od strane projekta Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. III 41004), i projekta EC EU-FP7-REGPOT-316088, 2013-2016.

Literatura

1. Cowen D, Richaud P, Mornex F, Bachelot T, Jung GM, Mirabel X, et al. Thymoma: results of a multicentric retrospective series of 149 non-metastatic irradiated patients and review of the literature. FNCLCC trialists. Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *Radiother Oncol.* 1995;34(1):9-16.
2. Engels EA, Pfeiffer RM. Malignant thymoma in the United States: demographic patterns in incidence and associations with subsequent malignancies. *Int J Cancer.* 2003;105(4):546-51.
3. Tomaszek S, Wigle DA, Keshavjee S, Fischer S. Thymomas: review of current clinical practice. *Ann Thorac Surg.* 2009;87(6):1973-80.
4. Yu L, Ke J, Du X, Yu Z, Gao D. Genetic characterization of thymoma. *Sci Rep.* 2019;9(1):2369.
5. Zerhouni EA, Scott WW, Jr., Baker RR, Wharam MD, Siegelman SS. Invasive thymomas: diagnosis and evaluation by computed tomography. *J Comput Assist Tomogr.* 1982;6(1):92-100.
6. Samardzic N. Kliničke manifestacije timoma. 2018.
7. Sakai F, Sone S, Kiyono K, Kawai T, Maruyama A, Ueda H, et al. MR imaging of thymoma: radiologic-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol.* 1992;158(4):751-6.
8. Strange CD, Ahuja J, Shroff GS, Truong MT, Marom EM. Imaging Evaluation of Thymoma and Thymic Carcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:810419.
9. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59.
10. Hirsch B, Endris V, Lassmann S, Weichert W, Pfarr N, Schirmacher P, et al. Multicenter validation of cancer gene panel-based next-generation sequencing for translational research and molecular diagnostics. *Virchows Arch.* 2018;472(4):557-65.
11. Xu H, DiCarlo J, Satya RV, Peng Q, Wang Y. Comparison of somatic mutation calling methods in amplicon and whole exome sequence data. *BMC Genomics.* 2014;15:244.
12. Duncavage EJ, Abel HJ, Szankasi P, Kelley TW, Pfeifer JD. Targeted next generation sequencing of clinically significant gene mutations and translocations in leukemia. *Mod Pathol.* 2012;25(6):795-804.
13. Simen BB, Yin L, Goswami CP, Davis KO, Bajaj R, Gong JZ, et al. Validation of a next-generation-sequencing cancer panel for use in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(4):508-17.
14. Sie D, Snijders PJ, Meijer GA, Doeleman MW, van Moorsel MI, van Essen HF, et al. Performance of amplicon-based next generation DNA sequencing for diagnostic gene mutation profiling in oncopathology. *Cell Oncol (Dordr).* 2014;37(5):353-61.
15. Enkner F, Pichlhofer B, Zaharie AT, Kronic M, Holper TM, Janik S, et al. Molecular Profiling of Thymoma and Thymic Carcinoma: Genetic Differences and Potential Novel Therapeutic Targets. *Pathol Oncol Res.* 2017;23(3):551-64.
16. Peric J, Samardic N, Trifunovic Škodric V, Tošić N, Stojšić J, Pavlović S, Jovanović D. Genomic profiling of thymoma using a targeted high-throughput approach. *Arch Med Sci.* 2020.
17. Stockley TL, Oza AM, Berman HK, Leighl NB, Knox JJ, Shepherd FA, et al. Molecular profiling of advanced solid tumors and patient outcomes with genotype-matched clinical trials: the Princess Margaret IMPACT/COMPACT trial. *Genome Med.* 2016;8(1):109.
18. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):pl1.
19. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-4.
20. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter 7:Unit7 20.
21. Petrini I, Rajan A, Pham T, Voeller D, Davis S, Gao J, et al. Whole genome and transcriptome sequencing of a B3 thymoma. *PLoS One.* 2013;8(4):e60572.
22. Belani R, Oliveira G, Erikson GA, Ra S, Schechter MS, Lee JK, et al. ASXL1 and DNMT3A mutation in a cytogenetically normal B3 thymoma. *Oncogenesis.* 2014;3:e111.
23. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(3):177-83.

24. Radovich M, Pickering CR, Felau I, Ha G, Zhang H, Jo H, et al. The Integrated Genomic Landscape of Thymic Epithelial Tumors. *Cancer Cell*. 2018;33(2):244-58 e10.
25. Higuchi R, Goto T, Hirotsu Y, Yokoyama Y, Nakagomi T, Otake S, et al. Primary Driver Mutations in GTF2I Specific to the Development of Thymomas. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8).
26. Chau NG, Kim ES, Wistuba I. The multidisciplinary approach to thymoma: combining molecular and clinical approaches. *J Thorac Oncol*. 2010;5(10 Suppl 4):S313-7.
27. Jovanovic D, Markovic J, Ceriman V, Peric J, Pavlovic S, Soldatovic I. Correlation of genomic alterations and PD-L1 expression in thymoma. *J Thorac Dis*. 2020;12(12):7561-70.
28. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):199-210.
29. Chen K, Che J, Zhang X, Jin R, Xiang J, Han D, et al. Next-generation sequencing in thymic epithelial tumors uncovered novel genomic aberration sites and strong correlation between TMB and MSH6 single nucleotide variations. *Cancer Lett*. 2020;476:75-86.
30. Liang N, Liu L, Huang C, Liu H, Guo C, Li J, et al. Transcriptomic and Mutational Analysis Discovering Distinct Molecular Characteristics Among Chinese Thymic Epithelial Tumor Patients. *Front Oncol*. 2021;11:647512.
31. Liu D, Zhang P, Zhao J, Yang L, Wang W. Identification of Molecular Characteristics and New Prognostic Targets for Thymoma by Multiomics Analysis. *Biomed Res Int*. 2021;2021:5587441.
32. Xi J, Wang L, Yan C, Song J, Song Y, Chen J, et al. The Cancer Genome Atlas dataset-based analysis of aberrantly expressed genes by GeneAnalytics in thymoma associated myasthenia gravis: focusing on T cells. *J Thorac Dis*. 2019;11(6):2315-23.
33. Kumar R. Myasthenia gravis and thymic neoplasms: A brief review. *World J Clin Cases*. 2015;3(12):980-3.
34. Chang R, Duan S, Li S, Zhang P. Viral infection in thymoma and thymic tumors with autoimmune diseases. *Thorac Cancer*. 2021;12(22):2971-80.
35. Cufi P, Soussan P, Truffault F, Fetouchi R, Robinet M, Fadel E, et al. Thymoma-associated myasthenia gravis: On the search for a pathogen signature. *J Autoimmun*. 2014;52:29-35.
36. Cufi P, Dragin N, Ruhlmann N, Weiss JM, Fadel E, Serraf A, et al. Central role of interferon-beta in thymic events leading to myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2014;52:44-52.
37. Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(5):259-68.
38. Girard N, Shen R, Guo T, Zakowski MF, Heguy A, Riely GJ, et al. Comprehensive genomic analysis reveals clinically relevant molecular distinctions between thymic carcinomas and thymomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6790-9.



MOLEKULARNA BIOLOGIJA CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA

MOLECULAR BIOLOGY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM



Ekspresija i funkcija insulina u centralnom nervnom sistemu

Tamara Dakić, Predrag Vujović

Katedra za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju, Institut za fiziologiju i biohemiju "Ivan Đaja", Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Kontakt: tamara.dakic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Nakon njegovog otkrića početkom dvadesetog veka, dugo je smatrano da se insulin isključivo sintetise u pankreasu i da u centralni nervni sistem (CNS) dospeva prolaskom kroz krvno-moždanu barijeru. Međutim, razvojem molekularno-bioloških metoda potvrđeno je prisustvo iRNK za preporoinsulin, samog (prepro)insulina, kao i C-peptida u nekim regionima mozga. Time je višestruko potvrđeno da se insulin, osim u pankreasu, sintetise i u CNS. Nakon otkrića da se i receptor za insulin eksprimira u CNS, ispitivanja su bila usmerena ka upoznavanju dejstva ovog hormona u mozgu. Pokazano je da je, između ostalog, uključen u kontrolu apetita, regulaciji reprodukcije, ali i procesa vezanih za učenje i konsolidaciju memorije. Takođe je utvrđeno da su poremećaji dejstva insulina u CNS povezani sa razvojem nekih neurodegenerativnih bolesti.

Iako je većina pomenutih efekata prvobitno pripisana insulinu koji iz sistemske cirkulacije dospeva u CNS, sve više se dizajniraju studije koje su orijentisane isključivo ka upoznavaju funkcije insulina koji nastaje u mozgu. Do sada je pokazano da se produkcija insulina u hipotalamusu smanjuje tokom stresnih situacija, što se negativno odražava na sintezu hormona rasta u adenohipofizi i njegovu sekreciju u sistemske cirkulaciju. Nasuprot tome, pokazano je da kratkotrajno gladovanje povećava ekspresiju insulina u neuronima istog moždanog regiona ali i da ovaj fenomen nije povezan sa povećanjem stope ugradnje glukoza transportera u ćelijsku membranu, niti sinteze glikogena u astrocitima. Biće potrebno sprovesti dodatne studije kako bi se u većoj meri upoznala uloga insulina koji nastaje unutar CNS.

Ključne reči: insulin, centralni nervni sistem, gladovanje, insulinska signalizacija, hipotalamus

Insulin expression and action in the central nervous system

Tamara Dakić and Predrag Vujović

Department for Comparative Physiology and Ecophysiology, Institute of Physiology and Biochemistry "Ivan Đaja",
University of Belgrade - Faculty of Biology

Correspondence: tamara.dakic@bio.bg.ac.rs

Abstract

After being discovered in the early twentieth century, insulin was long considered to be exclusively produced in the β -pancreatic cells. Therefore the presence of this hormone in the central nervous system (CNS) was accounted for solely by its transport across the blood-brain barrier. However, owing to the advances in molecular biological techniques, it was established that the preproinsulin mRNA, the (pre)proinsulin peptide and C-peptide were also present in the CNS parenchyma. These findings unequivocally proved that, in addition to the pancreas, insulin was also produced in the CNS. After discovery that the insulin receptor was also expressed in the brain, numerous studies aimed to discover the insulin actions within the CNS. It was found that insulin was involved in the control of appetite, reproduction, learning and memory consolidation. Moreover, it was confirmed that the impairment of insulin signaling within the certain brain regions was associated with various neurodegenerative disorders. Although these effects were initially assigned to the action of the insulin transported from the circulation into the CNS, more studies were designed to uncover the roles of insulin produced in the CNS. It has been shown so far that stress decreases hypothalamic insulin production which subsequently results in the decreased growth hormone production and its secretion from adenohypophysis. Furthermore, short-term fasting increased hypothalamic insulin expression in rats, albeit this phenomenon did not result in either increased glucose uptake nor glycogen production in this brain region. More studies are needed to fully elucidate the role of the centrally produced insulin.

Keywords: insulin, central nervous system, fasting, insulin signaling, hypothalamus

Uvod

Insulin je polipeptidni hormon koji se sintetisuje u β -ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa. Otkrili su ga Banting i Best 1922. godine [1] koji su na pankreaektomisanim psima pokazali da intravenozna administracija ekstrakta pankreasa snižava koncentraciju glukoze u krvi i urinu [1,2]. Oni su u svojim beleškama ovaj ekstrakt nazvali „isletin“ [2]. Postojanje supstance poreklom iz pankreasa koja snižava koncentraciju glukoze u krvi pretpostavljeno je mnogo godina ranije, a ime „insulin“ (latinski: *insula*, ostrvo), koje su kasnije prihvatili i Banting i Best, predložio je Jean de Meyer 1909. godine, a nezavisno i engleski fiziolog Edward Albert Sharpey-Schafer 1910. godine [2,3].

Nakon otkrića insulina, prvobitna istraživanja bila su uglavnom usmerana ka njegovoj primeni u lečenju dijabetesa, ali vremenom se proširivalo i znanje o njegovoj strukturi i dejstvima. Osnovna funkcija insulina je regulacija perifernog glukoznog metabolizma. Insulin stimuliše skeletne mišiće i masno tkivo da preuzimaju glukozu iz krvne plazme i stimuliše sintezu glikogena, proteina i masti u ćelijama jetre, mišića i masnog tkiva. Pored toga, regulaciju perifernog glukoznog metabolizma insulin vrši i posredno, delujući na odgovarajuće centre u hipotalamusu čime suprimira apetit i glukoneogenezu u jetri, odnosno, reguliše energetska homeostazu. Danas znamo da insulin ostvaruje i brojne druge uloge u centralnom nervnom sistemu (CNS), kao što su regulacija reprodukcije, učenja i formiranje memorije, a poremećaji dejstva insulina u CNS povezani su sa razvojem nekih neurodegenerativnih poremećaja, kao što je Alchajmerova bolest.

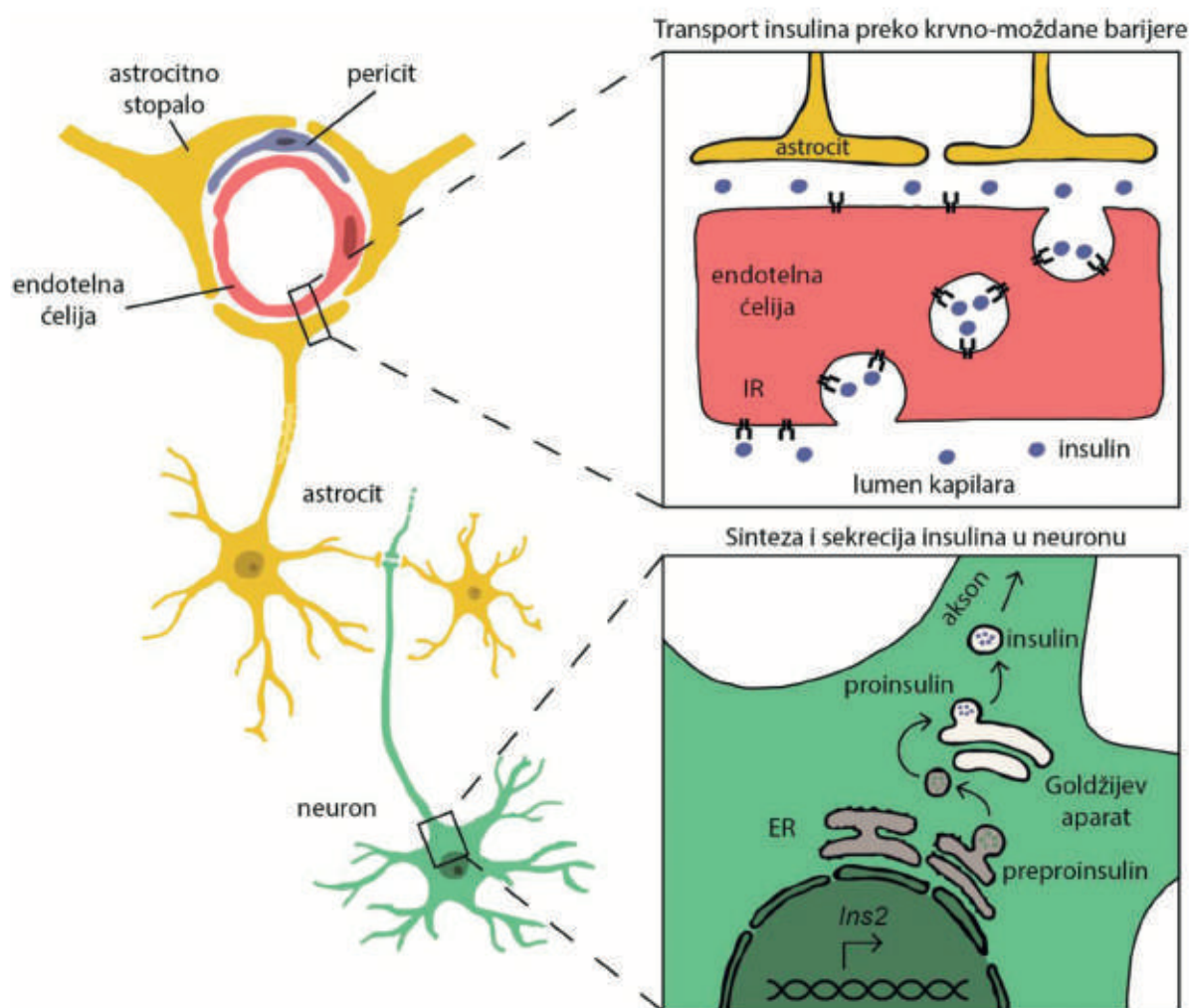
Kontrola sinteze i sekrecije insulina

Insulin se, kao i svi polipeptidni hormoni, sintetisuje u formi neaktivnog preprohormona, koji se naziva preproinsulin i izgrađen je od 110 amino-kiselina. U endoplazmatičnom retikulumu se sa preproinsulina iseca signalna sekvenca usled čega nastaje proinsulin. Potom se formiraju i tri disulfidne veze, koje molekulu proinsulina daju karakterističnu konformaciju. Nakon toga u Goldžijevom aparatu proinsulin se pakuje u vezikule, a unutar njih se delovanjem enzima prohormon konvertaze iseca središnji deo molekula, tzv. C-peptid, čime nastaje nastaje „zrel“ insulin sastavljen od 51 amino-kiselinskog ostatka. Nakon stimulacije β -ćelija pankreasa, egzocitozom se insulin i C-peptid sekretuju u sistemsku cirkulaciju. Glavni stimulus za sintezu i sekreciju insulina je povišena koncentracija glukoze u krvi, ali i drugi faktori mogu uticati na njegovu sekreciju. Povećana koncentracija amino-kiselina i akutno povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi nakon obroka stimulišu oslobađanje ovog hormona. Takođe, gastrointestinalni hormoni, glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1) i glukozno-zavistan insulinotropni polipeptid (GIP), tzv. inkretini, značajno povećavaju sekreciju insulina. Nasuprot tome, tokom stresnih situacija ili povećane fizičke aktivnosti, usled povećane simpatičke stimulacije srži nadbubrežnih žlezda povećava se sekrecija adrenalina koji inhibira izlučivanje insulina. Takođe, δ -ćelije pankreasa sekretuju somatostatin koji deluje parakrino i suprimira sekreciju insulina (detaljnije opisano u [4]).

Poreklo insulina u centralnom nervnom sistemu

Prvobitno je smatrano da insulin svoje efekte ostvaruje isključivo na periferna tkiva i da je CNS neosetljiv na dejstvo insulina. Međutim, u eksperimentu koji su izveli Margolis i Altszuler 1967. godine na psima (koji su prethodno podvrgnuti 18-20 časovnom gladovanju) pokazano je da se nakon intravenozne administracije insulina njegova koncentracija u cerebrospinalnoj tečnosti (CST) povećava [5]. U ovoj studiji prvi put je demonstrirano da insulin prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (KMB). Pored toga, ustanovljeno je da koncentracija insulina u CST ne raste proporcionalno porastu koncentracije insulina u krvi, ukazujući na to da se njegov transport kroz KMB ne odvija pasivnom difuzijom, već da postoji transportni sistem koji podleže

saturaciji [5]. Baura i saradnici su na psima potvrdili da pri suprafiziološkim koncentracijama insulina u krvi (i pri veštački održavanoj euglikemiji), transport insulina kroz KMB dostiže plato [6], dok su Banks i saradnici na miševima pokazali je doza insulina potrebna za saturaciju niža od doze koja izaziva hipoglikemiju [7]. Prisustvo insulina u CST detektovano je i kod drugih vrsta, uključujući pacova, zeca, majmuna i čoveka [8]. Kasnije je utvrđeno da se insulin transportuje kroz KMB receptor-posredovanom transcitozom (Slika 1) [9]. Naime, endotelne ćelije kapilara koji ulaze u sastav KMB, kao i endodimske ćelije poseduju insulinske receptore (IR) koji učestvuju u njegovom transportu iz krvne plazme u CNS. Insulin se vezuje za IR na luminalnom regionu membrane endotelne ćelije, nastali kompleks se internalizuje, nakon čega se insulin otpušta sa antiluminalne strane u intersticijum uz minimalnu degradaciju [8–11]. U kulturi endotelne ćelije izolovanih iz krvnih sudova mozga pokazano je da je u pitanju dvosmerni transport, posredovan IR i lipidnim raf- tom koji ne uključuje aktivaciju fosfatidilinozitol-3 kinaze (eng. *phosphoinositide-3-kinase* - PI3K) i ekstraćelijskim signalima regulisane kinaze (eng. *extracellular signal-regulated kinase* - ERK) [11].



Slika 1. Insulin u centralnom nervnom sistemu. Insulin sintetisan u pankreasu se izlučuje u sistemsku cirkulaciju iz koje se transportuje preko krvno-moždane barijere receptor-posredovanom transcitozom. Pored toga, insulin se sintetiše u neuronima. IR – insulinski receptor; ER – endoplazmatični retikulum.

KMB u različitim moždanim regionima ima različitu propustljivost za insulin. Najpermeabilniji regioni su u sklopu moždanog mosta, produžene moždane i hipotalamusa (posebno eminencija medijana), manje permeabilan je potiljačni region moždane kore, dok se talamus i srednji mozak smatraju nepropustljivim za insulin [12]. Stopa transporta insulina kroz KMB smanjuje se sa starenjem organizma, usled gojaznosti, kao i u slučaju nekih neurodegenerativnih oboljenja ako što je Alchajmerove bolesti [13]. Takođe, na smanjenje stope transporta utiče i ishrana bogata mastima [11], kortikosteroidi [14] i gladovanje [15].

Krajem sedamdesetih godina pojavila su se istaživanja u kojima je insulin detektovan ne samo u CST već i u parenhimu moždanog tkiva i tada se javila ideja o njegovoj sintezi u CNS. Prva studija, urađena 1978. godine od strane Havrankove i saradnika pokazala je prisustvo insulina u različitim moždanim regionima *ad libitum* hranjenih Sprague-Dawley pacova [16]. S obzirom da su izmerene koncentracije insulina u mozgu bile veće nego u crikulaciji, autori ove studije su pretpostavili da dolazi do sinteze insulina u CNS [16]. Svoju hipotezu dodatno su potvrdili kada su na gojaznim i dijabetičnim pacovima pokazali da koncentracija insulina u mozgu ne zavisi od njegove koncentracije na periferiji [17]. Naime, uprkos hipoinsulinemiji kod pacova kojima je dijabetes izazvan streptozotocinom ili hiperinsulinemije kod gojaznih pacova, nisu zabeležene promene koncentracije insulina u mozgu [17].

Dorn i saradnici su potvrdili prisustvo insulina u mozgu Wistar pacova [18,19], ali u znatno manjoj količini nego u mozgu C57BlksJ miševa [19]. Objašnjenje razlike u količini insulina detektovanog u mozgu pacova u ovoj i studiji koju je izvela Havrankova, možda leži u tome što je analiza rađena na različitim sojevima. Međutim, u druge dve studije rađene na Sprague-Dawley [20] i Wistar [21] pacovima zabeležena je niska koncentracija insulina u mozgu, značajno manja nego u plazmi [20,21]. Različite koncentracije insulina u opisanim studijama mogu biti posledica korišćenja različitih metoda za merenje. Osim kod pacova, insulin je detektovan i u mozgu kornjače, žabe i čoveka gde je pokazano da među vrstama postoji razlika u njegovoj količini [22]. Kod glodara, najveća koncentracija insulina detektovana je u hipotalamusu [16,19,21] i olfaktornim bulbusima [16,21].

Ideja o sintezi insulina u CNS bila je dugo osporavana zbog činjenice da je njegovo prisustvo detektovano radioimunološkim i imunohistohemijskim metodama, odnosno, na nivou proteina [16,17], ili zbog detekcije veoma niskih koncentracija ovog hormona [20,21]. Njegovo prisustvo u endotelnim ćelijama krvnih sudova i ependimskim ćelijama koje okružuju moždane komore inicijalno je pripisivano transportu iz krvi ili CST [23]. Baskin i saradnici su injecirali radioaktivno obeleženi insulin u lateralne moždane komore i zabeležili njegovo preuzimanje u hipotalamusu, najpre u ependimskim ćelijama, a nakon 30 minuta i u periventrikularnom (PeV) jedru, eminenciji medijani i dorzomedijalnom hipotalamusu [24], dodatno ukazujući na činjenicu da je prisustvo insulina u hipotalamusu posledica njegovog transporta iz CST [21,24].

Međutim, prisustvo insulina u citoplazmi ćelijskih tela i dendrita ukazivalo je na mogućnost njegove sinteze u ovim ćelijama [25,26]. Pored toga, u prilog ideji o produkciji insulina u CNS išla su i istraživanja koja su pokazala prisustvo C-peptida u istim nervnim ćelijama u kojima je detektovan i insulin [25,26]. C-peptid, kao sastavni deo proinsulina, skladišti se i sekretuje zajedno sa insulinom i stoga predstavlja marker njegove biosinteze [25,27]. Takođe, dodatna potvrda da se sinteza insulina odvija u nervnim ćelijama bila su i istraživanja u kojima je prisustvo insulina pokazano u kulturi moždanih ćelija pacova [28,29] i miša [30]. Dodatno je demonstrirano i da u kulturi neurona sekrecija insulina može biti indukovana hemijskom depolarizacijom ćelijske membrane [31].

Prvobitno iRNK za insulin nije bila detektovana u mozgu adultnih Sprague-Dawley pacova *Northern blot* metodom [32]. Međutim, nekoliko godina kasnije Young je uspeo primenom *in situ* hibridizacije da detektuje iRNK za insulin u mozgu na istom animalnom modelu [33]. Kasnije je prisustvo iRNK za preproinsu-

lin 1 i 2 detektovano i u mozgu embriona miša i pacova [34], ali i prisustvo iRNK za insulin 2 u neonatalnom i adultnom moždanom tkivu pacova [35]. Pacovi i miševi imaju dva gena za insulin: *Ins1* koji se eksprimira u β -ćelijama pankreasa i *Ins2* koji je prisutan i u ostalim tkivima [34,36]. Razvojem molekularno-bioloških metoda, nizale su se studije koje su potvrđivale ekspresiju insulina u CNS. Do danas, insulin je detektovan na nivou proteina (imunohistohemijskim, RIA ili HPLC metodama) u moždanom tkivu [16–19,22,25,37–44] i kulturi nervnih ćelija [28–31,45,46], na nivou iRNK (*Northern blot*, *RT-PCR*, *real-time RT-qPCR*, *in situ* hibridizacija) [33–36,38,47–52], a pokazana je aktivnost promotora *Ins2* gena karakterističnih za β -ćelije pankreasa u mozgu miševa [53,54] i pacova [55]. Ekspresija insulina zabeležena je u različitim moždanim regionima kao što su hipotalamus [38,47], korteks velikog mozga [36], hipokampus [36,51] i olfaktorni bulbusi [51]. U okviru hipotalamusa insulin je detektovan u neuronima periventrikularnog [33,38] i paraventrikularnog jedra (PVN) [47]. Prisustvo insulina zabeleženo je u neuronima, ali ne i u glijskim ćelijama [38,45,47]. Pored toga, insulin je prisutan i u endodimskim ćelijama koje okružuju moždane komore [23,38,47], tanicitama [23], ćelijama horoidnog plesusa [52] i endotelnim ćelijama krvnih sudova. Sve navedene studije potvrđuju postojanje *de novo* sinteze insulina u CNS, ali njegova uloga je idalje slabo istražena.

Funkcije insulina u centralnom nervnom sistemu

Nakon otkrića insulinskog receptora u mozgu [56], došlo je do ekspanzije studija koje analiziraju funkciju insulina u CNS. Objavljen je veliki broj radova u kojima je insulin injeciran intravenozno (iv) ili intracerebroventrikularno (icv) kako bi se saznalo koje efekte ostvaruje u CNS. Veliki doprinos u razumevanju dejstva insulina u mozgu dale su i mnogobrojne novije studije u kojima je administracija insulina obavljana intranazalno.

Najviše ispitivana uloga insulina je regulacija apetita. Pokazano je da injeciranje insulina u moždane komore dovodi do smanjenja unosa hrane i posledično do smanjenja telesne mase [57,58]. Insulin svoje anoreksigeno dejstvo ostvaruje preko svojih receptora u hipotalamusu, gde inhibira NPY/AgRP neurone [59,60], dok POMC/CART neurone aktivira [61]. U neuronima hipotalamusa koji koekspimiraju IR i POMC zabeleženo da icv administracija insulina dovodi do povećanja ekspresije iRNK za POMC, a da primena antagonist melanokortina može sprečiti anoreksigene efekte insulina. Ovo ukazuje da insulin svoja dejstva ostvaruje preko melanokortinskog sistema [62]. Sa druge strane, selektivna delecija IR u neuronima ima oreksigene efekte, odnosno dovodi do hiperfagije, gojaznosti i insulinske rezistencije perifernih efektor insulina [63].

Pored regulacije apetita, insulin vezivanjem za svoje receptore u hipotalamusu suprimira glukoneogenezu u jetri [64] i moduliše nivo simpatičke stimulacije masnog tkiva. Drugim rečima, svojim dejstvom u hipotalamusu insulin indirektno inhibira lipolizu i promoviše lipogenezu, čime se ujedno smanjuje i dostupnost supstrata za glukoneogenezu u jetri, čime se dodatno suprimira hepatična produkcija glukoze [65,66]. Regulacijom energetske homeostaze insulin indirektno utiče i na reprodukciju koja je energetski izuzetno zahtevan proces [13]. Kod ženki miševa delecija IR u neuronima pored pojave gojaznosti, remeti sekreciju luteinizirajućeg hormona i smanjuje fertilitnost [67,68].

Činjenica da pacijenti sa dijabetesom tip 1 i 2 imaju poteškoće sa učenjem, oslabljenu memoriju i kognitivne funkcije ukazuje na potencijalnu ulogu insulina u ovim procesima. U prilog ovoj hipotezi ide i činjenica da je veliki broj IR detektovan u hipokampusu, moždanoj strukturi koja ima ulogu u procesima učenja i pamćenja [13,69]. Pored toga, kod Alchajmerove bolesti narušena je aktivnost insulina u mozgu, a njegova intranazalna administracija poboljšava kognitivne performanse, pažnju i pamćenje kod pacijenata sa ovom bolesti [69]. Mehanizam kojim insulin utiče na memoriju može biti posredno preko regulacije preuzimanja glukoze koja je neuronima naophodna za ove energetske zahtevne procese [13]. Zaista, pokazano je da in-

sulin u hipokampusu stimuliše translokaciju GLUT4 u ćelijsku membranu i povećava preuzimanje glukoze [70]. Sa druge strane, insulin moduliše sinaptičku aktivnost i na taj način utiče na procese formiranja memorije [13].

Iako je veliki broj studija ispitivao dejstvo periferno sintetisanog ili egzogenog insulina u CNS, malobrojne su one koje su ispitivale isključivo funkciju insulina sintetisanog u mozgu. Postoji više razloga za to. Jedan od njih je što su dugo vođene debate oko porekla insulina u CNS. Osim toga, iako je njegova ekspresija u CNS potvrđena na više načina, u vidu iRNK, proteina insulina, C-peptida, količina insulina koji se sintetise u mozgu je mala. Na kraju, teško je razdvojiti efekte periferno sintetisanog insulina koji kroz KMB dospeva u CNS i insulina sintetisanog u CNS.

Kada se sve uzme u obzir, jasno je da je bilo teško dizajnirati studiju u kojoj bi se mogla proučiti funkcija isključivo insulina sintetisanog u mozgu. Kako bi se eliminisali efekti periferno sintetisanog insulina, prva istraživanja funkcije moždanog insulina vršena su *in vitro*. U kulturi neurona fetusa pacova, gajenih u medijumu koji ne sadrži insulin, pokazano je da oni sintetišu iRNK za preproinsulin 1 i preproinsulin 2 i da endogeno sintetisani insulin promoviše distribuciju neurofilamenata u aksonu i rast neurita [71] i diferencijaciju neurona [72]. Ovi procesi posredovani su aktivacijom MAPK, ali ne i PI3K/AKT signalnog puta [71,73].

Iako su ove studije omogućile razumevanje nekih procesa u koje je endogeno sintetisani insulin uključen, ovakav pristup ima određenih nedostataka i ne daje potpuni odgovor na pitanje koja je funkcija insulina sintetisanog u mozgu. Zahvaljujući razvoju molekularno-bioloških metoda, a posebno zahvaljujući razvoju mišjeg modela u kojem je deletiran gen *Ins2* u mozgu, pojavile su se studije koje su dodatno potvrdile *de novo* sintezu insulina u mozgu, ali i omogućile ispitivanje njegove uloge [47]. Potvrđeno je da se u mozgu eksprimira samo *Ins2* iRNK, i to u malim količinama, ali značajno većim od pozadinskog šuma zabeleženog kod *Ins2^{-/-}* miševa [36].

S obzirom da je količina insulina koji se sintetise u mozgu mala, miševi sa delecijom *Ins2* u fiziološkim uslovima ne ispoljavaju značajne patološke promene koje bi mogle ukazati na funkciju ovog molekula [36,74]. Na osnovu toga može se pretpostaviti da je uloga insulina produkovanog u mozgu u nekim finim modulacijama aktivnosti CNS i lokalnog karaktera, te da se nedostatak *Ins2* može primetiti tek u slučajevima narušene homeostaze. Upravo u takvim uslovima, nakon izlaganja stresu, Lee i saradnici su ustanovili da insulin sintetisan u PVN hipotalmusa igra važnu ulogu u regulaciji sinteze i sekrecije hormona rasta (HR) [47]. U normalnim fiziološkim uslovima, u parvocelularnim neuronima PVN sintetise se insulin koji aksonalnim transportom dospeva do eminencije medijane, gde se sekretuje u hipotalamo-hipofizni portni krvotok kojim se transportuje do svojih receptora na membrani ćelija adenohipofize u kojima posredstvom PI3K/AKT signalnog puta reguliše sintezu i sekreciju HR [47]. Međutim, smanjenje ekspresije *Ins2* iRNK u PVN tokom stresa dovodi do smanjenja iRNK za HR u adenohipofizi, i sledstvenog smanjenja koncentracije ovog hormona u krvnoj plazmi [47]. Kod juvenilnih miševa, u uslovima hroničnog stresa, supresija sinteze insulina u PVN dovodi do usporavanja rasta zbog smanjene proizvodnje HR [47].

U našoj studiji je, u stanju narušene energetske homeostaze uzrokovane šestočasovnim gladovanjem (nakon prekonocnog gladovanja) zabeleženo povećanje ekspresije insulina u PeV hipotalmusa mužjaka pacova [38]. Povećanje ekspresije insulina detektovano je ne samo RIA metodom i imunohistohemijski (pomoću antitela za proinsulin), već i primenom *RT-qPCR* [38]. S obzirom na poznato anoreksigeno dejstvo insulina, očekivano je da tokom gladovanja dođe do smanjenja njegove koncentracije i u krvi i u hipotalamusu, što se dešava u slučaju dugotrajnijeg gladovanja, ali ne i šestočasovnog [75]. Ovo neočekivano saznanje nametnulo je pitanje adaptivnog značaja gladovanjem izazvanog povećanja ekspresije insulina u PeV.

S obzirom na to da gladovanje predstavlja stanje narušene energetske homeostaze, najpre je ispitivana uloga ovog insulina u regulaciji glukoznog metabolizma [76]. Iako se smatra da je glukozni metabolizam u mozgu nezavisan od dejstva insulina [77], prisustvo dve insulin-zavisne forme glukoznih transportera: GLUT4 i GLUT8 [78] i njihova kolokalizacija sa IR [79] ukazuju da insulin može uticati na glukozni metabolizam u CNS. Zaista, nakon icv administracije, insulin u neuronima hipokampusa stimuliše translokaciju GLUT4 iz citoplazme u ćelijsku membranu posredstvom PI3K/AKT signalnog puta [70]. Pored toga, osetljivost glukoznih transportera na insulin može se menjati u određenim okolnostima. Na primer, tokom mirovanja insulin stimuliše translokaciju GLUT4, dok se tokom povećane fizičke aktivnosti njegova ugradnja u ćelijsku membranu skleteno-mišićnih ćelija odvija nezavisno od dejstva insulina [80]. Nakon šestočasovnog gladovanja, pored povećanja ekspresije insulina, u PeV je zabeležena i aktivacija IR [76], što ukazuje da centralno sintetisani insulin svoje dejstvo u ovom slučaju ostvaruje parakrino. Međutim, u PeV nije zabeležena koekspresija aktivne forme IR ni sa jednim od četiri najzastupljenije izoforme glukoznih transportera (GLUT1, 2, 3, i 4) u mozgu [76]. To dalje ukazuje da insulin produkovan u PeV tokom kratkotrajnog gladovanja nema ulogu u kontroli membranskog transporta glukoze u hipotalmusu.

Insulin je poznat i po svojoj ulozi u stimulaciji sinteze glikogena [81,82], koji i u mozgu predstavlja važan izvor energije, a sintetiše se i skladišti isključivo u astrocitima [83]. Iako je pokazano da insulin u moždanim ćelijama stimuliše sintezu glikogena i *in vitro* [84] i *in vivo* [85], nakon kratkotrajnog gladovanja u hipotalamusu nisu zabeležene ni promene u količini niti u regionalnoj distribuciji glikogena [76], na osnovu čega je zaključeno da insulin sintetisan u ovom moždanom regionu tokom kratkotrajnog gladovanja nema ulogu u sintezi glikogena.

U skladu sa ovim rezultatima, pokazano je da u hipotalamusu kratkotrajno izgladnjivanih pacova ne dolazi do aktivacije PI3K/AKT signalnog puta za koji se zna da indukuje preuzimanje glukoze i sintezu glikogena [86]. Šta više, fosforilacija AKT na serinu 473 bila je smanjena, kao i u drugim studijama koje su ispitivale uticaj gladovanja na insulinski signalni put [87,88], ukazujući i da se modulacija AKT tokom gladovanja vrši posredstvom nekih drugih molekula. Sa druge strane, šestočasovno gladovanje u hipotalamusu povećava aktivaciju ERK [86], za koji je pokazano da u mozgu moduliše ekspresiju gena uključenih u sinaptičku plastičnost i ćelijsku diferencijaciju [71,73,89], te se može pretpostaviti da *de novo* sintetisan insulin ima ulogu u nekom od ovih procesa. Uzimajući u obzir da se fenomen povećanja ekspresije insulina u PeV tokom kratkotrajnog gladovanja dešava kod mužjaka [38] ali ne i kod ženki (nepublikovani podaci) i da je u literaturi poznato da postoje polno-specifične razlike u građi i funkciji ovog jedra [90,91], može se pretpostaviti i da je njegova uloga možda u modulaciji reproduktivne funkcije. Međutim, za potpuno razumevanje funkcije centralno produkovanog insulina tokom kratkotrajnog gladovanja, u budućnosti bi bilo potrebno uraditi dodatne analize na životinjama kojima je *Ins2* gen u neuronima PeV deletiran i analizirati signalne molekule nishodno od ERK.

Zaključak

Od otkrića insulina do danas napravljen je veliki iskorak prvenstveno u upoznavanju faktora koji kontrolišu njegovu sintezu i sekreciju iz β -ćelija pankreasa. Detaljno su okarakterisani i tkivni odgovori koje insulin pokreće u skeletnim mišićima, masnom tkivu i jetri, kao i signalni putevi koje ovaj hormon vezivanjem za svoj receptor aktivira u pomenutim efektorima. Osim toga, opisan je i mehanizam transporta insulina kroz krvno-moždanu barijeru. Razvojem molekularno-bioloških metoda u poslednjih nekoliko decenija nedvosmisleno je potvrđeno da se sinteza insulina, osim u pankreasu, odvija i u CNS. Identifikovani su regioni mozga, kao i tipovi ćelija u kojima se eksprimira gen za insulin. Međutim, ono što ostaje predmet intenzi-

vnih istraživanja jeste adaptivni značaj sinteze insulina u CNS. Neophodno je ispitati da li je reč o procesu koji se dešava konstitutivno ili samo pod specifičnim okolnostima. Naročito je važno detaljnije upoznati ulogu insulina u CNS, kao i razdvojiti dejstva insulina koji u mozak dospeva kroz krvno-moždanu barijeru, od onog koji je lokalno sintetisan u CNS.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200178.

Literatura

1. Banting FG, Best CH. The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med.* 1922;7. doi:10.3138/9781442656918-008
2. Diem P. The Discovery of Insulin. *Ther Umschau.* 2020;77: 289–296. doi:10.1024/0040-5930/a001194
3. Vecchio I, Tornali C, Bragazzi NL, Martini M. The discovery of insulin: An important milestone in the history of medicine. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9: 1–8. doi:10.3389/fendo.2018.00613
4. Dakić T. Efekat kratkotrajnog gladovanja na ekspresiju insulina i insulinsku signalizaciju u hipotalamusu pacova. Institut za fiziologiju i biohemiju “Ivan Đaja”, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet. 2019.
5. Margolis RU, Altszuler N. Insulin in the Cerebrospinal Fluid. *Nature.* 1967;215: 1375. doi:10.1038/2151375a0
6. Baura GD, Foster DM, Porte D, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, et al. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest.* 1993;92: 1824–1830. doi:10.1172/JCI116773
7. Banks WA, Jaspan JB, Huang W, Kastin AJ. Transport of insulin across the blood-brain barrier: Saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides.* 1997. doi:10.1016/S0196-9781(97)00231-3
8. Plata-Salamán CR. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Neurosci Biobehav Rev.* 1991;15: 243–258. doi:10.1016/S0149-7634(05)80004-1
9. King GL, Johnson SM. Receptor-Mediated Transport of Insulin Across Endothelial Cells. *Science (80-).* 1985;227: 1583–1586.
10. Meijer RI, Gray SM, Aylor KW, Barrett EJ. Pathways for insulin access to the brain: The role of the microvascular endothelial cell. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2016;311. doi:10.1152/ajpheart.00081.2016
11. Gray SM, Aylor KW, Barrett EJ. Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. *Diabetologia.* 2017;60. doi:10.1007/s00125-017-4285-4
12. Banks WA, Kastin AJ. Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: Insulin and amylin. *Peptides.* 1998;19: 883–889. doi:10.1016/S0196-9781(98)00018-7
13. Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. Insulin in the brain: Sources, localization and functions. *Molecular Neurobiology.* 2013. pp. 145–171. doi:10.1007/s12035-012-8339-9
14. Baura GD, Foster DM, Kaiyala K, Porte D, Kahn SE, Schwartz MW. Insulin transport from plasma into the central nervous system is inhibited by dexamethasone in dogs. *Diabetes.* 1996;45. doi:10.2337/diab.45.1.86
15. Strubbe JH, Porte D, Woods SC. Insulin responses and glucose levels in plasma and cerebrospinal fluid during fasting and refeeding in the rat. *Physiol Behav.* 1988;44: 205–8. doi:10.1016/0031-9384(88)90139-4
16. Havrankova J, Schmechel D, Roth J, Brownstein AM. Identification of insulin in rat brain. *Neurobiology.* 1978;75: 5737–5741. doi:10.1073/pnas.75.11.5737
17. Havrankova J, Roth J, Brownstein MJ. Concentrations of insulin and of insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J Clin Invest.* 1979;64: 636–642. doi:10.1172/JCI109504
18. Dorn A, Bernstein HG, Kostmann G, Hahn HJ, Ziegler M. An immunofluorescent reaction appears to insulin-antiserum in different CNS regions of two rat species. *Acta Histochem.* 1980;66. doi:10.1016/S0065-1281(80)80014-6
19. Dorn A, Bernstein HG, Hahn HJ, Ziegler M, Rummelfanger H. Insulin Immunohistochemistry of Rodent CNS: Apparent Species Differences but Good Correlation with Radioimmunological Data. *Histochemistry.* 1981;71: 609–616.
20. Eng J, Yalow RS. Evidence against extrapancreatic insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78: 4576–4578. doi:10.1073/pnas.78.7.4576
21. Baskin DG, Porte D, Guest K, Dorsa DM. Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology.* 1983;112: 898–903. doi:10.1210/endo-112-3-898
22. Dorn A, Bernstein H □G, Rinne A, Ziegler M, Hahn H □J, Ansorge S. Insulin □ and glucagonlike peptides in the brain. *Anat Rec.* 1983;207. doi:10.1002/ar.1092070108
23. Pansky B, Hatfield JS. Cerebral localization of insulin by immunofluorescence. *Am J Anat.* 1978. doi:10.1002/aja.1001530309

24. Baskin DG, Woods SC, West DB, Houten M Van, Posner BI, Dorsa DM, et al. Immunocytochemical detection of insulin in rat hypothalamus and its possible uptake from cerebrospinal fluid. *Endocrinology*. 1983. doi:10.1210/endo-113-5-1818
25. Dorn A, Rinne A, Bernstein HG, Hahn HJ, Ziegler M. Insulin and C-peptide in human brain neurons (insulin/C-peptide/brain peptides/immunohistochemistry/radioimmunoassay). *J Hirnforsch*. 1983;24: 495–499.
26. Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 1998;105: 423–438. doi:10.1007/s007020050068
27. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology*. 2018. doi:10.1083/jcb.201802095
28. Weyhenmeyer JA, Fellows RE. Presence of immunoreactive insulin in neurons cultured from fetal rat brain. *Cell Mol Neurobiol*. 1983;3. doi:10.1007/BF00735000
29. Raizada MK. Localization of insulin-like immunoreactivity in the neurons from primary cultures of rat brain. *Exp Cell Res*. 1983;143. doi:10.1016/0014-4827(83)90061-7
30. Birch NP, Christie DL, Renwick AGC. Proinsulin-like material in mouse foetal brain cell cultures. *FEBS Lett*. 1984;168. doi:10.1016/0014-5793(84)80266-5
31. Clarke DW, Mudd L, Boyd FT, Fields M, Raizada MK. Insulin Is Released from Rat Brain Neuronal Cells in Culture. *J Neurochem*. 1986. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb00686.x
32. Giddings SJ, Chirgwin J, Permutt MA. Evaluation of rat insulin messenger RNA in pancreatic and extrapancreatic tissues. *Diabetologia*. 1985;28. doi:10.1007/BF00283141
33. Young WS. Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides*. 1986;8: 93–97. doi:10.1016/0143-4179(86)90035-1
34. Schechter R, Beju D, Gaffney T, Schaefer F, Whetsell L. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. *Brain Res*. 1996;736: 16–27. doi:10.1016/0006-8993(96)00664-6
35. Devaskar SU, Singh BS, Carnaghi LR, Rajakumar P a., Giddings SJ. Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul Pept*. 1993;48: 55–63. doi:10.1016/0167-0115(93)90335-6
36. Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, Lim GE, Chu KY, Hu X, et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab*. 2012;16: 723–737. doi:10.1016/j.cmet.2012.10.019
37. Stempniak B, Guzek JW. Insulin-like immunoreactivity (IRI) in the rat hypothalamo- neurohypophysial system: Effect of dehydration and haemorrhage. *J Physiol Pharmacol*. 1993;44.
38. Dakic TB, Jevdjovic T V., Peric MI, Bjelobaba IM, Markelic MB, Milutinovic BS, et al. Short-term fasting promotes insulin expression in rat hypothalamus. *Eur J Neurosci*. 2017;46: 1730–1737. doi:10.1111/ejn.13607
39. Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem*. 1994;269: 8445–8454. doi:10.1016/s0021-9258(17)37214-9
40. Dheen ST, Tay SSW, Wong WC. Localization of insulin-like immunoreactive neurons in the rat gracile nucleus. *Histol Histopathol*. 1996;11.
41. Rosenzweig JL, Havrankova J, Lesniak MA, Brownstein M, Roth J. Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77. doi:10.1073/pnas.77.1.572
42. Stevenson RW. Further evidence for non-pancreatic insulin immunoreactivity in guinea pig brain. *Horm Metab Res*. 1983;15. doi:10.1055/s-2007-1018779
43. Bernstein HG, Dorn A, Reiser M, Ziegler M. Cerebral insulin-like immunoreactivity in rats and mice: Drastic decline during postnatal ontogenesis. *Acta Histochem*. 1984;74: 33–36. doi:10.1016/S0065-1281(84)80022-7
44. Dorn A, Ziegler M, Bernstein HG, Dietz H, Rinne A. Concerning the presence of an insulin-related peptide in the human brain: An immunohistochemical reinvestigation by use of monoclonal insulin antibodies. *Acta Histochem*. 1984;74. doi:10.1016/S0065-1281(84)80032-X
45. Schechter R, Holtzclaw L, Sadiq F, Kahn A, Devaskar S. Insulin synthesis by isolated rabbit neurons. *Endocrinology*. 1988. doi:10.1210/endo-123-1-505
46. Schechter R, Whitmire J, Wheet GS, Beju D, Jackson KW, Harlow R, et al. Immunohistochemical and in situ hybridization study of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures. *Brain Res*. 1994;636. doi:10.1016/0006-8993(94)90170-8

47. Lee J, Kyungchan K, Hyun CJ, Young BJ, O'Leary T, Johnson J, et al. Insulin synthesized in the paraventricular nucleus of the hypothalamus regulates body length by modulating pituitary growth hormone production. *JCI insight*. 2020;6: e135412. doi:10.1016/j.jbror.2019.07.1239
48. Singh BS, Rajakumar PA, Eves EM, Rosner MR, Wainer BH, Devaskar SU. Insulin gene expression in immortalized rat hippocampal and pheochromocytoma-12 cell lines. *Regul Pept*. 1997;69: 7–14. doi:10.1016/S0167-0115(96)02120-9
49. Madadi G, Dalvi PS, Belsham DD. Regulation of brain insulin mRNA by glucose and glucagon-like peptide 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376: 694–699. doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.054
50. Molnar G, Farago N, Kocsis AK, Rozsa M, Lovas S, Boldog E, et al. GABAergic Neurogliaform Cells Represent Local Sources of Insulin in the Cerebral Cortex. *J Neurosci*. 2014. doi:10.1523/JNEUROSCI.4082-13.2014
51. Kuwabara T, Kagalwala MN, Onuma Y, Ito Y, Warashina M, Terashima K, et al. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol Med*. 2011;3: 742–54. doi:10.1002/emmm.201100177
52. Mazucanti CH, Liu QR, Lang D, Huang N, O'Connell JF, Camandola S, et al. Release of insulin produced by the choroids plexis is regulated by serotonergic signaling. *JCI Insight*. 2019;4: e131682. doi:10.1172/jci.insight.131682
53. Song J, Xu Y, Hu X, Choi B, Tong Q. Brain expression of Cre recombinase driven by pancreas-specific promoters. *Genesis*. 2010. doi:10.1002/dvg.20672
54. Wicksteed B, Brissova M, Yan W, Opland DM, Plank JL, Reinert RB, et al. Conditional gene targeting in mouse pancreatic β -cells: Analysis of ectopic cre transgene expression in the brain. *Diabetes*. 2010. doi:10.2337/db10-0624
55. Lamotte L, Jackerott M, Bucchini D, Jami J, Joshi R, Deltour L. Knock-in of diphtheria toxin a chain gene at Ins2 locus: Effects on islet development and localization of Ins2 expression in the brain. *Transgenic Res*. 2004;13. doi:10.1007/s11248-004-9587-x
56. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978;272: 827–829. doi:10.1038/272827a0
57. Brief DJ, Davis JD. Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. *Brain Res Bull*. 1984;12. doi:10.1016/0361-9230(84)90174-6
58. Chavez M, Riedy CA, Van Dijk G, Woods SC. Central insulin and macronutrient intake in the rat. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1996;271. doi:10.1152/ajpregu.1996.271.3.r727
59. Dube MG, Phelps CP, Sninsky CA, Kalra PS. Insulin and insulin-like growth factor ii suppress neuropeptide y release from the nerve terminals in the paraventricular nucleus: A putative hypothalamic site for energy homeostasis. *Endocrinology*. 1995;136. doi:10.1210/endo.136.12.7588328
60. Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: From the gut to the hypothalamus. *Clinical Endocrinology*. 2004. pp. 153–160. doi:10.1046/j.1365-2265.2003.01839.x
61. Palou M, Sánchez J, Rodríguez AM, Priego T, Picó C, Palou A. Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: Relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23: 115–124. doi:10.1159/000204100
62. Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, et al. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*. 2002;22. doi:10.1523/jneurosci.22-20-09048.2002
63. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science (80-)*. 2000;289: 2122–2125. doi:8841 [pii]
64. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*. 2002;8: 1376–1382. doi:10.1038/nm798
65. Scherer T, OHare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, et al. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metab*. 2011;13: 183–194. doi:10.1016/j.cmet.2011.01.008
66. Vogt MC, Brüning JC. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2013. pp. 76–84. doi:10.1016/j.tem.2012.11.004
67. Bunner AE, Chandrasekera PC, Barnard ND. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World J Diabetes*. 2014. doi:10.4239/wjd.v5.i2.146
68. Plum L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16: 59–65. doi:10.1016/j.tem.2005.01.008

69. Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*. 2014;63: 2232–2243. doi:10.2337/db14-0568
70. Grillo CA, Piroli GG, Hendry RM, Reagan LP. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res*. 2009;1296: 35–45. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.005
71. Schechter R, Yanovitch T, Abboud M, Johnson G, Gaskins J. Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. *Brain Res*. 1998. doi:10.1016/S0006-8993(98)00842-7
72. Schechter R, Abboud M. Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures. *Dev Brain Res*. 2001. doi:10.1016/S0165-3806(01)00110-9
73. Schechter R, Yanovitch T, Abboud M, Gaskins J, Johnson G, Warren WK. Brain Endogenous Insulin Phosphorylated MAPK and Affected Axonal Growth in Fetal Rat Neuron Cell Cultures † 480. *Pediatr Res*. 1998. doi:10.1203/00006450-199804001-00501
74. Leroux L, Desbois P, Lamotte L, Duvill   B, Cordonnier N, Jackerott M, et al. Compensatory responses in mice carrying a null mutation for Ins1 or Ins2. *Diabetes*. 2001. doi:10.2337/diabetes.50.2007.s150
75. Vujovic PZ. Ekspresija neuroendokrinih regulatora energetske homeostaze tokom razli  itih faza metaboli  kog odgovora na gladovanje. University of Belgrade. 2011.
76. Dakic T, Jevdjovic T, Lakic I, Djurasevic SF, Djordjevic J, Vujovic P. Food For Thought: Short-Term Fasting Upregulates Glucose Transporters in Neurons and Endothelial Cells, But Not in Astrocytes. *Neurochemical Research*. 2019. doi:10.1007/s11064-018-2685-6
77. Camandola S, Mattson MP. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J*. 2017;36: 1474–1492. doi:10.15252/embj.201695810
78. Sankar R, Thamotharan S, Shin D, Moley KH, Devaskar SU. Insulin-responsive glucose transporters - GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. *Mol Brain Res*. 2002;107. doi:10.1016/S0169-328X(02)00487-4
79. Alquier T, Leloup C, Lorisgnol A, P  nicaud L. Translocable glucose transporters in the brain: Where are we in 2006? *Diabetes*. 2006;5: S131-138. doi:10.2337/db06-S021
80. Messina G, Palmieri F, Monda V, Messina A, Dalia C, Viggiano A, et al. Exercise causes muscle GLUT4 translocation in an insulin-independent manner. *Biol Med*. 2015. doi:10.4172/0974-8369.100053007
81. Cohen P, Nimmo HG, Proud CG. How does insulin stimulate glycogen synthesis? *Biochem Soc Symp*. 1978; 69–95.
82. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2014;4: 177–197. doi:10.1002/cphy.c130024
83. Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *GLIA*. 2007. pp. 1263–1271. doi:10.1002/glia.20557
84. Dringen R, Hamprecht B. Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem*. 1992;58: 511–517. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb09750.x
85. Choi IY, Seaquist ER, Gruetter R. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J Neurosci Res*. 2003;72: 25–32. doi:10.1002/jnr.10574
86. Dakic T, Jevdjovic T, Djordjevic J, Vujovic P. Short-term fasting differentially regulates PI3K/Akt/mTOR and ERK signalling in the rat hypothalamus. *Mech Ageing Dev*. 2020. doi:10.1016/j.mad.2020.111358
87. Lu J, Lezi E, Wang WF, Frontera J, Zhu H, Wang WT, et al. Alternate day fasting impacts the brain insulin-signaling pathway of young adult male C57BL/6 mice. *J Neurochem*. 2011. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07184.x
88. Clodfelder-Miller B, De Sarno P, Zmijewska AA, Song L, Jope RS. Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. 2005. doi:10.1074/jbc.M508824200
89. Liu Z, Patil IY, Jiang T, Sancheti H, Walsh JP, Stiles BL, et al. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PLoS One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128274
90. Davis EC, Shryne JE, Gorski RA. Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology*. 1996;63: 142–8. doi:10.1159/000126950
91. Semaan SJ, Kauffman AS. Sexual differentiation and development of forebrain reproductive circuits. *Curr Opin Neurobiol*. 2010;20: 424–31. doi:10.1016/j.conb.2010.04.004

Neuroprotektivni potencijal progesterona

Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić

Laboratorija za Molekularnu biologiju i endokrinologiju,
Institut za nuklearne nauke „Vinča” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu, Beograd, Republika Srbija
Kontakt: igusevac@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Poremećena moždana cirkulacija, koja je karakteristična za starenje i mnoga cerebrovaskularna i/ili neurodegenerativna oboljenja, povezuje se sa prooksidativnim i proapoptotskim promenama mnogobrojnih biomolekula, uključujući lipide, proteine i DNK, i narušavanjem strukture i funkcije ćelija prečione moždane kore (PFC) i hipokampusu (HIPP). Do sada je testiran efekat brojnih jedinjenja da bi se ublažile posledice narušenog protoka krvi kroz moždano tkivo, ali adekvatna terapija još uvek nije dostupna. Ipak, kao jedan od mogućih terapeutika, izdvaja se steroidni hormon, progesteron (pregn-4-en-3,20-dion, P4), za kojeg je pokazano da ispoljava zaštitne efekte u mnogim životinjskim eksperimentalnim modelima kojima se oponašaju pojedini aspekti poremećaja strukture i funkcije moždanih ćelija primećeni kod starijih ljudi i obolelih od cerebrovaskularnih i/ili neurodegenerativnih bolesti. Stoga, fokus ovog rada je pružanje mogućnosti boljeg razumevanja molekulskih mehanizama delovanja P4 u mozgu u fiziološkom stanju, kao i terapijskog potencijala koji iskazuje u animalnim modelima cerebrovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, sa posebnim osvrtom na trajnu moždanu hipoperfuziju (MH) gde pokazuje regionalno-specifično dejstvo. Iako se P4, za sada, u humanoj populaciji pokazao kao neadekvatan terapeutik u lečenju patološkog stanja povezanog sa poremećenom moždanom cirkulacijom, dodatne kliničke studije bi obezbedile saznanja o efektu ovog potentnog neurosteroida kod obolelih od drugih cerebrovaskularnih i/ili neurodegenerativnih bolesti, dok bi u slučaju ohrabrujućih rezultata, P4 terapija mogla znatno olakšati kvalitet života obolelih.

Ključne reči: progesteron, cerebrovaskularne i neurodegenerativne bolesti, moždana hipoperfuzija, protektivan regionalno-specifičan odgovor, pacov

Neuroprotective progesterone potential

Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić

Department of Molecular Biology and Endocrinology,
„VINČA“ Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia,
University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia
Correspondence: igusevac@vin.bg.ac.rs

Abstract

Disturbed cerebral circulation, characteristic for aging and many cerebrovascular and/or neurodegenerative diseases, is associated with prooxidative and proapoptotic changes of various biomolecules, including lipids, proteins and DNA, and with compromised cell structure and function in prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HIPP). Numerous compounds, until today, have been tested to alleviate the outcomes of impaired blood flow through brain tissue, but adequate therapy is not yet available. However, one of the possible therapeutics is singled out, the steroid hormone, progesterone (pregn-4-en-3,20-dione, P4), which has been shown to exert protective effects in many animal experimental models that mimic certain aspects of brain structural and functional changes observed in the elderly and those suffering from cerebrovascular and/or neurodegenerative diseases. Therefore, this paper is focused on providing a better understanding of physiological P4-mediated brain molecular mechanisms, as well as its therapeutic potential in animal models of cerebrovascular and neurodegenerative diseases with the emphasis on permanent cerebral hypoperfusion (CH) where the regional-specific response is observed. Although P4 is shown as inadequate for treating a pathological condition associated with disturbed cerebral circulation, additional clinical studies would provide insights into the potential therapeutic capacity of this potent neurosteroid in other cerebrovascular and/or neurodegenerative diseases and conditions. In the case of encouraging results, P4 therapy could significantly improve the quality of patients' life.

Keywords: progesterone, cerebrovascular and neurodegenerative diseases, cerebral hypoperfusion, protective regional-specific response, rat

Proteklih decenija, pored naglog porasta broja stanovnika i postepenog povećanja njihovog prosečnog životnog veka, dramatično se povećao i broj obolelih od bolesti koje su povezane sa starenjem, poput neurodegenerativnih, cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti. Bolesti centralnog nervnog sistema (CNS) drugi su vodeći uzrok smrti u svetu, ali i jedan od glavnih uzroka invaliditeta. Ovu veliku skupinu bolesti sa različitim simptomima odlikuje progresivna smrt neurona u različitim regionima CNS, uključujući prečeonu moždanu koru (lat. *cortex praefrontalis*, PFC), limbičku strukturu- hipokampus (lat. *hippocampus*, HIPP) i druge; koja je praćena neurološkom disfunkcijom i odgovorna za gubitak kognitivnih i/ili motornih funkcija. Osim neurona, bolesti CNS karakterišu i strukturne i funkcionalne promene glijalnih ćelija, ali i onih ćelija koje izgrađuju neurovaskularnu jedinicu, kao što su endotelne ćelije [1]. Upravo, najčešće u humanoj populaciji su one bolesti kod kojih je neurodegeneracija jedna od osnovnih karakteristika, poput Alchajmerove bolesti (AB), Parkinsonove bolesti (PB) i amiotrofične lateralne skleroze (ALS) [2]. Osim njih, i druge bolesti u čijoj su osnovi primarno demijelinizacija, ishemija i/ili trauma koje dovede do gubitka neurona mogu biti neurodegenerativne. Kao sekundarne neurodegenerativne bolesti navode se multipla skleroza (MS), moždani udar i traumatske povrede mozga (TPM) [1].

Bolesti CNS, između ostalog, mogu nastati usled smanjenja protoka krvi kroz mozak (moždane hipoperfuzije, MH) koja uzrokuje ishemiju, odnosno, nedovoljnu snabdevenost moždanog tkiva kiseonikom i hranljivim materijama. Ova patološka stanja javljaju se zbog nemogućnosti srca da ispumpa dovoljno krvi u mozak usled začepljenja (eng. *occlusion*) i patološkog suženja (lat. *stenosis*) krvnih sudova, nepravilnog rada srca, trajnog niskog pritiska kao posledice srčanog udara ili urođenih srčanih mana, hirurških intervencija i velikog gubitka krvi, upotrebe lekova i narkotika, kao i zbog različitih oboljenja, i drugog [3].

Iako su do danas predloženi brojni mehanizmi njihovog nastanka i progresije, adekvatna terapija kojom bi se postigao potpuni oporavak od ovih tipova bolesti još uvek ne postoji, ali postoje brojne terapije kojima se samo usporavaju degenerativni procesi. Stoga, ove bolesti predstavljaju veliki socioekonomski teret za države, ne samo zbog predupređenja njihovog nastanka i/ili progresije, pokušaja poboljšanja kvaliteta života samih obolelih, opterećenja članova njihovih porodica, već i uticaja broja pacijenata na ekonomiju i na već preopterećeni zdravstveni sistem [4].

Cerebrovaskularni, neurodegerativni poremećaji, oksidativni stres i apoptoza

Mozak je jedan od najsloženijih organa u telu, sa visokim metaboličkim zahtevima i sposobnošću integracije i regulacije brojnih signala radi održavanja homeostaze tela. Iako je za njegovo normalno funkcionisanje potrebna velika količina energije, mozak ima smanjenu sposobnost njenog skladištenja, mada se, putem krvi, zadovoljavaju visoke energetske potrebe konstantnim snabdevanjem moždanog tkiva kiseonikom i supstratima, odnosno glukozom [5]. Upravo, to se omogućava fino regulisanom neurovaskularnom spregom, odnosno međusobnom komunikacijom neurona, glijalnih ćelija i krvnih sudova koji kontrolišu protok krvi kroz moždano tkivo [6], transport neophodnih molekula, uklanjanje ksenobiotičkih ili neurotoksičnih komponenti, i drugo [1,4,7]. Literaturni podaci ukazuju da u mnogim patofiziološkim, ali i u fiziološkim stanjima, uključujući moždani udar, AB, VaD (vaskularna demencija), ALS, i TPM, kao i starenje, pre pojave kliničkih simptoma ili neurodegenerativnih znakova ovih stanja, prethodi smanjen i/ili potpuno prekinut protok krvi kroz moždano tkivo, i narušavanje fine mikrovaskulature mozga [1,4].

Moždani udar je neurodegenerativno oboljenje koje nastaje prekidom dotoka krvi u pojedine regione mozga. Uznemirujući su podaci epidemioloških studija koje su sprovedene u poslednjih nekoliko godina koji ukazuju na sve veći broj moždanih udara kod mladih [8] usled loših životnih navika, stresa, i drugo. Do danas

je opisano nekoliko podtipova moždanog udara, poput ishemijskog moždanog udara koji se javlja u oko 80-85% svih slučajeva i nastaje usled začepjenja krvnih sudova određenog dela mozga usled troboze, embolije, sistemske hipoperfuzije, i drugo; hemoragijskog moždanog udara ili intrakranijalne hemoragije (krvarenja) koji se javlja u 15% slučajeva i podrazumeva nakupljanje krvi unutar lobanje; dok je 5% slučajeva nepoznate etiologije [9].

Fokalna moždana ishemija nastaje usled okluzije cerebralne arterije čime se smanjuje protok krvi kroz pojedine regione mozga, a ćelijski odgovor se razlikuje između: *ishemijskog jezgra*, regiona u kome se javlja teška ishemija, u kom su ćelije izložene nedovoljnoj količini kiseonika, ATP i glukoze, usled čega se nepovratno oštećuju i umiru nekrozom; i *penumbre* (senke), regiona u kom su ćelije metabolički aktivne i koje se mogu oporaviti ako se ponovo uspostavi cirkulacija, a u kom ćelije pretežno umiru apoptozom [3]. Literaturni podaci ukazuju da su angiogeneza i remodeliranje tkiva nakon moždanog udara zastupljeni u regionima penumbre, što ove regione stavlja u centar pažnje za terapijsku primenu [10]. S druge strane, globalnu moždanu ishemiju odlikuje smanjeni protok krvi kroz ceo mozak ili određeni region mozga (nepotpuna moždana ishemija) ili potpuni prekid (potpuna moždana ishemija). U ovom tipu povrede, u zavisnosti od dužine trajanja ishemijske epizode, razlikuju se: *privremena* u kojoj je delimično ili potpuno smanjenje moždane cirkulacije vremenski ograničeno, što može nastati usled srčanog zastoja, gušenja i šoka, i uzrokovati znatne neurološke poremećaje, čak i smrt; i *trajna* koju odlikuje dugotrajno umereno smanjenje protoka krvi kroz moždano tkivo usled arterio-venoznih oštećenja, začepjenja ili sužavanja karotidnih arterija. Treba istaći da se nastanak i progresija ovog tipa povrede mozga, kao i efekti potencijalnih terapeutika intenzivno proučavaju na animalnim modelima, uključujući podvezivanje jednog krvnog suda (eng. *one vessel occlusion*, 1VO), dva (2VO), tri (3VO) i 4 (4VO) [3].

Alchajmerova bolest (AB), najčešći vid demencije, se manifestuje postepenim opadanjem kognitivnih funkcija usled karakterističnog taloženja vanćelijskih proteinskih agregata amiloida- β (A β), formiranja senilnih plakova i unutarćelijskih neurofibrilarnih klubadi sa fosforilisanim Tau proteinom u parenhimu mozga. Najčešći faktori rizika za pojavu i progresiju AB su starost [11], genetska predispozicija, kao što je nasleđivanje *APOE4* gena [12], dijabetes melitus, i drugo [13–16]. Međutim, sve su brojniji dokazi da se u osnovi AB nalaze i poremećaji i/ili disfunkcija mikrovaskulature [17,18] usled taloženja A β koji mogu biti uzrok smanjenja prokrvljenosti moždanog tkiva, promocije ishemijskih oštećenja, koja su praćena vaskularnom i neuronskom degeneracijom i kognitivnim opadanjem [19]. Osim toga, uočeno je da hronična MH i akumulacija A β mogu podstaći angiogenezu oštećenih ćelija i doprineti pojavi dodatnih disfunkcionalnih mikrosudova [20].

Vaskularna demencija (VaD) ili bolest malih sudova je drugi najčešći tip demencija nakon AB. Ova neurodegenerativna, cerebrovaskularna bolest nastaje zbog opadanja protoka krvi kroz pojedine regione mozga, smanjenog prenosa kiseonika ili hranljivih materija usled oštećenja mikrovaskulature mozga koja uzrokuju povredu moždanog tkiva, kognitivna oštećenja i demenciju [21], s tim da stepen disfunkcije zavisi od mesta, broja i veličine povrede mozga [4].

Amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS) odlikuje progresivna degeneracija motornih neurona u mozgu i kičmenoj moždini, koji izazivaju atrofiju mišića, paralizu i smrt. Tačan uzrok ALS je i dalje nepoznat, iako u većini slučajeva nastaje sporadično, samo oko 15% slučajeva ima genetsku osnovu, uključujući promene na više od 20 gena, poput mutacija gena za superoksid dismutazu (SOD), TAR DNK-vezujući protein 43 (TARDBP), i druge [22]. Osim toga, kao mogući uzrok nastanka i progresije ALS navodi se i narušavanje funkcije i strukture neurovaskularnih jedinica [23] odgovornih za vaskularnu hipoperfuziju/disregulaciju koja se javlja pre degeneracije motornih neurona ili atrofije različitih moždanih struktura [4].

Moždane lezije koje nastaju direktnim ili indirektnim stimulusima mehaničke prirode, a koje izazivaju poremećaje normalne strukture i funkcije mozga su karakteristične za **traumatsku povredu mozga** (TPM) [24]. Brojni su dokazi kojima se TPM povezuje sa promenama cerebrovaskularne funkcije, smanjenjem protoka krvi kroz mozak, remećenjem strukture i funkcije neurovaskularne jedinice, vaskularnom malformacijom, remećenjem autoregulacije, usled subarahnoidnog krvarenja, vazospazma, edema, poremećaja krvno-moždane barijere (KMB) i neurodegeneracijom [24]. Za ovaj tip moždane povrede karakterističan je primarni, akutni događaj koji je često praćen kaskadama sekundarnih povreda koji traju i po nekoliko meseci ili čak godina, i uključuju glutamatergičku ekscitotoksičnost, Ca^{2+} preopterećenje i vaskularnu disfunkciju [25–27].

Starenje je jedan od vodećih faktora rizika za pojavu i progresiju bolesti CNS [28], s obzirom na to da je direktno ili indirektno povezano sa narušavanjem strukture i funkcije KMB [29], smanjenjem protoka krvi kroz moždane strukture [30,31], ali i nekoliko tipova promena krvnih sudova mozga, kao što su smanjena elastičnost, povećano cerebrovaskularno remodelovanje i kalcifikacija i krutost cerebrovaskularnog zida [32,33]. Na molekulskom nivou starost utiče na angiogenezu i endotelnu disfunkciju [17,34,35], remeteći različite signalne puteve, inicirajući i pospešujući neuroupalne procese, oksidativni stres (OS), ćelijsku smrt tipa apoptoze, i drugo [32]. Trenutno je jedno od najpouzdanijih i najprihvatljivijih objašnjenja za mehanističku osnovu starenja, ali i pojavu i progresiju neurodegenerativnih bolesti, „slobodno-radikalna teorija starenja“ koja postulira da je ono, i bolesti povezane sa njim, posledica oštećenja ćelijskih molekula izazvanih slobodnim radikalima i nemogućnošću uravnoteženja ovih promena unutrašnjom antioksidativnom (AO) zaštitom [36].

Jedan od glavnih pokazatelja nastanka i progresije različitih patoloških procesa, OS, nastaje usled prekomerne proizvodnje i/ili neadekvatnog uklanjanja visoko reaktivnih jedinjenja, slobodnih radikala, koji promovisu strukturne i funkcionalne promene biomolekula, poput lipida, proteina i DNK. Najčešće promene su peroksidacija lipida (LPO), fragmentacija proteina, genotoksičnost, depolarizacija mitohondrija i apoptoza koja posledično izaziva ozbiljna oštećenja tkiva i organa, uključujući i mozak [37–39]. Treba istaći da slobodni radikali nisu odlika samo patoloških stanja, već da neprestano nastaju u svim ćelijama u reakcijama oksidativne fosforilacije u mitohondrijama [40,41] kao rezultat normalnog ćelijskog metabolizma i da u niskim koncentracijama učestvuju u fiziološkim procesima. Međutim, u visokim koncentracijama su štetni i izazivaju promene na ćelijskim komponentama. Jedan od najčešće proučavanih slobodnih radikala, pored superoksidnog anjona ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$) i vodonik peroksida (H_2O_2), je i **azot oksid (NO)**, gas rastvorljiv u vodi, bez mirisa, sa prosečnim polu-životom 3- 5 sek, koji se brzo oksiduje u nitrite i nitrate [42]. NO ima dualnu prirodu, može delovati kao signalni molekul i imati važnu ulogu u regulaciji protoka krvi, sprečavati lepljenje trombocita, delovati kao neurotransmiter i doprinositi primarnoj imunoj zaštiti [43], ali i usled direktnog stupanja u interakciju sa različitim grupama na proteinima formirati peroksinitrit ($\text{ONOO}^{\cdot-}$), jak oksidant i medijator povrede tkiva, koji može imati toksičan efekat i izazvati apoptozu [44–47]. Kod sisara, NO nastaje radom tri izoforme enzima NO sintaze (NOS):

- nervne (nNOS) uključene u modulisanje fizioloških funkcija, kao što su učenje, pamćenje, neurogeneza, čija je prekomerna aktivnost povezana sa smrću neurona preko receptora osetljivih na N-metil-D-aspartat;
- inducibilne (iNOS) čija sinteza može biti pokrenuta bakterijskim lipopolisaharidom, citokinima i drugim agensima;
- endotelne (eNOS) koja učestvuje u očuvanju proširenosti krvnih sudova, kontroli krvnog pritiska i ima antisklerotične efekte.

Ćelije su razvile nekoliko odbrambenih mehanizama odgovornih za regulaciju nivoa ekspresije gena i aktivnosti citoprotektivnih enzima u cilju uklanjanja slobodnih radikala i smanjenja njihovih štetni efekata [48,49].

Komponente AO zaštite su jedinjenja/molekuli kojima se značajno smanjuje, onemogućava i neutrališe oksidacija supstrata odnosno biomolekula, a mogu učestvovati i u popravljanju oštećenja nastalih delovanjem slobodnih radikala. Prema prirodi antioksidanti se mogu svrstati u: enzimske (primarna linija odbrane) odgovorne za razlaganje i uklanjanje slobodnih radikala, poput: SOD, katalaze (CAT), glutathion peroksidaze (GPx), glutathion-reduktaze (GR) i glutathion S-transferaze (GST) [50]; i ne-enzimske (sekundarna linija odbrane), kao što su vitamini A, C i E, glutathion (GSH), koenzim Q, i drugi [51].

Literaturni podaci ukazuju da pomeranje fino regulisane ravnoteže između pro- i antioksidanata u pravcu prooksidanata, i pojava i progresija oksidativnog/nitrozativnog stresa (OS/NS) [52], praćeni pokretanjem apoptotske signalne kaskade, doprinose razvoju mnogobrojnih patoloških stanja [53], uključujući i prethodno navedene bolesti CNS. Apoptoza ili „programirana ćelijska smrt“ je energetski zavisna i strogo kontrolisan proces, pokrenut na dva načina, spoljašnjim stimulusima (vezivanjem liganda za receptore smrti) i unutrašnjim (mitohondrijski put, odnosno „Bcl-2“ kontrolisani put, pokreće se unutarćelijskim signalima posredstvom Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) familije proteina koji mogu biti proapoptotski (Bax, eng. *Bcl-2 associated X protein*) i antiapoptotski (Bcl-2) [54]. Ipak, bez obzira na poreklo signala, ova dva puta se ukrštaju na nivou proteolitičkih enzima, kaspaza (eng. *cysteine aspartate specific proteases*) [53]. Kaspaza 3 je jedan od najviše proučavanih proteina ove familije, okarakterisana kao najznačajnija egzekutorska kaspaza koja uvodi u ćeliju „tačku bez povratka“, odnosno u apoptotsku smrt [53], jer seče strukturne i signalne proteine, regulatore replikacije, transkripcije i translacije, regulatore apoptoze, i mnoge druge. Sečenjem se mogu aktivirati i dormantni, proapoptotski proteini ili inaktivirati proteini ključni za preživljavanje, kao što je PARP1 (eng. *poly(ADP-ribose) polymerase 1*) [53], jedarni enzim koji ima ulogu u reparaciji oštećene DNK, transkripciji, vazokonstrikciji, regulisanju astrocitne i mikroglijalne funkcije, dugotrajnoj memoriji i starenju [55]. Osim toga, u regulaciji brojnih funkcija mozga učestvuje još jedan molekul sa dualnom funkcijom - Erk1/2 (Erk44/42 kDa) koji se nakon aktivacije premešta u jedro i aktivira veliki broj transkripcionih faktora ili ostaje u citosolu gde regulišu druge ćelijske procese [56]. Dodatno, preživljavanje ćelija je regulisano i proteinskom kinazom B (Akt) čiji je signalni put prepoznat kao jedan od najkritičnijih u regulaciji preživljavanja ćelija, jer njegova aktivacija obezbeđuje ćelijama signal za preživljavanje koji je neophodan da se odupru proapoptotskim stimulusima [57].

Pored mnogobrojnih studija koje su se prevashodno bavile proučavanjem uzroka nastanka i progresije cerebrovaskularnih i/ili neurodegenerativnih bolesti, poslednjih nekoliko decenija, u istraživanjima dizajniranja efikasnih terapija za ove bolesti, osim efekata na neurone, proučavaju se i efekti na ne-neuronske ćelije. Opravdanost istraživanja uloge glijalnih ćelija, endotelnih ćelija i drugih, zasniva se na činjenici da su ove ćelije uključene u složenu patogenezu bolesti i da su ključne u neurodegenerativnim, ali i neuroprotektivnim procesima. Treba istaći da su do sada testirana brojna jedinjenja kojima bi se direktnim i/ili indirektnim delovanjem na prethodno spomenute ćelije ublažile posledice bolesti CNS, ali adekvatna terapija još uvek nije dostupna. Ipak, kao potencijalni terapeutici izdvajaju se steroidni hormoni, uključujući progesteron (P4, pregn-4-en-3,20-dion), za koje postoje indikacije da regulišu brojne procese u CNS, od njegovog razvoja, preko neurodegeneracije pa do neuroprotekcije.

Steroidni hormoni

Steroidni hormoni su signalni molekuli koji nastaju iz holesterolu i uključeni su u pravilan razvoj i funkcionisanje organizma, odgovor na stres, rad mozga i drugih organa, kao i na različite metaboličke procese. Klasična podela ovih jedinjenja je na: hormone kore nadbubrežne žlezde (kortikosteroidi) u koje se svrstavaju- kortizol/kortikosteron (glukokortikoidi) i aldosteron (mineralokortikoidi); i polne hormone među ko-

jima se razlikuju muški, odnosno, androgeni (testosteron i dihidrotestosteron/androsteron) i ženski (estrogeni i progestini/progestogeni). Treba istaći da steroidni hormoni, ali i njihovi metaboliti i sintetski analozi, u fiziološkim i patofiziološkim stanjima imaju sposobnost da modulišu različite signalne kaskade, i da na taj način kontrolišu sudbinu ćelija [58–69]. Stoga, se široko primenjuju u tretmanima mnogih bolesti, poput MS, edema mozga nastalog usled tumora, autoimunih i upalnih promena, i drugih [67,68].

Polni hormoni

Rezultati mnogih studija su pokazali da su polni hormoni, pored toga što regulišu polni razvoj i sazrevanje organizma, kao i normalno i polno-zavisno organizovanje mozga i ponašanje koje je posredovano hipotalamo-hipofizno-gonadnom osom, neophodni za preživljavanje neurona [70]. Naime, ove derivate sterola prevashodno sintetišu i luče gonade i nadbubrežne žlezde, ali mogu nastati i u mozgu *de novo* sintezom, te se nazivaju i neurosteroidi. Svoje dejstvo ostvaruju u više regiona CNS tokom normalnog razvića i starenja, dok je njihov poremećen nivo u pojedinim regionima uočen kod obolelih od neurodegenerativnih oboljenja [70]. Kod starijih osoba njihov nizak nivo dovodi se u vezu sa smanjenjem neurogeneze, naročito u HIPP [70]. Kao posledica uočava se smanjenje sposobnosti pamćenja koje je zavisno od godina, ali i poteškoće u izvršavanju pojedinih funkcija [70]. Primećeno je da se, u različitim poremećajima CNS, protektivna svojstva mogu pripisati kako polnim hormonima, njihovim metabolitima, sintetskim analogima, tako i njihovim prekursorima. Tako na primer, uočeno je da testosteron podstiče neurogenezu, razvoj neurona u HIPP, deluje antioksidativno i antiapoptotski, dok smanjenje njegovog nivoa kod osoba muškog pola može uzrokovati poremećaje poput AB, gde je njegov nivo direktno u korelaciji sa nivom proteina A β [68]. Primena derivata testosterona, estrogena, takođe ima protektivnu ulogu u modelima moždanog udara, MH nastale trajnim podvezivanjem obe zajedničke karotidne arterije ili središnje moždane arterije pacova (eng. *middle cerebral artery occlusion*, MCAO), i subarahnoidne hemoragije, gde smanjuje obim ćelijske smrti suprimiranjem aktivacije apoptotskih puteva i povećanjem ekspresije gena uključenih u preživljavanje ćelija [62,63,68]. Literaturni podaci ukazuju da dehidroepiandrosteron (DHEA), prekursor testosterona, ali i estrogena, deluje zaštitno u različitim eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih poremećaja, poput ishemije, TPM, povrede kičmene moždine, prolazne ishemijske povrede mozga, i drugih [64,65,70], dok pregnenolon, osim što je prekursor drugih hormona poput P4, deluje i kao protivupalni molekul koji održava imunološku homeostazu u različitim upalnim stanjima. Pokazano je da pregnenolon i njegovi metabolički derivati ostvaruju blagotvorne učinke na mozak, uključujući poboljšanje pamćenja i učenja i modulaciju kognitivnih funkcija. Smanjen nivo pregnenolona je uočen kod neuroupalnih bolesti, poput AB, MS, šizofrenije, depresije, autizma, što naglašava njegovu ulogu u neuroprotekciji i neuroregeneraciji [69].

Krajem '80-tih godina prošlog veka, proučavajući oporavak pacijenata nakon TPM, istraživači okupljeni oko dr Donalda Štajna su primetili da se žene oporavljaju uspešnije u odnosu na pacijente muškog pola, ističući hormonsku osnovu ovakvog odgovora kao potencijalni razlog. Serije eksperimenata sprovedenih na pacovima, potvrdile su pretpostavku da se, nakon identičnih povreda, ženke pacova oporavljaju efikasnije u odnosu na mužjake, kao i da stepen oporavka zavisi od faze estrusnog ciklusa u kojoj se životinja nalazi. Tako, ženke u proestrusu (fazi ciklusa u kojoj je nivo estrogena povišen, a nivo P4 snižen) razvijaju značajno manje oštećenje mozga, dok lažno-trudne ženke (kod kojih je nivo P4 visok) nisu pokazivale oštećenja mozga u odnosu na kontrolne, muške jedinke. Uočeno potencijalno neuroprotektivno dejstvo steroidnog/polnog hormona P4 u ovom model sistemu je kasnije podstaklo mnoge istraživače da detaljnije ispituju njegovu ulogu u drugim modelima različitih bolesti CNS, ali i da primene ovaj potencijalni terapeutik u kliničkim ispitivanjima [71]. Dodatnu mogućnost za neuroprotekciju pružaju i neuroaktivni metaboliti P4

u koje se on može konvertovati: 5 α -dihidroprogesteron (5 α -DHPROG) i 3 α ,5 α -tetrahidroprogesteron (3 α -5 α -THPROG, alopregnanolon, ALO) koji, takođe, ostvaruju specifične efekte u mozgu [67].

Progesteron

Iako nazvani po ulozi u održavanju trudnoće (pro-gestacija), progestogeni imaju ulogu i u drugim fazama estrusnog, odnosno, menstrualnog ciklusa. Ovi hormoni obuhvataju kako prirodne, tako i sintetske članove, koji se zajedno sa spolja unetim hormonima ove grupe, uobičajeno, nazivaju progestini [72].

P4 stvaraju jajnici, nadbubrežne žlezde, kao i placenta tokom trudnoće, a skladišti se u masnom tkivu. U mozgu potiče iz moždanih ćelija, ćelija kičmene moždine i perifernog nervnog sistema, koje ga sintetišu direktno iz holesterola, ali i iz perifernih tkiva iz kojih se oslobađa u krv i tako dospeva do mozga [72]. Najbitnije uloge P4 uključuju supresiju seksualnog nagona, održavanje trudnoće sprečavanjem kontrakcija materice i podsticanjem razvoja žlezda endometrijuma, ali i alveolarnog razvoja mlečnih žlezda [72]. Ovaj potentni steroidni hormon ispoljava pored reproduktivnih i ne-reproduktivna svojstva. Tako na primer, P4 reguliše širok spektar moždanih funkcija modulacijom ekspresije gena, regulacijom neurotransmitterske signalizacije, manifestacijom epigenetske aktivnosti, ali i pojačavanjem efekata estrogena [70,72].

Zbog svoje lipofilne prirode, lako prolazi kroz membrane ćelija, a efekte, kod oba pola, ostvaruje preko specifičnih receptora koji su prisutni u regionima mozga, kao što su HIP, PFC, ali i u hipotalamusu, srednjem bademastom jedru, i drugim [73]. Do sada su opisana tri tipa progesteronskih receptora:

- jedarni (klasični) prisutni u ćelijama u dve izoforme- PRA (molekulske mase ~ 94 kDa) i PRB (molekulske mase ~ 120 kDa) koje kodira isti gen, ali se prepisuju sa različitih promotora;
- transmembranski (mPR)- specifični receptori vezani za membranu, uključeni u brze ne-genomske aktivnosti P4 [73,74], uključujući kontrolu aktivnosti dopaminskog sistema i sistema γ -amino buterne kiseline (GABA) u mnogim regionima CNS, odnosno kori prednjeg mozga, malom mozgu, repatom jedru, talamusu, hipofizi i kičmenoj moždini [75];
- membranski vezani (eng. *progesterone receptor membrane component 1*, PGRMC1) smešteni uz membrane endoplazmatičnog retikuluma i Goldži aparata, i uključeni u aktivaciju mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) [74].

Molekulski mehanizmi delovanja progesterona

Literaturni podaci ukazuju na dualno delovanje P4: genomsko i ne-genomsko. Genomsko ili klasično delovanje ostvaruje se preko PRA i PRB koje odlikuje sposobnost brzog premeštanja iz citosola u jedro. U ne-vezanom obliku, ovi receptori se nalaze u citosolu u kompleksu sa šaperonskim molekulima, poput proteina toplotnog šoka (eng. *heat shock protein*, HSP), koji se po vezivanju liganda, odnosno P4, oslobađaju. PR se potom dimerizuju i premeštaju u jedro gde se vezuju za specifična palindromska vezujuća mesta na molekulu DNK (eng. *progesterone response elements*, PRE) u promotorskim regionima gena, što dalje pokreće transkripciju [67]. S druge strane, ne-genomski (ili ne-klasični) način delovanja podrazumeva aktivaciju receptora na ćelijskoj membrani, citosolnih PR i/ili delovanje putem unutarćelijske kaskade preko sekundarnih glasnika. Naime, P4 po vezivanju za mPR, ali i citosolne PR [76] moduliše nastanak cAMP (ciklični adenzin monofosfat), inhibira adenil ciklazu, i drugo [77]. Dok se vezivanjem P4 za PGRMC1 pokreće Erk1/2 signalna kaskada koja je odgovorna za oslobađanje neurotrofnog moždanog faktora (eng. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) jednog od ključnih posrednika zaštitnih osobina P4 [78]. Promene nastale brzo P4 akcijom, mogu biti jakog intenziteta i dugotrajne [79].

Terapijski potencijal progesterona u animalnim modelima cerebrovaskularnih i/ili neurodegenerativnih bolesti

Podaci prikupljeni tokom nekoliko decenja istraživanja ukazuju da primena P4 na višestruke načine moduliše ili usporava destruktivne procese u mozgu [80]. Između ostalog, primećeno je da aplikacija P4 smanjuje razvoj moždanog edema, moduliše dejstvo inhibitornog neurotransmitera GABA, smanjuje LPO, i stepen OS, ograničava oslobađanje upalnih citokina, i smanjuje obim ćelijske smrti [80].

Oticanje moždanog tkiva se dovodi u vezu sa visokim mortalitetom, ne samo kod osoba izloženih TPM, nego i kod pacijenata koji imaju tumore mozga ili su pretrpeli moždani udar. U pomenutim stanjima, upalne reakcije pokreću dezintegraciju moždanog tkiva što uzrokuje edem i dalji gubitak ćelija. Potrebno je naglasiti da se edem javlja u dve faze, vazogenoj i citotoksičnoj. Vazogeni edem nastaje narušavanjem KMB što omogućava ulazak tečnosti u parenhim mozga, povećavajući unutarlobanjski pritisak i uzrokujući dalji gubitak ćelija. S druge strane, citotoksična faza edema se javlja usled nakupljanja tečnosti u neuronima i reaktivnim astrocitima narušavajući strukturu i funkciju ćelija, uzrokujući oslobađanje dodatnih toksičnih agenasa u parenhim mozga i ulazak u ciklus sekundarne ćelijske smrti, uglavnom nakon TPM. Upravo, P4 redukuje obe vrste edema u svim prethodno navedenim stanjima. U osnovi ovakvog odgovora, najverovatnije, leži sposobnost P4 da poveća nivo GABA [80], inhibira rad Na^+/K^+ -ATPaze, reguliše nivo vazopresina, ali i smanji nivo akvaporina 4 i 9, strukturnih komponenti kanala za vodu u membranama stopala astrocita i mikroglije, koji deluju kao osmosenzori i kontrolišu drenažu tečnosti u ventrikule mozga [71]. Upravo, smatra se da bi zbog ovih osobina primena P4 mogla biti efikasna u kontroli katamenijalne epilepsije, stanja uzrokovano visokim nivoom estrogena, a koje je primećeno kod nekih osoba tokom određenih faza menstrualnog ciklusa [71].

Sledeći način na koji P4 ispoljava svoje protektivne osobine je usko vezan sa modulacijom odgovora ćelija na OS. Naime, pokazano je da je P4 odgovoran za smanjenje nivoa LPO, sprečavanje stvaranja slobodnih radikala i povećanje efikasnosti komponenti AO sistema zaštite [81], što doprinosi očuvanju integriteta membrane i stabilizaciji KMB. Naime, iako P4 nema karakterističnu strukturu antioksidanta, visoki nivoi hormona su efikasni u smanjenju oštećenja izazvanih slobodnim radikalima, što je potvrđeno i kod trudnih ženki pacova [81–84]. Primena P4 na dozno-zavisani način smanjuje LPO u različitim *in vitro* sistemima u kojima se stvaraju slobodni radikali [82,84]. Takođe, primena ovog steroida povećava nivo mitohondrijalnog GSH, kritičnog hvatača slobodnih radikala [85], održava funkciju mitohondrija i smanjuje povećanje nivoa SOD izazvano povredama [71]. Primećeno je i da P4 dovodi do smanjenja količine nitrita, SOD i H_2O_2 koje stvaraju makrofagi kao odgovor na citokine [86], kao i da smanjenje stepena upalnih procesa može nastati usled P4-posredovanog sniženja nivoa citokina, aktiviranja i pospešivanja migracije imunskih ćelija [87–89]. Naime, povrede, poput TPM izazivaju izraženu upalnu reakciju, s teškom gliozom uočenu u područjima mozga proksimalno i distalno od povrede, što dalje doprinosi invaziji makrofaga i neutrofila u povređenu oblast. Smatra se da je jedan od najvažnijih mehanizama koji leži u osnovi zaštitnih svojstava P4, upravo, prevencija ili usporavanje upalnih reakcija izazvanih citokinima, snažnim aktivatorima upalnog procesa, poput interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), faktora nekroze tumora (TNF), i drugih [80]. Konačno, svi opisani štetni procesi, koje ovaj hormon moduliše, za rezultat mogu imati smrt ćelije. Ipak, primena P4 ograničava gliozu [88], ali i apoptozu stabilizacijom mitohondrija i inhibicijom aktivnosti proapoptotskih enzima, ali i aktiviranjem antiapoptotskih signalnih puteva [88,90]. Jedan od načina na koje deluje je i smanjenje nivoa kaspaze 3, Bax i Akt, ali i modulacija, odnosno, povećanje ekspresije antiapoptotskih proteina, poput Bcl-2 i Erk [57,60,61,88,90,91]. Budući da je sposoban da utiče na raznovrsne procese u ćelijama koji su prethodno opisani, nije začuđujuće da se P4 pokazao neuroprotektivnim u različitim modelima cerebrovaskularnih i/ili

neurodegenerativnih bolesti, ali i stanja, poput TPM. Tako na primer, eksperimenti na animalnim TPM modelima pokazali su da P4, ali i njegov metabolit ALO, ostvaruju kako kratkoročne, tako i dugoročne efekte, poput smanjenja oticanja mozga, održavanja strukture i funkcije KMB, intrakranijalnog pritiska [92]. Takođe, zapaženo je i da ublažavaju povećanje nivoa upalnih citokina, kao što su TNF, IL-6 i IL-1 [93], povećavaju ekspresiju antioksidativnih enzima, uključujući i SOD [94], neutrališu prekomerno nastale slobodne radikale, sprečavaju ulazak kalcijuma, pojačavaju angiogenezu i promovišu oporavak neuralne funkcije [95]. Dodatno, Li i saradnici (2012) su pokazali da P4 povećava nivo cirkulišućih endotelних progenitorskih ćelija (EPC) i pospešuje neurovaskularnu popravku kod pacova [96]. Ista grupa autora je u sledećoj studiji pokazala da P4, aplikovan u niskoj dozi, preko PRB, za kratko vreme poboljšava preživljavanje EPC aktiviranjem Akt signalnog puta, stimuliše formiranje kapilara, adheziju i migraciju EPC čime se povećava njihova angiogena aktivnost [95]. Ovakvi protektivni efekti nakon primene P4 su praćeni i značajnim poboljšanjem kognicije, generalne funkcionalnosti [97], uključujući i poboljšanje lokomotorne aktivnosti i performansi na Morisovom testu vodenog lavirinta [88,90,93], kao i smanjenje anksioznosti [90].

Učinkovitost P4 je pokazana i u drugim animalnim modelima cerebrovaskularnih povreda mozga, poput moždanog udara u kojem P4 održava integritet KMB, smanjuje hemoragijsku transformaciju, upalni odgovor, mitohondrijsku disfunkciju i oksidativna oštećenja, kao i apoptozu [67], ali i pospešuje neurogenezu i preživljavanje novostvorenih neurona [67]. Tako na primer, nakon MCAO, P4 u dozi od 8 mg/kg nakon 48 h poboljšava preživljavanje i motoričke funkcije [71,98]. Interesantno, ova neuroprotekcija je primetna bilo da je tretman primenjen pre ili post ishemijski. P4 apliciran pre MCAO, ali i njegova postishemijska aplikacija u istom modelu izazvanom na drugi način, smanjuje veličinu lezije i poboljšava funkcionalni oporavak kod pacova [67,99], dok kod ovarijektomisanih mačaka, P4 aplikovan u dozi od 10 mg/kg dnevno, 7 dana pre i nakon globalne moždane ishemije čuva integritet i funkciju neurona strijatuma [100,101]. Treba istaći, da pored P4 u ovom modelu, adekvatnu zaštitu može pružiti i njegov metabolit, ALO, koji, takođe, redukuje veličinu lezije, disfunkciju KMB, upalne procese i deficite u ponašanju [67].

Što se tiče zaštite u prvim trenucima nakon moždanog udara, primećeno je kratkotrajno početno povećanje nivoa endogenog P4 u mozgu, što ukazuje da ovaj hormon može pružiti ranu endogenu zaštitu [67]. Različitim studijama je, pak, pokazano da je optimalna doza za primenu ovog hormona u modelu moždanog udara 8 mg/kg, kao i da on pruža zaštitu čak i kad se primeni 6 h nakon ishemije, što bi za potencijalnu primenu kod ljudi ostavilo dosta vremena za aplikaciju. Literaturni podaci ukazuju da je u osnovi, protektivni odgovor u uslovima nametnute MCAO, PR-posredovan i da endogeni P4, 6 h i 24 h nakon MCAO, smanjuje veličinu lezije i oštećenje motornih funkcija. S druge strane, dodatno unet, egzogeni P4, pruža dugotrajniju neuroprotekciju, takođe, posredstvom PR [102–104]. Pretpostavlja se da je za ovu protekciju odgovoran isključivo P4, a ne ALO, što je pokazano na nokaut miševima od kojih su PR^{-/-}, ali i PR^{+/-} miševi imali veće lezije nakon MCAO u odnosu na PR^{+/-} miševе. Upravo, rezultati ove studije ukazuju da bio-konverzija P4 u ALO nije mehanizam kojim P4 ispoljava neuroprotektivni efekat, inače bi tretman P4 bio neuroprotektivan i kod PR^{-/-} miševa [104]. Takođe, pored prisustva PR, za zaštitu je neophodan i odgovorajući nivo PR, s obzirom da je pokazano da P4 smanjuje veličinu lezija kod PR^{+/-} miševa, ali ne i kod heterozigota [67].

Iako PR predstavlja glavnog posrednika neuroprotektivnih efekata P4 nakon moždane ishemije, nije isključeno da i dodatni medijatori, kao i uključivanje specifičnih signalnih puteva može biti ključno za P4-posredovanu neuroprotekciju. Tako na primer, Cai i saradnici (2008) su pokazali da je aktivacija Src-Erk1/2 kaskade putem PR odgovorna za neuroprotektivne efekte P4 uočene 48 h nakon MCAO [105], dok inhibicija Akt signalnog puta, koji reguliše upalne procese i preživljavanje ćelija, smanjuje zaštitne efekte P4 24 h nakon MCAO [92].

Dodatno, pokazano je da P4 kod mužjaka pacova nakon nametanja MH ostvaruje regionalno-specifično dejstvo, odnosno uzrokuje donekle različite efekte na nivou morfoloških karakteristika ćelija, obima ćelijske smrti, ali i signalne kaskade u PFC i HIP, što je praćeno poboljšanjem kognitivnih i lokomotornih sposobnosti mužjaka pacova [60,61]. Naime, primećeno je da u PFC aplikovani hormon umanjuje DNK fragmentaciju, uspostavlja pro/antioksidativnu ravnotežu što je najverovatnije postignuto kompenzatornom aktivnošću enzima CAT, povećanjem nivoa protektivnog NO nastalog aktivnošću eNOS i smanjenjem obima LPO [60,61]. Dalje, ovaj polni hormon ublažava MH-posredovano smanjenje ekspresije PRA i PRB, moduliše ekspresiju gena i proteina uključenih u apoptotske procese, a reguliše i Akt/Erk/eNOS/NO signalni put, što bi, barem delimično, moglo biti odgovorno za uočene neuroprotektivne efekte P4 u PFC u korišćenom modelu. Pored toga, u HIP, P4 ispoljava sposobnost blagog smanjenja intenziteta OS/NS povećanjem aktivnosti komponenti AO zaštite, poput SOD i GST, i u manjoj meri CAT; poništava MH-posredovano smanjenje ekspresije PRA i PRB, moduliše ekspresiju gena i proteina uključenih u apoptotske procese i time smanjuje obim ćelijske smrti. Interesantno, u ovom moždanom regionu, P4 ne reguliše Akt/Erk/eNOS/NO signalni put, kao što to čini u PFC, odnosno, ograničava MH-narušen Akt signalni put, dok NO nastaje, najverovatnije, delovanjem nNOS [60,61].

Efikasnost P4 tretmana uočena je i u animalnim AB modelima. Tako na primer, tretman ženki miša u AB modelu sa P4 ili sa P4 u kombinaciji sa estradiolom tokom 3 meseca specifično umanjuje hiperfosforilaciju Tau proteina i formiranje neurofibrilarnih klubadi [106]. Slični efekti su detektovani i nakon primene ALO u istom modelu, odnosno, uočeno je povećanje stope neurogeneze, poboljšanje kognitivnih funkcija i pamćenja, smanjenje upalnih procesa i akumulacije A β [107–110]. S druge strane, proučavanje efekata P4 u animalnim PB modelima nije pružilo smislene i konačne zaključke o terapeutskom potencijalu P4, s obzirom da efekti variraju zavisno od doze P4, načina primene, pola i korišćenog modela [67]. Nasuprot tome, u animalnim PB modelima, ALO se pokazao kao uspešniji time što je uticao na poboljšanje kognitivnih i motoričkih funkcija [67], što ovaj metabolit izdvađa kao potencijalni terapeutik u lečenju obolelih od PB.

Nekoliko studija je pokazalo i da tretman P4 stimuliše sintezu neurotrofnih faktora, kao što je BDNF, što je izuzetno značajno kod povreda kičmene moždine gde je nivo BDNF smanjen za čak 50% [111–113]. Osim toga, P4 se pokazao i učinkovit kod hroničnih demijelinizujućih oboljenja, poput ALS i MS [112–116]. Naime, u animalnom ALS modelu, kod Wobbler miševa koji ispoljavaju degeneraciju motornih neurona, P4 smanjuje neuropatologiju i povećava mijelinizaciju posredovanu oligodendrocitima [112–114], dok u kuprizonskom modelu MS, P4 smanjuje degeneraciju oligodendrocita, povećava broj njihovih progenitora, smanjuje astrogliozu, demijelinizaciju, neurološke deficite kod mužjaka miševa [115] i ispoljava protivupalno dejstvo [117]. Kod ženki miševa, u istom modelu, P4 i njegov sintetski derivat nestoron, selektivni ligand PR visokog afiniteta, pokreću reparaciju mijelina u moždanoj kori i žuljevitom telu (lat. *corpus callosum*) [116]. Efikasnost P4, ALO i nestorona, odnosno promijelinizacija, neuroprotektivni i protivupalni efekti, su pokazani i u eksperimentalnom modelu autoimunog encefalomijelitisa (EAE) [111,118,119].

Klinička ispitivanja učinkovitosti progesterona u cerebrovaskularnim i/ili neurodegenerativnim bolestima

Uprkos višestrukim koristima primene P4 u eksperimentalnim modelima TPM i obećavajućim rezultatima Faze II kliničkih ispitivanja, dve Faze III kliničkih ispitivanja nisu uspele da dokažu dobrobiti korišćenja ovog hormona. Neka od mogućih objašnjenja ovakvog ishoda su velika heterogenost pacijenata koji su učestvovali u studijama, u odnosu na pol, godine, stepen oštećenja izazvan TPM, subjektivna merenja i praćenje pacijenata samo u kraćem vremenskom periodu [67,120]. Dodatno, pacijenti sa TPM koji su primali P4

imali su i 100 puta više P4 u plazmi nego pacijenti koji su primili placebo lek, što može uticati na zasićenost PR i njihovu dozno-zavisnu aktivaciju- veće doze ovog hormona mogu ne samo zasititi jedarne PR, već i aktivirati mPR i PGRMC1. Visoke doze, takođe, mogu izazvati desenzibilizaciju receptora ili smanjenje njihove ekspresije, zasićenje puteva koji vode do konverzije prekursora u neuroaktivne metabolite ili pokretanje inaktivirajućih metaboličkih puteva, što može biti uzrok odsustva pozitivnog odgovora pacijenata sa TPM na P4 tretmane [67]. Osim toga, rezultati nekoliko sprovedenih meta-analiza su ukazali na nemogućnost smanjenja stope smrtnosti nakon P4 tretmana, dok su druge studije ukazale protektivna dejstva P4 nakon TPM, ali samo tokom prva 3 meseca od nastanka povrede, ne i nakon 6 meseci [67].

Treba istaći da je u skorije vreme planirano otpočinjanje Faze II kliničkih ispitivanja u kojima bi bio istražen potencijal ALO u otklanjanju simptoma depresije, bola i oporavku u nekoliko vremenskih tačaka kod pacijenata sa blagim TPM [67].

Zaključak

P4, potentni steroidni hormon, njegovi neuroaktivni metaboliti, poput ALO, ali i sintetski analozi, kao što je nestoron, ispoljavaju plejotropne zaštitne efekte, smanjujući strukturna i funkcionalna oštećenja mozga u različitim animalnim modelima cerebrovaskularnih i/ili neurodegenerativnih bolesti, delujući ne samo na neurone, već i na glijalne i endotelne ćelije, i druge. Iako se u kliničkim ispitivanjima, za sada, P4 pokazao kao neadekvatan terapeutik u lečenju pacijenata sa TPM, moguće je da bi u drugim cerebrovaskularnim i/ili neurodegenerativnim bolestima i drugim neuropatološkim stanjima u humanoj populaciji, ili/i primenjen drugačijim vidom aplikacije, uključujući dužinu upotrebe/dozu/način aplikacije, sam ili/i u kombinaciji sa drugim agensima, pokazao ohrabrujuće rezultate. Stoga su neophodne dodatne kliničke studije u kojima bi se pratio potencijalni neuroprotektivni P4 efekat kod ljudi sa ovim dijagnozama.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora **451-03-68/2022-14/200017**.

Literatura

1. Mayne K, White JA, McMurran CE, Rivera FJ, de la Fuente AG. Aging and Neurodegenerative Disease: Is the Adaptive Immune System a Friend or Foe? *Front Aging Neurosci.* 2020;12:572090.
2. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(7):a028035.
3. Farkas E, Luiten PGM, Bari F. Permanent, Bilateral Common Carotid Artery Occlusion in the Rat: A Model for Chronic Cerebral Hypoperfusion-Related Neurodegenerative Diseases. *Brain Research Reviews.* 2007;54(1):162–80.
4. Gallego I, Villate-Beitia I, Saenz-del-Burgo L, Puras G, Pedraz JL. Therapeutic Opportunities and Delivery Strategies for Brain Revascularization in Stroke, Neurodegeneration, and Aging. *Pharmacol Rev.* 2022;74(2):439–61.
5. Ohta S, Meyer E, Thompson CJ, Gjedde A. Oxygen Consumption of the Living Human Brain Measured after a Single Inhalation of Positron Emitting Oxygen. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12(2):179–92.
6. Gordon GRJ, Mulligan SJ, MacVicar BA. Astrocyte Control of the Cerebrovasculature. *Glia.* 2007;55(12):1214–21.
7. Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and Neuronal Remodeling after Ischemic Stroke. *Neural Regen Res.* 2020;15(1):16.
8. Ekker MS, Boot EM, Singhal AB, Tan KS, Debette S, Tuladhar AM, et al. Epidemiology, Aetiology, and Management of Ischaemic Stroke in Young Adults. *The Lancet Neurology.* 2018;17(9):790–801.
9. Beal CC. Gender and Stroke Symptoms: A Review of the Current Literature. *Journal of Neuroscience Nursing.* 2010;42(2):80–7.
10. Jung S, Gilgen M, Slotboom J, El-Koussy M, Zubler C, Kiefer C, et al. Factors that Determine Penumbra Tissue Loss in Acute Ischaemic Stroke. *Brain.* 2013;136(12):3554–60.
11. Hebert LE, Bienias JL, Aggarwal NT, Wilson RS, Bennett DA, Shah RC, et al. Change in Risk of Alzheimer Disease Over Time. *Neurology.* 2010;75(9):786–91.
12. Michaelson DM. *APOE ε4*: The Most Prevalent Yet Understudied Risk Factor for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia.* 2014;10(6):861–8.
13. Gorelick PB. Risk Factors for Vascular Dementia and Alzheimer Disease. *Stroke.* 2004;35:2620–2.
14. Green RC. Risk of Dementia Among White and African American Relatives of Patients With Alzheimer Disease. *JAMA.* 2002;287(3):329.
15. Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, Auerbach SA, Becker R, Burke J, et al. Risk of Dementia Among Relatives of Alzheimer's Disease Patients in the MIRAGE Study: What is in Store for the Oldest Old? *Neurology.* 1996;46(3):641–50.
16. Mayeux R, Sano M, Chen J, Tatemichi T, Stern Y. Risk of Dementia in First-Degree Relatives of Patients With Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Archives of Neurology.* 1991;48(3):269–73.
17. Bersini S, Arrojo e Drigo R, Huang L, Shokhirev MN, Hetzer MW. Transcriptional and Functional Changes of the Human Microvasculature during Physiological Aging and Alzheimer Disease. *Adv Biosys.* 2020;4(5):2000044.
18. Liesz A. The Vascular Side of Alzheimer's Disease. *Science.* 2019;365(6450):223–4.
19. Di Marco LY, Farkas E, Martin C, Venneri A, Frangi AF. Is Vasomotion in Cerebral Arteries Impaired in Alzheimer's Disease? *JAD.* 2015;46(1):35–53.
20. Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, Jefferies WA. Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervascularity in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e23789.
21. Román GC. Brain Hypoperfusion: A Critical Factor in Vascular Dementia. *Neurological Research.* 2004;26(5):454–8.
22. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Lancet.* 2017;390(10107):2084–98.
23. Garbuzova-Davis S, Rodrigues MCO, Hernandez-Ontiveros DG, Louis MK, Willing AE, Borlongan CV, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neurovascular Disease. *Brain Research.* 2011;1398:113–25.
24. Jullienne A, Obenaus A, Ichkova A, Savona-Baron C, Pearce WJ, Badaut J. Chronic Cerebrovascular Dysfunction After Traumatic Brain Injury: Cerebrovascular Dysfunction After TBI. *Journal of Neuroscience Research.* 2016;94(7):609–22.
25. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Traumatic Brain Injury and Amyloid-β Pathology: A Link to Alzheimer's Disease? *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(5):361–70.

26. Pop V, Badaut J. A Neurovascular Perspective for Long-Term Changes After Brain Trauma. *Transl Stroke Res*. 2011;2(4):533–45.
27. Smith DH, Johnson VE, Stewart W. Chronic Neuropathologies of Single and Repetitive TBI: Substrates of Dementia? *Nat Rev Neurol*. 2013;9(4):211–21.
28. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, et al. Ageing as a Risk Factor for Neurodegenerative Disease. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(10):565–81.
29. Verheggen ICM, de Jong JJA, van Boxtel MPJ, Gronenschild EHBM, Palm WM, Postma AA, et al. Increase in Blood–Brain Barrier Leakage in Healthy, Older Adults. *GeroScience*. 2020;42(4):1183–93.
30. Leenders KL, Perani D, Lammertsma AA, Heather JD, Buckingham P, Jones T, et al. Cerebral Blood Flow, Blood Volume and Oxygen Utilization: Normal Values and Effect of Age. *Brain*. 1990;113(1):27–47.
31. Zou Q, Wu CW, Stein EA, Zang Y, Yang Y. Static and Dynamic Characteristics of Cerebral Blood Flow During the Resting State. *NeuroImage*. 2009;48(3):515–24.
32. Camici GG, Savarese G, Akhmedov A, Lüscher TF. Molecular Mechanism of Endothelial and Vascular Aging: Implications for Cardiovascular Disease. *Eur Heart J*. 2015;36(48):3392–403.
33. Carvalho C, Moreira PI. Oxidative Stress: A Major Player in Cerebrovascular Alterations Associated to Neurodegenerative Events. *Front Physiol*. 2018;9:806.
34. Ungvari Z, Tucsek Z, Sosnowska D, Toth P, Gautam T, Podlitsky A, et al. Aging-Induced Dysregulation of Dicer1-Dependent MicroRNA Expression Impairs Angiogenic Capacity of Rat Cerebromicrovascular Endothelial Cells. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2013;68(8):877–91.
35. Ungvari Z, Tarantini S, Sorond F, Merkely B, Csiszar A. Mechanisms of Vascular Aging, A Geroscience Perspective. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;75(8):931–41.
36. Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC. Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. *Frontiers in Neuroscience*. 2007.
37. Huang Y, Li W, Su Z yuan, Kong ANT. The Complexity of the Nrf2 Pathway: Beyond the Antioxidant Response. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015;26(12):1401–13.
38. Ding K, Wang H, Xu J, Li T, Zhang L, Ding Y, et al. Melatonin Stimulates Antioxidant Enzymes and Reduces Oxidative Stress in Experimental Traumatic Brain Injury: the Nrf2–ARE Signaling Pathway as a Potential Mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;73:1–11.
39. Sajja RK, Kaiser MA, Vijay V, Desai VG, Prasad S, Cucullo L. In Vitro Modulation of Redox and Metabolism Interplay at the Brain Vascular Endothelium: Genomic and Proteomic Profiles of Sulforaphane Activity. *Sci Rep*. 2018;8(1):12708.
40. Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R. Nrf2–ARE Pathway: An Emerging Target Against Oxidative Stress and Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016;157:84–104.
41. Sivandzade F, Prasad S, Bhalerao A, Cucullo L. NRF2 and NF- κ B Interplay in Cerebrovascular and Neurodegenerative Disorders: Molecular Mechanisms and Possible Therapeutic Approaches. *Redox Biology*. 2019;21:101059.
42. Weight SC, Nicholson ML. Nitric Oxide and Renal Reperfusion Injury: A Review. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 1998;16(2):98–103.
43. Levine AB, Punihaoale D, Levine TB. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. *Cardiology*. 2012;122(1):55–68.
44. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 1996;10(3–4):179–90.
45. Leist M, Fava E, Montecucco C, Nicotera P. Peroxynitrite and Nitric Oxide Donors Induce Neuronal Apoptosis by Eliciting Autocrine Excitotoxicity. *European Journal of Neuroscience*. 1997;9(7):1488–98.
46. Cohen R, Adachi T. Nitric-Oxide-Induced Vasodilatation: Regulation by Physiologic S-Glutathiolation and Pathologic Oxidation of the Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2006;16(4):109–14.
47. Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, Yang SX, Yamakuchi M, Bao C, et al. Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-ethylmaleimide-Sensitive Factor. *Cell*. 2003;115(2):139–50.
48. Sandberg M, Patil J, D'Angelo B, Weber SG, Mallard C. NRF2-Regulation in Brain Health and Disease: Implication of Cerebral Inflammation. *Neuropharmacology*. 2014;79:298–306.

49. Suzuki T, Yamamoto M. Molecular Basis of the Keap1–Nrf2 System. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;88:93–100.
50. Attia AA, ElMazoudy RH, El-Shenawy NS. Antioxidant Role of Propolis Extract Against Oxidative Damage of Testicular Tissue Induced by Insecticide Chlorpyrifos in Rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2012;103(2):87–93.
51. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005;16(10):577–86.
52. Kašparová S, Brezová V, Valko M, Horecký J, Mlynárik V, Liptaj T, et al. Study of the Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Brain Hypoperfusion. *Neurochemistry International*. 2005;46(8):601–11.
53. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
54. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death. *Cell*. 2004;116(2):205–19.
55. Sung YJ, Ambron RT. PolyADP-Ribose Polymerase-1 (PARP-1) and the Evolution of Learning and Memory. *Bioessays*. 2004;26(12):1268–71.
56. Kim EK, Choi EJ. Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2010;1802(4):396–405.
57. Yao R, Cooper GM. Requirement for Phosphatidylinositol-3 Kinase in the Prevention of Apoptosis by Nerve Growth Factor. *Science*. 1995;267(5206):2003–6.
58. Drakulić D, Veličković N, Stanojlović M, Grković I, Mitrović N, Lavrnja I, et al. Low-Dose Dexamethasone Treatment Promotes the Pro-Survival Signalling Pathway in the Adult Rat Prefrontal Cortex. *J Neuroendocrinol*. 2013;25(7):605–16.
59. Drakulić D, Stanojlović M, Nedeljković N, Grković I, Veličković N, Guševac I, et al. Upregulation of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1 and Ecto-5'-Nucleotidase in Rat Hippocampus after Repeated Low-Dose Dexamethasone Administration. *J Mol Neurosci*. 2015;55(4):959–67.
60. Stanojlović M, Guševac Stojanović I, Zarić M, Martinović J, Mitrović N, Grković I, et al. Progesterone Protects Prefrontal Cortex in Rat Model of Permanent Bilateral Common Carotid Occlusion via Progesterone Receptors and Akt/Erk/eNOS. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(5):829–43.
61. Stanojlović M, Guševac I, Grković I, Zlatković J, Mitrović N, Zarić M, et al. Effects of Chronic Cerebral Hypoperfusion and Low-Dose Progesterone Treatment on Apoptotic Processes, Expression and Subcellular Localization of Key Elements Within Akt and Erk Signaling Pathways in Rat Hippocampus. *Neuroscience*. 2015;311:308–21.
62. Stanojlović M, Zlatković J, Guševac I, Grković I, Mitrović N, Zarić M, et al. Repeated Low-Dose 17 β -estradiol Treatment Prevents Activation of Apoptotic Signaling Both in the Synaptosomal and Cellular Fraction in Rat Prefrontal Cortex Following Cerebral Ischemia. *Neurochemistry International*. 2015;83–84:1–8.
63. Stanojlović M, Guševac I, Grković I, Mitrović N, Zlatković J, Horvat A, et al. Repeated Estradiol Treatment Attenuates Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Neurodegeneration in Rat Hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(6):989–99.
64. Zarić M, Drakulić D, Dragić M, Guševac Stojanović I, Mitrović N, Grković I, et al. Molecular Alterations and Effects of Acute Dehydroepiandrosterone Treatment Following Brief Bilateral Common Carotid Artery Occlusion: Relevance to Transient Ischemic Attack. *Neuroscience*. 2019;410:128–39.
65. Zarić M, Drakulić D, Stojanović IG, Mitrović N, Grković I, Martinović J. Regional-Specific Effects of Cerebral Ischemia/Reperfusion and Dehydroepiandrosterone on Synaptic NMDAR/PSD-95 Complex in Male Wistar rats. *Brain Research*. 2018;1688:73–80.
66. Arbo BD, Ribeiro FS, Ribeiro MF. Astrocyte Neuroprotection and Dehydroepiandrosterone. *Vitamins and Hormones* 2018;108:175–203.
67. Guennoun R. Progesterone in the Brain: Hormone, Neurosteroid and Neuroprotectant. *IJMS*. 2020;21(15):5271.
68. Siddiqui AN, Siddiqui N, Khan RA, Kalam A, Jabir NR, Kamal MA, et al. Neuroprotective Role of Steroidal Sex Hormones: An Overview. *CNS Neurosci Ther*. 2016;22(5):342–50.
69. Murugan S, Jakka P, Namani S, Mujumdar V, Radhakrishnan G. The Neurosteroid Pregnenolone Promotes Degradation of Key Proteins in the Innate Immune Signaling to Suppress Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(12):4596–607.
70. Bahnasy WS, El-Heneedy YA, El-Seidy EA. Sex Hormones and Alzheimer's Disease. *Endocr Rev*. 2018;41:273–319.
71. Stein DG. Progesterone Exerts Neuroprotective Effects After Brain Injury. *Brain Research Reviews*. 2008;57(2):386–97.

72. Tatiana Z. Gonadal Sex Steroids: Production, Action and Interactions in Mammals. Steroids - From Physiology to Clinical Medicine. InTech; 2012.
73. Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, et al. Progesterone Receptors: Form and Function in Brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2008;29(2):313–39.
74. Garg D, Ng SSM, Baig KM, Driggers P, Segars J. Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2017;28(9):656–68.
75. Berent-Spillson A, Briceno E, Pinsky A, Simmen A, Persad CC, Zubieta JK, et al. Distinct Cognitive Effects of Estrogen and Progesterone in Menopausal Women. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;59:25–36.
76. Hagiwara A, Ogiwara K, Takahashi T. Expression of Membrane Progesterin Receptors (mPRs) in Granulosa Cells of Me-daka Preovulatory Follicles. *Zoological Science*. 2016;33(1):98–105.
77. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, et al. Progesterone Receptor Contains a Proline-Rich Motif that Directly Interacts with SH3 Domains and Activates c-Src Family Tyrosine Kinases. *Molecular Cell*. 2001;8(2):269–80.
78. Singh M, Su C. Progesterone and Neuroprotection. *Hormones and Behavior*. 2013;63(2):284–90.
79. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. The Neuroprotective Roles of BDNF in Hypoxic Ischemic Brain Injury. *Biomedical Reports*. 2013;1(2):167–76.
80. Stein DG, Wright DW, Kellermann AL. Does Progesterone Have Neuroprotective Properties? *Annals of Emergency Medicine*. 2008;51(2):164–72.
81. Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone Protects Against Lipid Peroxidation Following Traumatic Brain Injury in Rats. *Molecular and Chemical Neuropathology*. 1997;31(1):1–11.
82. Subramaniam S, Unsicker K. ERK and Cell Death: ERK1/2 in Neuronal Death: ERK1/2 in Neuronal Death. *FEBS Journal*. 2010;277(1):22–9.
83. Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens Attenuate and Corticosterone Exacerbates Excitotoxicity, Oxidative Injury, and Amyloid β -Peptide Toxicity in Hippocampal Neurons. *Journal of Neurochemistry*. 2002;66(5):1836–44.
84. Vedder H, Anthes N, Stumm G, Würz C, Behl C, Krieg JC. Estrogen Hormones Reduce Lipid Peroxidation in Cells and Tissues of the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*. 2002;72(6):2531–8.
85. Subramaniam M, Pusphendran CK, Tarachand U, Devasagayam TPA. Gestation Confers Temporary Resistance to Peroxidation in the Maternal Rat Brain. *Neuroscience Letters*. 1993;155(2):151–4.
86. Chao TC, Alten PJV, Walter RJ. Steroid Sex Hormones and Macrophage Function: Modulation of Reactive Oxygen Intermediates and Nitrite Release. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1994;32(1):43–52.
87. Pettus EH, Wright DW, Stein DG, Hoffman SW. Progesterone Treatment Inhibits the Inflammatory Agents that Accompany Traumatic Brain Injury. *Brain Research*. 2005;1049(1):112–9.
88. Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone and Progesterone Decrease Cell Death and Cognitive Deficits After a Contusion of the Rat Pre-Frontal Cortex. *Neuroscience*. 2004;123(2):349–59.
89. Nilsen J, Brinton RD. Impact of Progestins on Estradiol Potentiation of the Glutamate Calcium Response: *Neuroreport*. 2002;13(6):825–30.
90. Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW, Stein DG. The Neurosteroids Progesterone and Allopregnanolone Reduce Cell Death, Gliosis, and Functional Deficits after Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of Neurotrauma*. 2005;22(1):106–18.
91. Ghoumari AM, Ibanez C, El-Etr M, Leclerc P, Eychenne B, O'Malley BW, et al. Progesterone and its Metabolites Increase Myelin Basic Protein Expression in Organotypic Slice Cultures of Rat Cerebellum: Progesterone and CNS Myelination. *Journal of Neurochemistry*. 2003;86(4):848–59.
92. Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG. Progesterone and Allopregnanolone Attenuate Blood–Brain Barrier Dysfunction Following Permanent Focal Ischemia by Regulating the Expression of Matrix Metalloproteinases. *Experimental Neurology*. 2010;226(1):183–90.
93. He J, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone, a Progesterone Metabolite, Enhances Behavioral Recovery and Decreases Neuronal Loss After Traumatic Brain Injury. *Restor Neurol Neurosci*. 2004;22(1):19–31.
94. Pajović S, Saičić ZS, Spasić MB, Petrović VM, Martinović JV. Effects of Progesterone and Estradiol Benzoate on Superoxide Dismutase Activity in the Brain of Male Rats. *Experientia*. 1996;52(3):221–4.

95. Yu P, Li S, Zhang Z, Wen X, Quan W, Tian Q, et al. Progesterone-Mediated Angiogenic Activity of Endothelial Progenitor Cell and Angiogenesis in Traumatic Brain Injury Rats Were Antagonized by Progesterone Receptor Antagonist. *Cell Prolif.* 2017;50(5):e12362.
96. Li Z, Wang B, Kan Z, Zhang B, Yang Z, Chen J, et al. Progesterone Increases Circulating Endothelial Progenitor Cells and Induces Neural Regeneration after Traumatic Brain Injury in Aged Rats. *Journal of Neurotrauma.* 2012;29(2):343–53.
97. Cooke PS, Nanjappa MK, Yang Z, Wang KKW. Therapeutic Effects of Progesterone and its Metabolites in Taumatic Brain Injury May Involve Non-Classical Signaling Mechanisms. *Front Neurosci.* 2013;7:108.
98. Gibson CL, Murphy SP. Progesterone Enhances Functional Recovery after Middle Cerebral Artery Occlusion in Male Mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(7):805–13.
99. Kumon Y, Kim SC, Tompkins P, Stevens A, Sakaki S, Loftus CM. Neuroprotective Effect of Postischemic Administration of Progesterone in Spontaneously Hypertensive Rats with Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neurosurgery.* 2000;92(5):848–952.
100. Morali G, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Montes P, Hernández-Morales L, Cervantes M. Post-Ischemic Administration of Progesterone in Rats Exerts Neuroprotective Effects on the Hippocampus. *Neuroscience Letters.* 2005;382(3):286–90.
101. Cervantes M, González-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. Neuroprotective Effects of Progesterone on Damage Elicited by Acute Global Cerebral Ischemia in Neurons of the Caudate Nucleus. *Archives of Medical Research.* 2002;33(1):6–14.
102. Zhu X, Fréchou M, Liere P, Zhang S, Pianos A, Fernandez N, et al. A Role of Endogenous Progesterone in Stroke Cerebroprotection Revealed by the Neural-Specific Deletion of Its Intracellular Receptors. *J Neurosci.* 2017;37(45):10998–1020.
103. Zhu X, Fréchou M, Schumacher M, Guennoun R. Cerebroprotection by Progesterone Following Ischemic Stroke: Multiple Effects and Role of the Neural Progesterone Receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2019;185:90–102.
104. Liu A, Margail I, Zhang S, Labombarda F, Coqueran B, Delespierre B, et al. Progesterone Receptors: A Key for Neuroprotection in Experimental Stroke. *Endocrinology.* 2012;153(8):3747–57.
105. Cai W, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L. Two Different Molecular Mechanisms Underlying Progesterone Neuroprotection Against Ischemic Brain Damage. *Neuropharmacology.* 2008;55(2):127–38.
106. Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, et al. Progesterone and Estrogen Regulate Alzheimer-Like Neuropathology in Female 3xTg-AD Mice. *Journal of Neuroscience.* 2007;27(48):13357–65.
107. Chen S, Wang JM, Irwin RW, Yao J, Liu L, Brinton RD. Allopregnanolone Promotes Regeneration and Reduces β -Amyloid Burden in a Preclinical Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e24293.
108. Wang T, Yao J, Chen S, Mao Z, Brinton RD. Allopregnanolone Reverses Bioenergetic Deficits in Female Triple Transgenic Alzheimer's Mouse Model. *Neurotherapeutics.* 2020;17(1):178–88.
109. Irwin RW, Brinton RD. Allopregnanolone as Regenerative Therapeutic for Alzheimer's Disease: Translational Development and Clinical Promise. *Progress in Neurobiology.* 2014;113:40–55.
110. Irwin RW, Wang JM, Chen S, Brinton RD. Neuroregenerative Mechanisms of Allopregnanolone in Alzheimer's Disease. *Front Endocrin.* 2012;3:117.
111. De Nicola AF, Garay LI, Meyer M, Guennoun R, Sitruk-Ware R, Schumacher M, et al. Neurosteroidogenesis and Progesterone Anti-Inflammatory/Neuroprotective Effects. *J Neuroendocrinol.* 2018;30(2):e12502.
112. Gonzalez Deniselle MC, Garay L, Gonzalez S, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Progesterone Restores Retrograde Labeling of Cervical Motoneurons in Wobbler mouse Motoneuron Disease. *Experimental Neurology.* 2005;195(2):518–23.
113. Labombarda F, Gonzalez S, Deniselle MCG, Garay L, Guennoun R, Schumacher M, et al. Progesterone Increases the Expression of Myelin Basic Protein and the Number of Cells Showing NG 2 Immunostaining in the Lesioned Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma.* 2006;23(2):181–92.
114. Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghoumari A, et al. Local Synthesis and Dual Actions of Progesterone in the Nervous System: Neuroprotection and Myelination. *Growth Hormone & IGF Research.* 2004;14:18–33.

115. Ye JN, Chen XS, Su L, Liu YL, Cai QY, Zhan XL, et al. Progesterone Alleviates Neural Behavioral Deficits and Demyelination with Reduced Degeneration of Oligodendroglial Cells in Cuprizone-Induced Mice. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54590.
116. El-Etr M, Rame M, Boucher C, Ghoumari AbdelM, Kumar N, Liere P, et al. Progesterone and Nestorone Promote Myelin Regeneration in Chronic Demyelinating Lesions of Corpus Callosum and Cerebral Cortex: Progesterone Receptor and Myelin Repair. *Glia*. 2015;63(1):104–17.
117. Aryanpour R, Pasbakhsh P, Zibara K, Namjoo Z, Beigi Boroujeni F, Shahbeigi S, et al. Progesterone Therapy Induces an M1 to M2 Switch In microglia Phenotype and Suppresses NLRP3 Inflammasome in a Cuprizone-Induced Demyelination Mouse Model. *International Immunopharmacology*. 2017;51:131–9.
118. Garay L, Gonzalez Deniselle MC, Sitruk-Ware R, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF. Efficacy of the Selective Progesterone Receptor Agonist Nestorone for Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*. 2014;276(1–2):89–97.
119. Noorbakhsh F, Baker GB, Power C. Allopregnanolone and Neuroinflammation: a Focus on Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2014;8.
120. Stein DG. Embracing failure: What the Phase III Progesterone Studies Can Teach About TBI Clinical Trials. *Brain Injury*. 2015;29(11):1259–72.

Uloga dehidroepiandrosterona u moždanoj ishemiji/reperfuziji

Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović

Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju,
VINČA Institut za nuklearne nauke – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu
Kontakt: marinazaric@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Moždana ishemija/reperfuzija (I/R), redukovan i ponovno uspostavljen protok krvi kroz mozak, predstavlja karakteristiku cerebro-vaskularnih oboljenja kao što su moždani udar i tranzitorni ishemijski atak. Izučavanje I/R na životinjskim modelima značajno je za razumevanje same patogeneze i potencijalnih terapeutika među kojima je svoje mesto našao i neurosteroid dehidroepiandrosteron (DHEA). DHEA može ostvarivati svoje neurobiološko dejstvo direktno vezivanjem za različite receptore ili indirektno putem metabolita ili intermedijera metaboličkog puta. Mnogobrojne studije su pokazale njegov neuroprotektivan učinak u različitim patologijama centralnog nervnog sistema među kojima je svoje mesto zauzela i moždana I/R. U ovom radu osvrnućemo se na direktno delovanje DHEA u tretmanu ishemičnih stanja pružajući uvid u različite efekte koji su do sada pokazani u životinjskim modelima I/R kao i potencijalni značaj u modernoj medicini.

Ključne reči: moždana ishemija/reperfuzija, dehidroepiandrosteron, neuroprotekcija, neurodegeneracija

Effect of dehydroepiandrosterone on cerebral ischemia/reperfusion

Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović

Department of Molecular Biology and Endocrinology,
VINČA Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia,
University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: marinazaric@vin.bg.ac.rs

Abstract

Cerebral ischemia/reperfusion (I/R), reduced and re-established blood flow through the brain, represents characteristic of cerebrovascular diseases such as stroke and transient ischemic attack. I/R animal models enable understanding the pathogenesis itself as well as potential therapeutics, among which the neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) has found its place. DHEA can exert its neurobiological action directly by binding to various receptors or indirectly through metabolites or metabolic pathway intermediates. Numerous studies have shown its neuroprotective effect in various pathologies of the central nervous system, among which the cerebral I/R has taken its place. In this paper, we will focus on the direct actions of DHEA in the treatment of ischemic conditions, providing insight into the various effects shown so far in animal I/R models as well as potential significance in modern medicine.

Keywords: cerebral ischemia/reperfusion, dehydroepiandrosterone, neuroprotection, neurodegeneration

MOŽDANA ISHEMIJA/REPERFUZIJA

Moždana ishemija/reperfuzija (I/R) nastaje usled smanjenja protoka krvi kroz mozak i njegovog ponovnog uspostavljanja. Uzroci nastanka I/R su mnogobrojni, a najčešće podrazumevaju suženje krvnog suda ili njegovo zakrčenje trombom ili embolusom. I/R se može javiti i kao posledica srčanog zastoja ili nepravilnosti rada srca, poremećaja disanja, nakon (zlo)upotrebe određenih lekova, hirurških intervencija, ali i kao sekundarna komplikacija drugih oboljenja [1, 2]. Moždana I/R predstavlja karakteristiku cerebro-vaskularnih oboljenja kao što su moždani udar (MU) i tranzitorni ishemijski atak (TIA).

Moždani udar osim visokog stepena mortaliteta, odgovoran je i za najveći stepen invaliditeta u odnosu na sve druge neurološke bolesti, te stoga predstavlja ne samo medicinski već i značajni socio-ekonomski problem [2]. Na osnovu uzroka nastanka moguće je izvršiti podelu na ishemijski moždani udar (IMU), koji nastaje usled okluzije krvnog suda trombom ili embolusom, i hemoragijski moždani udar (HMU), koji se može javiti u obliku unutar-moždanog ili krvarenja u likvorne prostore i dosta se ređe javlja u odnosu na IMU [2]. U zavisnosti od regiona koji je pogođen udarom, oba tipa MU karakterišu simptomi kao što su hemipareza, gubitak senzibiliteta, prostorni neglekt, homonimna hemianopsija, poremećaj konjugovanog pogleda, ataksija, dizartrijska, disfagija i drugi [3].

Tranzitorni ishemijski atak predstavlja kratku epizodu neurološke disfunkcije uzrokovane fokalnom ishemijom mozga, kičmene moždine ili retine, nakon koje se neuro-vizuelizacionim metodama ne detektuje prisustvo akutnog infarkta u mozgu [4]. Takođe, kod pacijenata sa okluzijom jedne ili obe zajedničke karotidne arterije može doći do pojave TIA [5, 6]. Uobičajeno simptomi traju vrlo kratko, najčešće do 15 min, i podrazumevaju slabost ekstremiteta na jednoj strani tela, senzorne deficite, vizuelne i govorne smetnje, nestabilnost i poteškoće u hodu [7]. Dodatno, klinička slika može biti praćena padom kognitivnih funkcija i/ili atrofijom mozga što može ukazati na trajno oštećenje [8]. U većini slučajeva TIA nastupa naglo, uglavnom bez provokacija, vrlo često prethodi IMU i povećava rizik od nastanka novog napada, ili niza istih [9].

Životinjski modeli moždane ishemije/(reperfuzije)

Izučavanje moždane I/R na životinjskim modelima značajno je za razumevanje njihove patogeneze i potencijalnih terapeutika. Kao životinjski modeli moždane I/R najčešće se koriste inbredovani sojevi pacova, s obzirom na anatomske i fiziološke sličnosti sa čovekom, veliku genetičku homogenost unutar određenog soja, laku eksperimentalnu manipulaciju i ekonomičnost u finansijskom pogledu [10, 11]. Eksperimentalni dizajn koji podrazumeva opstrukciju krvnog suda/ sudova bez ponovnog uspostavljanja moždane cirkulacije (izostanak reperfuzije povrede) predstavlja hroničnu hipoperfuziju, koja je karakteristika prirodnog procesa starenja, ali može biti i jedan od uzročnika neuropatoloških stanja, kao što su različiti tipovi demencija i Alchajmerova bolest. Ukoliko se nakon okluzije krvnog suda/sudova posle određenog vremenskog perioda dopusti uspostavljanje krvotoka dolazi do pojave reperfuzije povrede. Ovakvi I/R modeli koriste se za proučavanje stanja kao što su privremeni zastoj srca, MU, TIA i drugi [12]. Stoga, u zavisnosti od cilja istraživanja, životinjski modeli ishemije mogu biti trajni (hronična hipoperfuzija određene razmere) ili privremeni („pravi“ — I/R modeli).

Fokalna moždana ishemija/(reperfuzija) i životinjski modeli

Fokalna moždana ishemija nastaje usled drastičnog smanjenja protoka krvi u određenom regionu mozga i obično se javlja kao posledica začepljenja moždanih krvnih sudova često izazivajući nastanak MU ili TIA. U tkivu zahvaćenom fokalnom moždanom ishemijom uočavaju se dva regiona - ishemijsko jezgro i

region oko njega označen kao senka (lat. *penumbra*). Jezgro je region direktno pogođen ishemijom i predstavlja centar oštećenja, dok region senke biva posredno zahvaćen ishemijom, te u njemu promene nisu tako drastične kao u samom jezgru. U ovoj oblasti ćelije nemaju sposobnost provođenja akcionog potencijala, ali su i dalje metabolički aktivne i vijabilne. One u narednim satima primaju štetne signale iz mrtvih ćelija jezgra i ukoliko pro-apoptotski signali preovladaju, ove ćelije nestaju za nekoliko dana programiranim tipom ćelijske smrti, kao što su apoptoza i autofagocitoza [13], što dodatno pogoršava oštećenje izazvano ishemijom kao i klinički ishod [14, 15].

Najveći broj studija fokalne moždane ishemije koristi model okluzije srednje moždane arterije (engl. *middle cerebral artery occlusion*- MCAO) koja se može postići uvođenjem monofilamenta [11, 16], elektro-kauterizacijom ili fotohemijom primenom fotosenzitivne boje koja pobuđena laserom oštećuje endotelne ćelije i dovodi do agregacije trombocita i formiranja tromba [11, 17]. Za ispitivanje potencijalnih trombolitika koriste se životinjski modeli kod kojih se fokalna ishemija postiže ubacivanjem krvnog ugruška ili specifične supstance/mikrosfere direktno u krvni sud [11, 17]. Još jedan od modela podrazumeva stereotaktički navođeno injiciranje endotelina-1 koji poseduje potentno vazokonstriktivno dejstvo, te se na minimalno invazivni način postiže okluzija ciljanog krvnog suda [17]. Postavljanje hiruških mini- klipsi na željeni krvni sud može poslužiti kao još jedna od tehnika za kreiranje fokalne I/R [18, 19].

Potpuna/nepotpuna globalna ishemija/(reperfuzija) i životinjski modeli

Do stanja potpune globalne moždane ishemije kod ljudi dolazi prilikom potpunog zastoja u radu srca ili prilikom fizičkog stezanja vrata te stoga postoji mali broj modela koji simuliraju ovo stanje. Ranije primenjivani modeli potpune globalne ishemije kao što su dekapitacija [20] i mehaničko stezanje vrata [21] se iz etičkih razloga danas ne upotrebljavaju. Jedan od načina za uspešno uspostavljanje stanja kompletne globalne ishemije predstavlja ventrikularna fibrilacija pri čemu se uglavnom koriste veći sisari, dok se pacovi i miševi retko koriste [22]. Najkorišćeniji model za izučavanja potpune globalne moždane ishemije je takozvani 4-VO (engl. *four-vessel occlusion*) model koji podrazumeva okluziju leve i desne zajedničke karotidne arterije i obe vertebralne arterije [23]. Nakon 4-VO modela, osmišljen je 2-VO (engl. *two-vessel occlusion*) model u kome eksperimentalna životinja biva podvrgnuta okluziji obe zajedničke karotidne arterije dok vertebralne arterije ostaju intaktne, te se na njemu može proučavati nekompletna globalna ishemija [24-26]. Opstrukcija karotidnih arterija se može postići podvezivanjem ili elektro-kauterizacijom [11, 19].

Molekulske promene koje karakterišu moždanu I/R – ishemično oštećenje i reperfuziona povreda

Prilikom smanjenja moždane cirkulacije dolazi do različitih ishemičnih promena u moždanom tkivu, koje mogu biti praćene smrću neurona ukoliko je prisutna izraženija redukcija protoka krvi odnosno duže trajanje ishemije [27]. Faza ishemije nije jedini, a ni najvažniji faktor koji uzrokuje oštećenje moždanog tkiva. Iako uspostavljanje protoka krvi omogućava ponovno snabdevanje hranljivim materijama i kiseonikom, ono može dovesti i do „reperfuzione povrede“ koja značajno doprinosi oštećenju [28, 29]. Kao posledica dva navedena procesa javljaju se patofiziološke promene u ćelijama kao što su: smanjena proizvodnja adenozin trifosfata (ATP) [28]; povećanje unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} [30, 31]; formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i azota (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), praćeno pojavom oksidativnog i nitrozativnog stresa [32]; zapaljenski procesi [33]; modulacija sastava i funkcije receptora [34]; neurotoksičnost posredovana glutamatom i dopaminom [31]; modulacija pro-/anti- apoptotskih proteina i narušena funkcija mitohondrija [35]. Neki od najznačajnijih navedenih procesa će u nastavku biti detaljnije opisani.

Reaktivne oksidativne vrste i lipidna peroksidacija kao uzrok oštećenja tokom i nakon moždane ishemije/reperfuzije

U fiziološkim uslovima kada su koncentracije niske, ROS imaju značajnu ulogu u regulaciji funkcije imunskog sistema i održavanju redoks homeostaze, te predstavljaju neizostavne komponente i sekundarne glasnike mnogih signalnih puteva [36]. Kada koncentracija ROS u moždanom tkivu poraste iznad fiziološke vrednosti, uklanjanje prekomerno proizvedenih vrsta ključno je za održavanje homeostaze i sprečavanje oksidativnih oštećenja u ćeliji. Optimalan nivo ROS održavaju superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx), katalaza i drugi antioksidativni enzimi (AOE), štiteći tako moždano tkivo od oštećenja [37, 38]. Tokom i nakon I/R (posebno tokom faze reperfuzije), proizvodnja ROS značajno se povećava, te komponente antioksidativne zaštite postaju kompromitovane i AOE ne uspevaju da neutrališu nastale ROS [37]. U ishemijskoj fazi, ROS se uglavnom proizvode u mitohondrijama, usled narušavanja njihove aktivnosti i funkcije [39]. U fazi reperfuzije imunske ćelije stižu u region pogođen povredom, te dolazi do pokretanja neuroinflammatornog odgovora, aktivacije NADPH oksidaze i reakcije oksidativnog praska što dodatno doprinosi stvaranju ROS [37, 40].

Dobro je poznato da oksidativni stres može da aktivira apoptotsku signalnu kaskadu, kao i da uzrokuje strukturne promene proteina i lipidnu peroksidaciju [41, 42] utičući time na različite signalne puteve u ćeliji. ROS može učestvovati u pokretanju ćelijske smrti izazvanjem oštećenja na molekulu DNK [43], aktiviranjem proteina p53 što rezultuje otvaranjem mitohondrijskih pora i potonjim kolapsom [44, 45]. ROS takođe utiču na otpuštanje citohroma C iz mitohondrija i aktivaciju nishodnih kaspaza [44].

Oksidativna oštećenja i modulacija biomolekula mogu direktno uticati na regulaciju različitih signalnih puteva [37, 46, 47]. Izuzetno je značajno naglasiti da oksidativni stres dovodi do značajnih promena u propustljivosti membrane, transportu jona i funkciji organela procesom lipidne peroksidacije [48]. Povećanje štetnih proizvoda lipidne peroksidacije, kao i promene sistema redukovani/oksidovani glutation (GSH, GSSG) predstavljaju značajne faktore oštećenja prilikom I/R [37, 49]. Tokom I/R koncentracija slobodnih masnih kiselina, pre svega arahidonske kiseline, značajno se povećava. Fosfolipaze A2 i C, aktivirane povećanjem Ca^{2+} , hidrolizuju fosfolipide, dok resinteza istih zahteva očuvan energetske status, odnosno prisustvo ATP. Stoga, povećanje unutarćelijskog Ca^{2+} i poremećen energetske status, podstiču nastanak slobodnih masnih kiselina i oštećenje membrane [50]. Dodatno, usled narušenog oksidativnog statusa dolazi do povećanog formiranja ROS koji reaguju sa nezasićenim masnim kiselinama proizvodeći alkil radikal, koji može formirati peroksil radikal čijom se redukcijom dalje formiraju lipidni hidroperoksidi i drugi alkil radikali i propagira ciklus lipidne peroksidacije. Pored navedenih direktnih štetnih delovanja, krajnji proizvodi lipidne peroksidacije poput malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala i akroleina mogu uzrokovati disfunkciju proteina vezivanjem za tiolne grupe kao i smanjenje GSH kroz reakciju sa GPx i glutation S-transferazom (GST), proizvodeći na taj način još ozbiljnija oštećenja [37]. Postishemični pad nivoa GSH i smanjena aktivnost GPx i GR su dobro okarakterisani u mnogobrojnim studijama [32, 37].

Uloga reaktivnih nitrozativnih vrsta u molekulskim promenama koje karakterišu moždanu ishemiju/ reperfuziju – efekat azot oksida

U fiziološkim uslovima, NO reguliše niz parametara neophodnih za održavanje homeostaze centralnog nervnog sistema (CNS) kao što su protok krvi i tonus krvnih sudova, neurotransmisija, sinaptička plastičnost i sinaptogeneza [47, 51]. Tokom I/R nivo NO raste, a uloga koju tom prilikom ostvaruje može biti dvojaka, u zavisnosti od količine NO u tkivu, izoforme enzima koji je uključen u njegovu sintezu i trenutnog mikrokruženja. U mozgu pacova i čoveka, NO nastaje reakcijom hidroksilacije L-arginina u prisustvu ki-

seonika, gde funkciju katalizatora mogu vršiti tri tipa enzima: neuronalne azot oksid sintaze (engl. *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS), endotelne azot oksid sintaze (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) i inducibilne azot oksid sintaze (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) [52]. Generalno, NO nastao delovanjem eNOS uglavnom je označen kao neuroprotektivan, dok nNOS i iNOS ostvaruju neurotoksičan efekat kako u ranoj tako i u kasnoj fazi I/R [53]. Povećan nivo NO direktno inhibira kompleks IV (citohrom C oksidaza) mitohondrijskog respiratornog lanca ugrožavajući proces oksidativne fosforilacije i vijabilnost ćelije [54]. Tokom i nakon I/R dolazi do pokretanja neuroinflamacije i naglog skoka NO što dovodi do aktivacije metaloproteinaza vanćelijskog matriksa koje vrše isecanje različitih komponenti matriksa kompromitujući strukturu i stabilnost krvno-moždane barijere (KMB) [55]. NO takođe utiče na aktivaciju ciklooksigenaze-2 i povećanje produkcije prostaglandina E2 povećavajući na taj način neuroinflamatorni odgovor tokom I/R [56]. Dodatno, NO dovodi do nitrozilacije proteina ćelije i narušavanja njihove biološke funkcije. NO služi kao izvor niza RNS prevashodno peroksinitrita (ONOO^-), azot (IV)-oksida (NO_2) i azot (III)-oksida (N_2O_3) te dovodi do nastanka nitrozivnog stresa [57]. RNS mogu izazvati slična oštećenja kao i povećan nivo NO, a to su: nitracija i nitrozilacija proteina praćena gubitkom biološke funkcije, oštećenja na molekulu DNK, narušavanje KMB, povećanje lipidne peroksidacije, inhibicija kompleksa mitohondrijskog respiratornog lanca i drugo [37].

Signalni put NMDA receptorskog kompleksa u moždanoj ishemiji/reperfuziji

Ograničeni protok krvi tokom faze ishemije dovodi i do narušavanja jonske homeostaze [58] što rezultuje depolarizacijom neurona usled čega dolazi do povećanog oslobađanja ekscitatornih neurotransmitera (prevashodno glutamata) u sinaptički prostor. Istovremeno, gubitak energije izazvan ishemijom narušava funkciju transportera za preuzimanje glutamata, te dolazi do preteranog nakupljanja glutamata u sinaptičkoj pukotini i prekomerne aktivacije glutamatnih receptora na postsinaptičkim neuronima [31]. Do danas su okarakterisane tri tipa jonotropnih receptora za glutamat i imenovana prema nazivima sintetičkih agonista pomoću kojih su otkriveni: a) receptori osetljivi na N-metil-D-aspartatsku kiselinu (NMDARs); b) receptori osetljivi na α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionsku kiselinu (AMPArs); c) receptori osetljivi na kainičnu kiselinu. NMDARs predstavljaju podklasu jonotropnih glutamatnih receptora neophodnih za održavanje niza neuroloških funkcija, uključujući sinaptičku plastičnost, formiranje memorijskih zapisa, pravilan razvoj mozga i preživljavanje neurona u fiziološkim uslovima. Funkcionalni NMDARs su heterotetramerni kompleksi sačinjeni od dve konstitutivno ekspimirane NR1 i najmanje jedne subjedinice tipa NR2 (A-D) ili NR3 (A-B) [59]. Signalni kompleks sačinjen od NR2B subjedinice NMDARs, post-sinaptičkog proteina 95 (engl. *postsynaptic density protein 95*, PSD-95) i nNOS predstavlja jedan od najranije okarakterisanih signalnih kompleksa koji učestvuju u oštećenju i smrti neurona tokom i nakon I/R [19, 30]. PSD-95 je sinaptički protein koji ukotvljava i stabilizuje NMDARs u membrani i privlači različite signalne molekule u neposrednu blizinu unutarćelijske pore kanala receptora. PSD-95 pomoću svojih protein vezujućih domena omogućava dopremanje nNOS u blizinu pore kanala NMDARs i njegovo izlaganje ulaznoj struji Ca^{2+} . Koncentracija Ca^{2+} i blizina kompleksa Ca^{2+} /kalmodulin dovode do konformacione promene nNOS čime se postiže uklanjanje autoinhibitornog elementa i aktivacija enzima. nNOS dalje učestvuje u signalnoj transdukciji posredno preko produkcije NO ili neposredno ostvarujući fizičku interakciju sa drugim adapterskim proteinom CAPON (engl. *C-Terminal PDZ Domain Ligand Of Neuronal Nitric Oxide Synthase*) koji se vezuje za protein GTPazu Dexas1 (engl. *dexamethasone-induced Ras-related protein 1*) i omogućava njenu aktivaciju. Literaturni podaci pokazuju da aktivacija kompleksa nNOS/CAPON/Dexas 1 ima značajnu ulogu u NMDARs posredovanoj neurotoksičnosti i oštećenju ćelija [52, 53].

Značaj odnosa pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije u moždanoj ishemiji/reperfuziji

Apoptoza ili „programirana ćelijska smrt“ je proces kojim se uz aktivni utrošak energije i sintezu specifičnih proteina pokreće smrt ćelije kao sastavni deo fizioloških procesa ili kao odgovor na određena patološka stanja [60]. Razlikuju se dva signalna puta pokretanja apoptoze - spoljašnji i unutrašnji. Spoljašnji put se pokreće vezivanjem specifičnih vanćelijskih liganda za receptore smrti, dok se unutrašnji put aktivira unutarćelijskim signalima. Bez obzira na poreklo signala, pro-apoptotski signalni put dovodi do aktivacije proteolitičkih enzima kaspaza koji katalizuju isecanje i uništavanje velikog broja različitih proteina u ćeliji [61].

Unutrašnji „mitohondrijski put“ može biti pokrenut delovanjem različitih faktora poput radijacije, hipoksije, hipertermije, infekcije, hiperprodukcije ROS/RNS, kao i gubitkom faktora koji sprečavaju procese apoptoze [62]. Ovaj signalni put označen je kao „Bcl-2 kontrolisani put“ jer se njegova regulacija odvija posredstvom članova porodice proteina Bcl-2. Odnos pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije u mitohondrijama i njihovoj neposrednoj blizini određuje sudbinu ćelije [45, 63]. U odgovoru na pro-apoptotske signale anti-apoptotski protein Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) sprečava pokretanje apoptoze regulisanjem oslobađanja citohroma C i drugih proteina iz mitohondrija tako što: a) sprečava premeštanje proteina Bax (engl. *Bcl-2-associated protein X*) i drugih pro-apoptotskih molekula iz citosola; b) sprečava Bax (engl. *Bcl-2-associated protein X*) / Bak (engl. *Bcl-2 homologous antagonist killer*) oligomerizaciju u MM; c) favorizuje zatvaranje prolazne mitohondrijske pore. Promena odnosa Bax/Bcl-2 u blizini MM u korist pro-apoptotskog Bax može dalje rezultovati propagacijom apoptotske signalne kaskade koja uključuje formiranje kompleksa apoptozoma i aktivaciju efektorskih kaspaza, kao i DNK endonukleaza koje vrše fragmentaciju DNK molekula i njegova nepovratna oštećenja. Promene nivoa Bax i Bcl-2, kao i povećan odnos Bax/Bcl-2 pokazani su u brojnim studijama na životinjskim I/R modelima [61].

Potencijal mitohondrijske membrane i moždana ishemija/reperfuzija

Membranski potencijal mitohondrija (MPM) nastaje i održava se radom protonskih pumpi (kompleksi I, III i IV) koje ulaze u sastav mitohondrijskog respiratornog lanca. MPM održava se relativno stabilnim budući da je neophodan za očuvanje energetske homeostaze i preživljavanje ćelije, a dugotrajne promene dovode do gubitka vijabilnosti ćelije i leže u osnovi mnogih oboljenja [64]. Promene MPM okarakterisane su u određenim modelima I/R, gde finalnom gubitku funkcionalnosti mitohondrija prethode faze depolarizacije (ishemija) i hiperpolarizacije (reperfuzija) [29, 65].

Neuroinflamacija tokom moždane ishemije/reperfuzije

Ranu fazu neuroinflamacije nakon moždane I/R, u zavisnosti od stepena ishemije odnosno reperfuzije, najčešće odlikuje aktivacija mikroglije i astrocita. Ovaj proces rezultuje stvaranjem glijalnog ožiljka koji može imati protektivnu ali i štetnu ulogu, sprečavajući reparaciju i regeneraciju moždanog tkiva nakon traume. Ovu fazu prati narušavanje strukturnog i funkcionalnog integriteta KMB i migracija leukocita sa periferije u oštećeni region mozga.

Mikroglija i astrociti

Mikroglijske ćelije predstavljaju rezidentne imunokompetentne makrofage koji obavljaju ulogu svojeg „kućepazitelja“ u CNS omogućavajući kontrolu mikrosredine i uklanjanje metaboličkih produkata [66]. Ove ćelije interaguju sa umirućim neuronima u ishemičnom jezgri i na taj način ih „obeležavaju“ za fagocitozu. Aktivirana mikroglija takođe sekretuje pro-inflamatorne supstance kao što su faktor nekroze tu-

mora α (eng. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), NO, različite ROS, ali i anti-apoptotske protektivne molekule poput transformišućeg faktora rasta β 1 (eng. *transforming growth factor β 1*, TGF β 1), neurotrofičkog faktora poreklom iz mozga (eng. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) i insulinu- sličnog faktora rasta 1 (eng. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1) [15, 67].

Pored ćelija mikroglije, tokom i nakon I/R se takođe aktiviraju i astrociti oslobađajući različite citokine, hemokine i NO [68]. U mozgu odraslog čoveka gotovo 40% od ukupnog broja svih ćelija čine astrociti koji obavljaju širok spektar kompleksnih fizioloških funkcija unutar CNS tako što obezbeđuju strukturnu podršku nervnim ćelijama, čine okruženje neurona, oslobađaju različite faktora rasta i pomažu u održavanju KMB [69].

Migracija leukocita

Nekoliko sati nakon nastupanja ishemije, leukociti bivaju privučeni hemokinima produkovanim u ishemičnom regionu mozga i dospevaju u ekstravaskularna mesta infekcije vezujući se za adezivne molekule na endotelu. Migracija leukocita iz krvi predstavlja višefazni proces koji se sastoji od početnog slabog vezivanja za endotelne ćelije, čvrste adhezije i transmigracije kroz endotel krvnih sudova. Ukratko, citokini, prevashodno TNF- α i IL-1, deluju na endotelne ćelije malih krvnih sudova u ishemičnom regionu i stimulišu ih da brzo eksprimiraju adezivne molekule E i P selektin za koje se vezuju cirkulišući leukociti. Strujanje krvi kroz krvni sud raskida te veze, te se one kontinuirano uspostavljaju nishodno što se označava kao „kontroliranje“ leukocita po površini endotela. Za čvrsto vezivanje i zaustavljanje leukocita na krvnom sudu tj. transmigraciju iz lumena do ishemičnog regiona neophodni su hemokini, produkovani od strane mikroglije i endotela pod uticajem TNF- α i IL-1, kao i ekspresija β 2 integrina na površini leukocita. Na samom kraju ovog procesa citoskelet leukocita se izdužuje po površini endotela, a hemokini dodatno stimulišu njihovu pokretljivost i transmigraciju [70]. Infiltrirani leukociti oslobađaju citokine, hemokine, proteaze i ROS uzrokujući dalje oštećenje okolnog tkiva [71].

Uloga T limfocita u neuroinflamaciji tokom ishemije

U akutnoj fazi I/R, naivni T limfociti luče interferon γ (IFN- γ) i učestvuju u produkciji ROS. T limfociti mogu imati i neuroprotektivnu ulogu budući da oštećeni neuroni, mikroglija i makrofagi lučeći TGF- β promovišu razvoj regulatornih T limfocita koji oslobađajući interleukin-10 (IL-10) imaju pozitivan učinak u oporavku moždanog tkiva nakon ishemije. Iako se sa sigurnošću ne može tvrditi koja je i kolika uloga adaptivne imunosti u kliničkoj slici koja prati I/R, postoje podaci koji govore u prilog nastanka autoreaktivnih CD 4⁺ i CD 8⁺ ćelija nakon MU [72], što bi takođe moglo objasniti smrt neurona koja se dešava mnogo posle akutne faze MU.

Završna faza neuroinflamacije i reparacija tkiva nakon ishemije/reperfuzije

Ovu fazu pre svega karakteriše otklanjanje neurona koji su podlegli ćelijskoj smrti. Mikroglija ima dominantnu ulogu u uklanjanju degenerisanih neurona koji oslobađaju takozvane „pronađi me“ signalne molekule kao što su ATP i uridin trifosfat (UTP) i „pojedi me“ signale kao što su uridin difosfat (UDP) i translokacija fosfatidil serina sa unutrašnjeg na spoljašnji monosloj ćelijske membrane. Tokom fagocitoze, mikroglija proizvodi IL-10 i TGF- β koji inhibiraju dalju inflamatornu kaskadu tako što suprimiraju prezentaciju antigena od strane dendritskih ćelija i aktiviraju regulatorne T ćelije koje vraćaju sistem u homeostazu. Finalnu strukturu glijalnog ožiljnog tkiva predominantno čine astrociti koji se dele i polako migriraju na mesto povrede gde popunjavaju upražnjen prostor [15, 55].

DEHIDROEPIANDROSTERON

Dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfatni estar dehidroepiandrosteron - sulfat (DHEAS) predstavljaju najzastupljenije steroidne hormone u ljudskom organizmu [73]. Nakon rođenja, nivo DHEA(S) opada i ostaje nizak sve do ulaska u pubertet nakon čega se aktivno sintetiše iz holesterola nizom biohemijskih reakcija i izlučuje iz retikularne zone kore nadbubrega, te nivo hormona počinje da raste naglo u cirkulaciji [74, 75]. Koncentracija u cirkulaciji je najviša u dvadesetim godinama, nakon čega postepeno opada kod oba pola, a između 65.-te do 70.-te godine života ove koncentracije postaju najmanje i iznose oko 20% maksimalne koncentracije u mladosti [73].

DHEA i DHEAS su među najranije indentifikovanim neurosteroidima u mozgu pacova [76, 77]. Naime, 80'tih godina prošlog veka pokazana je veća koncentracija DHEA(S) u mozgu nego u plazmi, čak i nakon adenalektomije i gonadektomije kod pacova [76, 77]. Ovi rezultati ukazali su da se DHEA(S) sintetiše ne samo na periferiji, već i u CNS. *De novo* sinteza DHEA opisana je u mozgu pacova, žaba [78] i čoveka [79] i to prevashodno u astrocitima i oligodendrocitima [80].

Mehanizam delovanja dehidroepiandrosterona

Efekat dehidroepiandrosterona na jedarne receptore

Steroidni hormoni regulišu transkripciju gena vezivanjem za specifične receptore lokalizovane u citoplazmi koji se zatim premeštaju u jedro, ili pak stupaju u direktnu interakciju sa jedarnim receptorima i/ili sekvencama na molekulu DNK koje sadrže odgovarajuća vezujuća mesta. Do danas, međutim, nije okarakterisan nijedan specifični jedarni receptor koji poseduje visok afinitet za vezivanje DHEA ili DHEAS [81, 82]. DHEA može funkcionisati kao nespecifični ligand većeg broja jedarnih receptora za koje se vezuje sa znatno nižim afinitetom u odnosu na specifične ligande. Do sada je pokazano da se DHEA i/ili DHEAS vezuju za: a) jedarne receptore klase I (receptori za steroidne hormone): androgeni receptori, estradiolski receptori α i β ; b) jedarne receptore klase II tj. receptore koji dimerizuju sa retinoid X receptorom: PPAR α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor α*), konstitutivni receptor za androstan, pregnanski receptor X [73, 83]. Pored navedenog neposrednog delovanja, DHEA se može konvertovati u steroide koji imaju veći afinitet za vezivanje za jedarne receptore (npr. 7 α -hidroksi-DHEA, testosteron i estradiol), te time može posredno uticati na aktivaciju nekoliko različitih receptora u jedru [84, 85].

Efekat dehidroepiandrosterona na receptore u mozgu

DHEA(S) modulišu aktivnost nekoliko receptora za neurotransmitere delujući kao: 1) nekompetitivni antagonisti GABA receptora tipa A (engl. *γ -aminobutyric acid receptor type A*), pri čemu DHEAS ispoljava jači antagonistički efekat [86-89]; 2) pozitivni alosterični modulatori NMDARs [90, 91] gde DHEA(S) povećava aktivaciju posredno delovanjem na sigma 1 receptor (σ 1R); 3) agonisti σ 1R [73, 80]. Osim navedenog, potvrđeno je da se DHEA vezuje jačim afinitetom za citoskeletni protein MAP2C (engl. *microtubule-associated protein 2C*), koji se u mozgu eksprimira samo tokom razvika, osim u mirisnoj kvržici i mrežnjači u kojima se eksprimira tokom celog života [92]. DHEA se takođe vezuje za nespecifična receptorska mesta na endotelnim ćelijama koja su povezana sa aktivnošću eNOS [93].

Neurobiološki efekti dehidroepiandrosterona

Neurobiološki efekti DHEA i njegovog suflata mogu se ostvariti direktno ili indirektno putem metabolita ili intermedijera produkovanih tokom njihove biosinteze [73, 83]. Pored toga što su direktna delovanja

ona koja su od većeg značaja za fiziološke i patofiziološke mehanizme, potencijalni indirektni efekti su mnogobrojni i prožimaju skoro sve ćelijske nivoe, te će u ovom radu biti reči samo o direktnom uticaju DHEA.

Najznačajniji i najbolje opisani efekti DHEA su oni koji govore u prilog neuroprotekcije [73]. Neuroprotektivni učinak pokazan je u modelima različitih patoloških stanja, kao što su moždana ishemija *in vivo* [94, 95] i *in vitro* [96, 97], neurotoksičnost posredovana NMDARs [97-99], povreda kičmene moždine kod miševa [100] i drugi. Opisan je blagotvoran efekat DHEA(S) na rast i razvoj neurita, kao i preživljavanje neurona i neurogenezu [101-103]. Dodatno, zabeležen je anti-oksidativni [104-106], anti-inflamatorni [107, 108] i anti-glukokortikoidni učinak egzogeno primenjenog DHEA(S) [98, 101, 107, 109], kao i efekat na sintezu i sekreciju kateholamina [16, 110, 111].

Prekliničke i kliničke studije pokazale su da suplementacija DHEA može biti potencijalno korisna u terapiji depresije, anksioznosti i drugih psihijatrijskih stanja, budući da postoje dokazi o promenjenim nivoima endogenog DHEA(S) u mozgu pacijanata koji boluju od depresije, šizofrenije, post-traumatskog stresnog poremećaja, kao i kod promena raspoloženja i kognicije zdravih pojedinaca [73].

Važno je naglasiti da efekat DHEA(S) može varirati u zavisnosti od vremena primene, doze i prisustva drugih faktora (egzogenih tretmana, intoksikacije) [73]. U skladu sa ovim, neke od studija pokazale su efekat DHEA(S) isključivo u patološkim stanjima, ali ne i fiziološkim. U *in vivo* studiji, Zarić i saradnici pokazali su da akutni tretman DHEA u fiziološkim uslovima ne dovodi do senzo-motornih promena niti alteracija strukture tkiva i morfologije neurona u hipokampusu i prečenoj kori pacova [18]. Takođe, *in vitro* neuroprotektivni učinak okarakterisan je u nekoliko studija isključivo nakon fizičkih/hemijskih povreda ili neurotoksikacije, dok u fiziološkim uslovima nije primećen nikakav efekat ili je češće dolazilo do pojave neurotoksičnosti [73]. Neurotoksičnost DHEA opisana je i u kulturi hipokampalnih neurona, pri čemu je ista doza DHEA primenjena zajedno sa kortikosteronom pokazala neuroprotektivan efekat na štetne promene izazvane ovim glukokortikoidom (23). Što se tiče visokih suprafizioloških doza DHEA, pokazano je da one mogu inhibirati kompleks I mitohondrijskog respiratornog lanca kako *in vitro* tako i *in vivo* [73, 112]. Naime, narušena respiracija u mitohodrijama pokazana je u nekoliko različitih kultura neurona (primarna kultura kortikalnih, mezencefaličnih i cerebelarnih granularnih neurona) gde je tretman visokom dozom DHEA rezultovao povećanom potrošnjom glukoze i smrti ćelija u kulturi. Dodatno, *in vivo* eksperimenti na miševima tretiranim sa 0.6% DHEA dodatim u hranu tokom 3 meseca pokazali su gubitak neurona u moždanoj kori i hipokampusu kao i poremećaj motornih sposobnosti [112]. Takođe, istraživanja u kulturi mišjih neurona i humanog neuroblastoma govore u prilog smanjenja vijabilnosti ćelija nakon tretmana DHEA [113]. *In vivo* i *in vitro* studije pokazale su da, u zavisnosti od vremena primene, DHEA može ostvariti neurotrofički i neuroprotektivni efekat putem blokade NMDARs posredovane neurotoksičnosti [98, 99]. Na primer, kotretman N-metil-D-aspartatom (NMDA) i DHEA u primarnoj kulturi hipokampalnih neurona pokazao je neuroprotektivne efekte DHEA dok predtretman ovim steroidom ili njegova primena 24h nakon NMDA nisu imali nikakav efekat na NMDA posredovanu neurotoksičnost [99]. Akutni tretman DHEA je u ovom slučaju delovao neuroprotektivno putem smanjenja prekomerne aktivnosti NOS i produkcije NO koja je posredovana aktivacijom NMDARs [99].

Dehidroepiandrosteron i moždana ishemija/reperfuzija

Iako je efekat DHEA opisan u različitim patologijama, *in vitro* i *in vivo* studije koje se odnose na moždanu I/R nisu tako brojne. Pokazano je da predtretman DHEA(S) ima uticaja na preživljavanje neurona moždane kore pacova ukoliko su odgajani u uslovima anoksije [96], kao i na smanjenje oštećenja hipokampusu pacova izloženih I/R [95]. Sa druge strane, jednokratna primena DHEA kao predtretmana u *in vivo* modelu I/R

rezultovala je većim stepenom smrti neurona i pogoršanjem kognitivnih sposobnosti. Interesantno je da se ovakav efekat uočavao i ukoliko se tretman primeni neposredno nakon uspostavljanja I/R, dok je u vremenskom okviru od 3 do 48 sati nakon I/R, primećeno smanjenje smrti neurona i poboljšanje kognitivnog deficita nastalog usled I/R [114].

Sa druge strane, Zarić i saradnici (2019) u svojoj studiji navode da treba razmotriti ranije prijavljeni neuroprotektivni efekat DHEA budući da je njegova primena 4 sata nakon 15 min ishemije/24 h reperfuzije kod mužjaka pacova ukazala na potencijalno pokretanje pro-apoptotskih događaja u hipokampusu. Naime, u ovom istraživanju je kod ishemičnih životinja tretiranih DHEA (20 mg/kg) pokazano povećanje pro-apoptotskog odnosa Bax/Bcl-2 i narušavanje MPM u hipokampusu koje nije uočeno u netretiranoj ishemičnoj grupi ukazujući na potencijalno štetan efekat tretmana u ishemičnim uslovima. Ista grupa pokazala je da u ishemičnom stanju DHEA može ostvariti diskretne region-specifične efekte vraćajući nivo proteina PSD-95 u hipokampusu i NR1 subjedinice NMDARs u prečenoj kori na kontrolnu vrednost. Dodatno, autori prijavljuju i da je tretman DHEA vratio post-ishemični povećani nivo NO na kontrolnu vrednost u moždanoj kori, dok je ovaj efekat izostao u hipokampusu gde je nivo NO i proteinska ekspresija nNOS ostala povećana i nakon tretmana DHEA [18].

Pored važnosti odabira adekvatne vremenske tačke, pokazan je i značaj primenjene doze DHEA. Li i saradnici (2009) ukazali su da predtretman viskom dozom DHEA redukuje oštećenja hipokampusa pacova koja nastaju usled 10 min I/R, dok taj efekat izostaje korišćenjem nižih koncentracija [114]. Iako je zabeležena neuroprotekcija blaga, autori sugerišu potencijalno korišćenje suplementacije DHEA u terapiji MU. Dozozavisni neuroprotektivni efekat DHEA na smrt neurona i kognitivni deficit koji nastaje usled moždane ishemije pokazali su i Yabuki i saradnici (2015) [115]. U drugoj studiji pokazan je protektivni efekat DHEA na promene oksidativnog statusa nakon I/R kod dijabetičnih pacova. U ovom istraživanju normoglikemijski, i pacovi tretirani streptozotocinom u cilju izazivanja dijabetičnog stanja, bili su podvrgnuti bilateralnoj okluziji karotidnih arterija (I=30 min, R=60 min), te su potom bili tretirani DHEA tokom 7, 14 ili 21 dan. Rezultati studije pokazali su da je primenjena I/R povećala nivoe ROS i pogoršala sinaptičku funkciju utičući na membransku aktivnost Na/K-ATPaze i oslobađanje laktat dehidrogenaze kod svih grupa životinja. Budući da hronična hiperglikemija sama po sebi dovodi do disbalansa oksidativnog statusa u tkivu, post-ishemični disbalans oksidativnog statusa je bio većeg obima kod dijabetičnih pacova nego kod normoglikemijske grupe nakon primenjene I/R. Tretman DHEA je uspešno vratio nivo različitih ROS blizu kontrolnog kod normoglikemičnih pacova dok je čak i kod kompromitovanih dijabetičnih pacova doveo do značajnog smanjenja ROS nakon I/R. Štaviše, DHEA tretman je imao blagotvoran efekat na narušen integritet i funkciju membrane nakon I/R, uzimajući u obzir značajno smanjenje povećanog oslobađanja laktat dehidrogenaze i pada aktivnosti Na/K-ATPaze kako kod normoglikemičnih tako i kod dijabetičnih pacova nakon tretmana [116].

Budući da nakon I/R dolazi do aktivacije glijških ćelija i povećane produkcije različitih proinflamatornih citokina i interleukina, pre svega TNF- α i IL-6, te narušavanja KMB, bitno je spomenuti efekat koji DHEA(S) ostvaruju na astrocite [117, 118]. Naime, pokazano je da DHEA i DHEAS mogu inhibirati produkciju TNF- α *in vivo* i *in vitro* u različitim eksperimentalnim postavkama [119, 120]. Stoga bi jedan od potencijalnih mehanizama post-ishemične neuroprotekcije DHEA(S) mogao biti upravo regulacija prekomerne produkcije TNF- α i IL-6 u astrocitima čime bi se pospešilo očuvanje integriteta KMB [118].

Povezanost endogenog nivoa DHEA(S) i moždane ishemije u humanoj populaciji

Aktivacija hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne (HHN) ose je pokazana kod različitih akutnih oboljenja

[121-123]. Upravo je odgovor HHN ose jedan od prvih merljivih fizioloških odgovora na moždanu ishemiju [124-126], dok nivo kortizola može služiti kao parametar koji određuje funkcionalni ishod u akutnom MU [127-129]. Pored kortizola, DHEA i njegov sulfat se takođe oslobađaju tokom HHN aktivacije. U fiziološkim uslovima, lučenje DHEA je sinhronizovano sa kortizolom kao odgovor na kortikotropni oslobađajući hormon i adrenokortikotropni hormon [130, 131]. Disbalans ili neadekvatan odgovor na stresor i smanjena količina DHEAS je povezana sa nepovoljnim ishodom kod različitih bolesti uključujući sepsu i septički šok u nekim, ali ne u svim studijama [132, 133]. Studije koje se bave povezanošću endogenog post-ishemičkog nivoa DHEA i kliničke slike kod pacijenata prezentovale su dosta kontradiktorne rezultate. Jedna od studija je pokazala da je DHEAS, ali ne i DHEA, povezan sa boljim funkcionalnim ishodom ali ne i preživljavanjem kod pacijenata nakon MU [123], što je u osnovi primećeno i u studiji u kojoj su ispitanice bile žene u postmenopauzi [134]. Sličan ishod navodi i studija Jimenez i saradnika (2013) koja je pokazala da nizak nivo DHEAS pozitivno korelira sa povećanim rizikom od IMU kod žena [135]. Suprotno ovim podacima, u istraživanju Marklund i saradnika (2004) nije primećena korelacija između endogenog nivoa DHEAS i funkcionalnog ishoda [124]. Interesantno je da je kod pacijenata koji pate od multi-infarktne demencije detektovan značajan pad DHEAS u cerebrospinalnoj tečnosti, te da je nakon njegove intravenske primene primećeno znatno poboljšanje motornih sposobnosti i emotivne stabilnosti [136].

ZAKLJUČAK

Moždana I/R predstavlja izuzetno kompleksno stanje čija je etiologija multifaktorijska, što otežava pronalazak i kliničku efikasnost potencijalnog terapeutika te uprkos brojnim istraživanjima tokom poslednjih par decenija još uvek nije pronađena adekvatna terapija za cerebro-vaskularna oboljenja poput MU i TIA. Iz svega navedenog u ovom radu, može se zaključiti da DHEA poseduje potencijalni post-ishemični neuro-protektivan učinak, ali da su doza i vreme primene izuzetno značajni i ostaju i dalje upitni, što umnogome limitira njegovu potencijalnu primenu u lečenju humanih cerebro-vaskularnih oboljenja. Naposljetku, eksperimentalni dokazi koji govore u prilog neurotoksičnosti post-ishemičnog tretmana DHEA svakako ukazuju da je ovaj neurosteroid još uvek daleko od primene u kliničkoj praksi, kao i da se suplementacija DHEA ne sme primenjivati olako i u visokim dozama.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-68/2022-14/200017.

LITERATURA

1. Knight-Greenfield A, Nario JJQ, Gupta A. Causes of Acute Stroke: A Patterned Approach. *Radiologic clinics of North America*. 2019;57(6):1093-108.
2. Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2020;1866(4):165260.
3. Yew KS, Cheng EM. Diagnosis of acute stroke. *American family physician*. 2015;91(8):528-36.
4. Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke*. 2009;40(6):2276-93.
5. Lai SL, Chen YC, Weng HH, Chen ST, Hsu SP, Lee TH. Bilateral common carotid artery occlusion—a case report and literature review. *Journal of the neurological sciences*. 2005;238(1-2):101-4.
6. Kavakli AS, Ayoglu RU, Ozturk NK, Sagdic K, Yilmaz M, Inanoglu K, et al. Simultaneous Bilateral Carotid Endarterectomy under Cervical Plexus Blockade. *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation*. 2015;43(5):367-70.
7. Clissold B, Phan TG, Ly J, Singhal S, Srikanth V, Ma H. Current aspects of TIA management. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2020;72:20-5.
8. Walters RJ, Fox NC, Schott JM, Crum WR, Stevens JM, Rossor MN, et al. Transient ischaemic attacks are associated with increased rates of global cerebral atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2003;74(2):213-6.
9. Liesch M. [Ischemic stroke and TIA]. *Praxis*. 2012;101(1):43-50.
10. Sicard KM, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia. *Experimental & translational stroke medicine*. 2009;1:7.
11. Li Y, Zhang J. Animal models of stroke. *Animal models and experimental medicine*. 2021;4(3):204-19.
12. Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *The open neurology journal*. 2010;4:34-8.
13. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(5):e331-9.
14. Gauthier LV, Taub E, Mark VW, Barghi A, Uswatte G. Atrophy of spared gray matter tissue predicts poorer motor recovery and rehabilitation response in chronic stroke. *Stroke*. 2012;43(2):453-7.
15. Puig B, Brenna S, Magnus T. Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9).
16. Sicard F, Ehrhart-Bornstein M, Corbeil D, Sperber S, Krug AW, Ziegler CG, et al. Age-dependent regulation of chromaffin cell proliferation by growth factors, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(6):2007-12.
17. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*. 2017;133(2):245-61.
18. Zaric M, Drakulic D, Dragic M, Gusevac Stojanovic I, Mitrovic N, Grkovic I, et al. Molecular Alterations and Effects of Acute Dehydroepiandrosterone Treatment Following Brief Bilateral Common Carotid Artery Occlusion: Relevance to Transient Ischemic Attack. *Neuroscience*. 2019;410:128-39.
19. Zaric M, Drakulic D, Stojanovic IG, Mitrovic N, Grkovic I, Martinovic J. Regional-specific effects of cerebral ischemia/reperfusion and dehydroepiandrosterone on synaptic NMDAR/PSD-95 complex in male Wistar rats. *Brain research*. 2018;1688:73-80.
20. Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW. Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the Glycolytic Pathway in Brain. *The Journal of biological chemistry*. 1964;239:18-30.
21. Siemkowicz E, Gjedde A. Post-ischemic coma in rat: effect of different pre-ischemic blood glucose levels on cerebral metabolic recovery after ischemia. *Acta physiologica Scandinavica*. 1980;110(3):225-32.
22. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR journal*. 2003;44(2):85-95.
23. Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*. 1988;19(7):913-4.

24. Eklof B, Siesjo BK. The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain. *Acta physiologica Scandinavica*. 1972;86(4):528-38.
25. Stanojlovic M, Gusevac Stojanovic I, Zaric M, Martinovic J, Mitrovic N, Grkovic I, et al. Progesterone Protects Prefrontal Cortex in Rat Model of Permanent Bilateral Common Carotid Occlusion via Progesterone Receptors and Akt/Erk/eNOS. *Cellular and molecular neurobiology*. 2020;40(5):829-43.
26. Stanojlovic M, Zlatkovic J, Gusevac I, Grkovic I, Mitrovic N, Zaric M, et al. Repeated low-dose 17beta-estradiol treatment prevents activation of apoptotic signaling both in the synaptosomal and cellular fraction in rat prefrontal cortex following cerebral ischemia. *Neurochemistry international*. 2015;83-84:1-8.
27. Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurologic clinics*. 2006;24(1):1-21.
28. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the neurological sciences*. 2000;179(S 1-2):1-33.
29. Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Huttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular neurobiology*. 2013;47(1):9-23.
30. Lai TW, Shyu WC, Wang YT. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(5):266-75.
31. Wu QJ, Tymianski M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Molecular brain*. 2018;11(1):15.
32. Candelario-Jalil E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martinez G, Leon OS. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neuroscience research*. 2001;41(3):233-41.
33. L L, X W, Z Y. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Biochemistry & pharmacology : open access*. 2016;5(4).
34. Zhou Q, Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology*. 2013;74:69-75.
35. Russo E, Nguyen H, Lippert T, Tuazon J, Borlongan CV, Napoli E. Mitochondrial targeting as a novel therapy for stroke. *Brain circulation*. 2018;4(3):84-94.
36. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
37. Sun MS, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang FL, Guo ZN, et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:3804979.
38. Zlatkovic J, Todorovic N, Boskovic M, Pajovic SB, Demajo M, Filipovic D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;393(1-2):43-57.
39. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox biology*. 2014;2:702-14.
40. Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinanier MC, et al. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke*. 1997;28(11):2252-8.
41. Granzotto A, Sensi SL. Intracellular zinc is a critical intermediate in the excitotoxic cascade. *Neurobiology of disease*. 2015;81:25-37.
42. Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *The American journal of physiology*. 1992;263(5 Pt 2):H1356-62.
43. Li P, Hu X, Gan Y, Gao Y, Liang W, Chen J. Mechanistic insight into DNA damage and repair in ischemic stroke: exploiting the base excision repair pathway as a model of neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(10):1905-18.
44. Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012;149(7):1536-48.
45. Zlatkovic J, Filipovic D. Bax and B-cell-lymphoma 2 mediate proapoptotic signaling following chronic isolation stress in rat brain. *Neuroscience*. 2012;223:238-45.
46. Veit F, Pak O, Brandes RP, Weissmann N. Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels. *Antioxidants & redox signaling*. 2015;22(6):537-52.

47. Zlatkovic J, Filipovic D. Chronic social isolation induces NF-kappaB activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex. *Neurochemistry international*. 2013;63(3):172-9.
48. Nigam S, Schewe T. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1488(1-2):167-81.
49. Ren Z, Zhang R, Li Y, Li Y, Yang Z, Yang H. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. *International journal of molecular medicine*. 2017;40(5):1444-56.
50. Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *The Journal of experimental biology*. 2004;207(Pt 18):3221-31.
51. Narne P, Pandey V, Phanithi PB. Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in Ischemic Stroke and the Emergent Epigenetic Underpinnings. *Molecular neurobiology*. 2019;56(3):1749-69.
52. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2009;20(4):223-30.
53. Chen ZQ, Mou RT, Feng DX, Wang Z, Chen G. The role of nitric oxide in stroke. *Medical gas research*. 2017;7(3):194-203.
54. Trimmer BA, Aprille JR, Dudzinski DM, Lagace CJ, Lewis SM, Michel T, et al. Nitric oxide and the control of firefly flashing. *Science*. 2001;292(5526):2486-8.
55. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine*. 2011;17(7):796-808.
56. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological reviews*. 2005;57(2):217-52.
57. Shahani N, Sawa A. Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1820(6):736-42.
58. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999;22(9):391-7.
59. Vyklíček V, Korinek M, Smejkalová T, Balík A, Krausová B, Kaniakova M, et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological research*. 2014;63(Suppl 1):S191-203.
60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.
61. Datta A, Sarmah D, Mounica L, Kaur H, Kesharwani R, Verma G, et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Translational stroke research*. 2020;11(6):1185-202.
62. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annual review of immunology*. 2003;21:71-105.
63. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(2):333-40.
64. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*. 2018;552:50-9.
65. Gao Y, Chen T, Lei X, Li Y, Dai X, Cao Y, et al. Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury. *Molecular medicine reports*. 2016;14(6):5481-8.
66. Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittel-Forschung*. 1995;45(3A):357-60.
67. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology*. 2006;147 Suppl 1:S232-40.
68. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current molecular medicine*. 2004;4(2):193-205.
69. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35.
70. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology : functions and disorders of the immune system. Fourth edition. ed. ix, 320 pages p.
71. Chen R, Zhang X, Gu L, Zhu H, Zhong Y, Ye Y, et al. New Insight Into Neutrophils: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Ischemia. *Frontiers in immunology*. 2021;12:692061.

72. Zhang D, Ren J, Luo Y, He Q, Zhao R, Chang J, et al. T Cell Response in Ischemic Stroke: From Mechanisms to Translational Insights. *Frontiers in immunology*. 2021;12:707972.
73. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30(1):65-91.
74. Parker LN, Odell WD. Control of adrenal androgen secretion. *Endocrine reviews*. 1980;1(4):392-410.
75. Havelock JC, Auchus RJ, Rainey WE. The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Seminars in reproductive medicine*. 2004;22(4):337-47.
76. Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(8):4704-7.
77. Corpechot C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjoval J, Vihko R, et al. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain research*. 1983;270(1):119-25.
78. Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, et al. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(3):865-70.
79. Brown RC, Cascio C, Papadopoulos V. Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(2):847-59.
80. Maurice T, Gregoire C, Espallergues J. Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2006;84(4):581-97.
81. Webb SJ, Geoghegan TE, Prough RA, Michael Miller KK. The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug metabolism reviews*. 2006;38(1-2):89-116.
82. Widstrom RL, Dillon JS. Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Seminars in reproductive medicine*. 2004;22(4):289-98.
83. Clark BJ, Prough RA, Klinge CM. Mechanisms of Action of Dehydroepiandrosterone. *Vitamins and hormones*. 2018;108:29-73.
84. Labrie F. Adrenal androgens and intracrinology. *Seminars in reproductive medicine*. 2004;22(4):299-309.
85. Chalbot S, Morfin R. Dehydroepiandrosterone metabolites and their interactions in humans. *Drug metabolism and drug interactions*. 2006;22(1):1-23.
86. Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in neurobiology*. 1992;38(4):379-95.
87. Melchior CL, Ritzmann RF. Dehydroepiandrosterone is an anxiolytic in mice on the plus maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1994;47(3):437-41.
88. Sousa A, Ticku MK. Interactions of the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate with the GABA(A) receptor complex reveals that it may act via the picrotoxin site. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;282(2):827-33.
89. Imamura M, Prasad C. Modulation of GABA-gated chloride ion influx in the brain by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;243(3):771-5.
90. Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*. 1998;23(8):963-87.
91. Compagnone NA, Mellon SH. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2000;21(1):1-56.
92. Laurine E, Lafitte D, Gregoire C, Seree E, Loret E, Douillard S, et al. Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(32):29979-86.
93. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(24):21379-88.
94. Lapchak PA, Chapman DF, Nunez SY, Zivin JA. Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors. *Stroke*. 2000;31(8):1953-6; discussion 7.

95. Li H, Klein G, Sun P, Buchan AM. Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. *Brain research*. 2001;888(2):263-6.
96. Marx CE, Jarskog LF, Lauder JM, Gilmore JH, Lieberman JA, Morrow AL. Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia. *Brain research*. 2000;871(1):104-12.
97. Kaasik A, Kalda A, Jaako K, Zharkovsky A. Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience*. 2001;102(2):427-32.
98. Kimonides VG, Spillantini MG, Sofroniew MV, Fawcett JW, Herbert J. Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. *Neuroscience*. 1999;89(2):429-36.
99. Kurata K, Takebayashi M, Morinobu S, Yamawaki S. beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different mechanisms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2004;311(1):237-45.
100. Fiore C, Inman DM, Hirose S, Noble LJ, Igarashi T, Compagnone NA. Treatment with the neurosteroid dehydroepiandrosterone promotes recovery of motor behavior after moderate contusive spinal cord injury in the mouse. *Journal of neuroscience research*. 2004;75(3):391-400.
101. Karishma KK, Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *The European journal of neuroscience*. 2002;16(3):445-53.
102. Naert G, Maurice T, Tapia-Arancibia L, Givalois L. Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(8-10):1062-78.
103. Sakr HF, Khalil KI, Hussein AM, Zaki MS, Eid RA, Alkhateeb M. Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on memory and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in a rat model of vascular dementia. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2014;65(1):41-53.
104. Bastianetto S, Ramassamy C, Poirier J, Quirion R. Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Brain research Molecular brain research*. 1999;66(1-2):35-41.
105. Cardounel A, Regelson W, Kalimi M. Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1999;222(2):145-9.
106. Tamagno E, Guglielmotto M, Bardini P, Santoro G, Davit A, Di Simone D, et al. Dehydroepiandrosterone reduces expression and activity of BACE in NT2 neurons exposed to oxidative stress. *Neurobiology of disease*. 2003;14(2):291-301.
107. Kalimi M, Shafagoj Y, Loria R, Padgett D, Regelson W. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Molecular and cellular biochemistry*. 1994;131(2):99-104.
108. Chen CC, Parker CR, Jr. Adrenal androgens and the immune system. *Seminars in reproductive medicine*. 2004;22(4):369-77.
109. Hu Y, Cardounel A, Gursoy E, Anderson P, Kalimi M. Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*. 2000;59(7):753-62.
110. Svec F, Porter J. The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on Zucker rat food selection and hypothalamic neurotransmitters. *Psychoneuroendocrinology*. 1997;22 Suppl 1:S57-62.
111. Perez-Neri I, Montes S, Ojeda-Lopez C, Ramirez-Bermudez J, Rios C. Modulation of neurotransmitter systems by dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: mechanism of action and relevance to psychiatric disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2008;32(5):1118-30.
112. Safiulina D, Peet N, Seppet E, Zharkovsky A, Kaasik A. Dehydroepiandrosterone inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain and is neurotoxic in vitro and in vivo at high concentrations. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2006;93(2):348-56.
113. Gil-ad I, Shtaif B, Eshet R, Maayan R, Rehavi M, Weizman A. Effect of dehydroepiandrosterone and its sulfate metabolite on neuronal cell viability in culture. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2001;3(9):639-43.

114. Li Z, Cui S, Zhang Z, Zhou R, Ge Y, Sokabe M, et al. DHEA-neuroprotection and -neurotoxicity after transient cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2009;29(2):287-96.
115. Yabuki Y, Shinoda Y, Izumi H, Ikuno T, Shioda N, Fukunaga K. Dehydroepiandrosterone administration improves memory deficits following transient brain ischemia through sigma-1 receptor stimulation. *Brain research*. 2015;1622:102-13.
116. Aragno M, Parola S, Brignardello E, Mauro A, Tamagno E, Manti R, et al. Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/reperfusion in the brain of diabetic rats. *Diabetes*. 2000;49(11):1924-31.
117. McColl BW, Allan SM, Rothwell NJ. Systemic inflammation and stroke: aetiology, pathology and targets for therapy. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 5):1163-5.
118. Arbo BD, Ribeiro FS, Ribeiro MF. Astrocyte Neuroprotection and Dehydroepiandrosterone. *Vitamins and hormones*. 2018;108:175-203.
119. Kipper-Galperin M, Galilly R, Danenberg HD, Brenner T. Dehydroepiandrosterone selectively inhibits production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 [correction of interlukin-6] in astrocytes. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 1999;17(8):765-75.
120. Di Santo E, Foddi MC, Ricciardi-Castagnoli P, Mennini T, Ghezzi P. DHEAS inhibits TNF production in monocytes, astrocytes and microglial cells. *Neuroimmunomodulation*. 1996;3(5):285-8.
121. Widmer IE, Puder JJ, Konig C, Pargger H, Zerkowski HR, Girard J, et al. Cortisol response in relation to the severity of stress and illness. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(8):4579-86.
122. Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *The New England journal of medicine*. 2004;350(16):1629-38.
123. Blum CA, Mueller C, Schuetz P, Fluri F, Trummler M, Mueller B, et al. Prognostic value of dehydroepiandrosterone-sulfate and other parameters of adrenal function in acute ischemic stroke. *PloS one*. 2013;8(5):e63224.
124. Marklund N, Peltonen M, Nilsson TK, Olsson T. Low and high circulating cortisol levels predict mortality and cognitive dysfunction early after stroke. *Journal of internal medicine*. 2004;256(1):15-21.
125. Christensen H, Boysen G, Johannesen HH. Serum-cortisol reflects severity and mortality in acute stroke. *Journal of the neurological sciences*. 2004;217(2):175-80.
126. Michalaki M, Margeli T, Tsekouras A, Gogos CH, Vagenakis AG, Kyriazopoulou V. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to the severity of illness in non-critically ill patients: does relative corticosteroid insufficiency exist? *European journal of endocrinology*. 2010;162(2):341-7.
127. Anne M, Juha K, Timo M, Mikko T, Olli V, Kyosti S, et al. Neurohormonal activation in ischemic stroke: effects of acute phase disturbances on long-term mortality. *Current neurovascular research*. 2007;4(3):170-5.
128. Neidert S, Katan M, Schuetz P, Fluri F, Ernst A, Bingisser R, et al. Anterior pituitary axis hormones and outcome in acute ischaemic stroke. *Journal of internal medicine*. 2011;269(4):420-32.
129. Slowik A, Turaj W, Pankiewicz J, Dziedzic T, Szermer P, Szczudlik A. Hypercortisolemia in acute stroke is related to the inflammatory response. *Journal of the neurological sciences*. 2002;196(1-2):27-32.
130. Rosenfeld RS, Hellman L, Roffwarg H, Weitzman ED, Fukushima DK, Gallagher TF. Dehydroisoandrosterone is secreted episodically and synchronously with cortisol by normal man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1971;33(1):87-92.
131. Pavlov EP, Harman SM, Chrousos GP, Loriaux DL, Blackman MR. Responses of plasma adrenocorticotropin, cortisol, and dehydroepiandrosterone to ovine corticotropin-releasing hormone in healthy aging men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1986;62(4):767-72.
132. Arlt W, Hammer F, Sanning P, Butcher SK, Lord JM, Allolio B, et al. Dissociation of serum dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in septic shock. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(7):2548-54.
133. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I. Decreased levels of dehydroepiandrosterone sulphate in severe critical illness: a sign of exhausted adrenal reserve? *Critical care*. 2002;6(5):434-8.
134. Pappa T, Vemmos K, Saltiki K, Mantzou E, Stamatelopoulos K, Alevizaki M. Severity and outcome of acute stroke in women: relation to adrenal sex steroid levels. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(1):84-91.

135. Jimenez MC, Sun Q, Schurks M, Chiuve S, Hu FB, Manson JE, et al. Low dehydroepiandrosterone sulfate is associated with increased risk of ischemic stroke among women. *Stroke*. 2013;44(7):1784-9.
136. Azuma T, Nagai Y, Saito T, Funachi M, Matsubara T, Sakoda S. The effect of dehydroepiandrosterone sulfate administration to patients with multi-infarct dementia. *Journal of the neurological sciences*. 1999;162(1):69-73.



MOLEKULARNA BIOLOGIJA BILJAKA

MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS



Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze

Neda Đorđević

Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu
Kontakt: neda@vin.bg.ac.rs; nedadjordjevic1@gmail.com

Apstrakt

Ova tema je fokusirana na hemijsku i biološku karakterizaciju odabranih uzoraka crvenih vina. Akcent je stavljen na hemijsku karakterizaciju klonskih sorti vina vranac i merlo, kao i na procenu antioksidativne aktivnosti merlo vina u ćelijama kvasca. U radu su primenjene brojne analitičke tehnike za određivanje koncentracije fenolnih jedinjenja, elementalnog sastava i *in vitro* antioksidativnu aktivnosti ispitivanih uzoraka (spektrofotometrija, ciklična voltametrija, klasična polarografija, EPR spektroskopija, LC-MS/MS, ICP-OES i ICP-MS). Pored antioksidativne, ispitane su i citotoksična i antibakterijska aktivnost odgovarajućih uzoraka vina. Eksperiment na bazi vinskog kvasca je obuhvatio određivanje ukupnih –SH grupa, kao i enzimskih aktivnosti glutathion peroksidaze, glutathion reduktaze i katalaze. Eksperimentalno dobijeni podaci za klonska sortna vina merlo ukazuju na poseban doprinos glutathion peroksidaze preživljavanju ćelija kvasca u uslovima oksidativnog stresa. Konačno, primenom veštačke neuronske mreže razvijena je brza i precizna metoda za predviđanje uticaja malih promena u vinskom fenolnom profilu na aktivnosti istaknutih enzima antioksidativne zaštite.

Ključne reči: crvena vina, polifenolni sadržaj, biološka aktivnost crvenih vina, savremena statistika

Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties

Neda Đorđević

Vinča Institute of Nuclear Sciences, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade

Correspondence: neda@vin.bg.ac.rs; nedadjordjevic1@gmail.com

Abstract

This topic focuses on the chemical and biological characterization of selected red wine samples. Emphasis is placed on the chemical characterisation of clonal wines of Vranac and Merlot varieties, as well as on the evaluation of the antioxidant activity of Merlot wines in yeast cells. Numerous analytical techniques were used to determine the concentration of phenolic compounds, elemental composition and *in vitro* antioxidant activity of the tested samples (spectrophotometry, cyclic voltammetry, classical polarography, EPR spectroscopy, LC-MS/MS, ICP-OES and ICP-MS). In addition, total antioxidant activity, cytotoxic and antibacterial activity of the respective wine samples were determined. The wine yeast experiment involved determining the total groups –SH, as well as enzymatic activities of glutathione peroxidase, glutathione reductase and catalase. The experimentally obtained data for clonal Merlot wine varieties indicate a particular contribution of glutathione peroxidase to the survival of yeast cells under oxidative stress conditions. Finally, using an artificial neural network (ANN), a rapid and accurate method was developed to predict the effect of small changes in the wine phenolic profile on the activities of prominent antioxidant enzymes.

Key words: red wines, polyphenolic content, biological activity of red wines, modern statistics

UVOD

Crveno vino je alkoholno piće koje se dobija fermentacijom šire (groždanog soka). Na sastav vina utiče veliki broj faktora, kao što su kvaliteta sorte, stepena zrelosti grožđa, klimatski i drugi agroekološki uslovi sredine, kao i sam postupak vinifikacije, uslovi skladištenja i zrenja vina [1,2]. Umereno korišćenje ovog alkoholnog pica ima blagotvorno dejstvo na zdravlje ljudi, koje se povezuje sa mikronutrijentima koji ulaze u njegov sastav. Identifikacija bioaktivnih jedinjenja vina, kao i utvrđivanje mehanizama njihovog delovanja ciljevi su naučne zajednice proteklih decenija [3]. Fenolna jedinjenja, mikro- i makroelementi se svrstavaju među najznačajnije mikronutrijene vina. *Vitis vinifera* L. je evropska vrsta vinove loze koja raste u umerenoj klimatskoj zoni u kojoj veliki broj sunčanih sati i mala količina padavina posebno pogoduju razvoju ove vrste. Vranac je crnogorska autohtona sorta vinove loze, veoma važna za vinogradarstvo i vinarijsku industriju, kao i za ekonomiju Crne Gore uopšte. Kao takva, najznačajnija je sorta vinove loze za proizvodnju crvenog vina u Crnoj Gori. Vino ove sorte sadrži 11 do 14% alkohola i od 5-6 g/L kiselina [4]. Prepoznatljivo je po specifičnom sortnom mirisu i ukusu, kao i po intenzivnoj tamnoj boji. Kvalitet mu omogućava kupazu sa vinima drugih sorti. Klimatski uslovi u Ćemovskom polju na području Crne Gore pogoduju i uspešnom gajenju introdukovanih sorti vinove loze kaberne sovignon i merlo, od kojih se dobijaju vina vrhunskog kvaliteta. Pomenute sorte su deo svetske vinske baštine, čuvane i prepoznatljive svuda u svetu [5]. O tome svedoči i činjenica da merlo sorta zauzima 62%, a kaberne sovignon 25% ukupne površine plantaža vinove loze u vinogradima Bordo, poznatog vinarijskog grada na jugozapadu Francuske, odakle i potiču [5].

KLONSKA SELEKCIJA

Klonska selekcija predstavlja individualnu selekciju vinove loze u cilju poboljšanja agrobioloških i privredno-tehnoloških osobina vinove loze, kao i povećanja prinosa grožđa. Danas se savremeni vinogradi podižu sa klonskim materijalom sorte. Ona se sastoji od serije procedura osmišljenih radi selekcije zdravih klonova vinove loze, sa sortnom autentičnošću i poboljšanim karakteristikama [6]. Svaki mutirani čokot iste sorte vinove loze predstavlja različiti klon i čokot sa drugačijim fenotipom. Cilj ove procedure je dobijanje najvećeg mogućeg broja klonova, genetski međusobno različitih radi sprečavanja redukovanja prirodne genetske različitosti jedne vrste, kao i u cilju dobijanja dovoljne baze za obrazovanje poliklonskih vinograda [7]. Klonska selekcija je od posebne važnosti za autohtone sorte s obzirom na to da je teško naći klonove iz drugih regiona. Kompanija „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica je s tim razlogom u toku desetogodišnjeg perioda (2004-2014) radila na klonskoj selekciji autohtone sorte vranac. Tim postupkom je izdvojeno 7 klonova (CI do CVII) koji su se istakli visokim prinosom, kvalitetom grožđa i vina, dobrim habitusom koji su vizuelno zdravi i nezaraženi virusima. Oni su 2017. godine priznati i zaštićeni kao patent. Osim toga, na područje Ćemovskog Polja koje je u vlasništvu kompanije „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica introdukovani su i klonovi sorte merlo (VCR 1 i VCR 101), selekcionisani od strane Vivai Cooperativi Rauscedo (VCR) Italija, najvećeg i najcenjenijeg rasadnika vinove loze u Italiji (provincija Udin, region Friuli, severno od Venecije).

AKTIVNE KOMPONENTE VINA

Vino sadrži više od 500 jedinjenja među kojima su najzastupljeniji voda, alkohol (etanol) i fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja su heterogena grupa sekundarnih metabolita biljaka, a predstavljaju i jednu od najvažnijih klasa bioaktivnih jedinjenja uopšte. Oni nastaju iz amino kiselina u pentozo-fosfatnom i fenilpropanoidnom putu, kao i u ciklusu šikiminske kiseline. Stvaraju se u semenu i pokožici grožđa, a ekstrahuju se tokom procesa fermentacije prelazeći u vino. U pokožici crnog grožđa se nalazi oko 50% ukupnih fenolnih jedinjenja, u semenu 46-69%, dok se u pulpi i soku grožđa može naći oko 6% fenolnih jedinjenja [8]. Ta-

kođe, u vinu se mogu naći i fenolna jedinjenja iz kvasca koji se koristi u postupku vinifikacije, kao i fenolna jedinjenja iz hrastovog drveta oslobođena tokom procesa starenja vina. Finalni sastav i sadržaj ovih jedinjenja u vinu zavisi od njihovog sadržaja u grožđu, parametara vezanih za način ekstrakcije, način vinifikacije, kao i od samih hemijskih reakcija koje se dešavaju tokom starenja vina. Fenolna jedinjenja prisutna u grožđu i vinu mogu se svrstati u flavonoide i neflavonoide, pri čemu je flavonoidna grupacija u crvenom vinu zastupljenija čineći oko 85% ukupnih fenola [8].

Flavonoidi

Kao sekundarni metaboliti biljaka, flavonoidi imaju različite funkcije (antioksidativnu, fungicidnu, insekticidnu, UV-protektivnu, signalnu, privlačenje insekata, itd.) [9]. Osnovni skelet strukture flavonoida čini difenilpropansko jezgro $C_6-C_3-C_6$. To znači da se u okviru strukture flavonoida zapažaju dva benzenova prstena (prsten A i prsten B) međusobno povezana trougljeničnim lancem koji gradi piranov prsten (heterociklični prsten sa kiseonikom) (prsten C). Prema stepenu oksidacije piranskog prstena polifenoli se mogu podeliti na šest podgrupa: flavonoli, flavanoli, izoflavoni, flavanoni, flavoni i antocijani. Glavne klase flavonoida koje se mogu naći u grožđu i vinima su flavonoli, antocijani, flavan-3-oli (katehini) i flavan-3-ol-polimeri (proantocijanidini).

Najzastupljenija klasa flavonoida u pokožici crnog i belog grožđa jesu flavonoli. Kvercetin i njegovi konjugovani derivati mogu predstavljati i do 87% od ukupnog sadržaja flavonola u crnom grožđu [10]. Za razliku od kempferola i kvercetina prisutnih i u belim vinima, miricetin je specifičan samo za crvena vina. U okviru pomenutih struktura glukoza je najčešće zastupljena šećerna komponenta povezana preko položaja C-3 u prstenu C. Kvercetin se, takođe, u grožđu može naći u formi 3-ramnozilglukozida (rutina).

Flavan-3-oli (katehini) se u monomernoj, oligomernoj ili polimernoj formi mogu naći u semenu, kožici i stabljici grožđa. Od četiri moguća izomera katehina najzastupljeniji u vinu, a ujedno i najstabilniji su (+)-katehin i (-)-epikatehin. Oligomerne i polimerne forme katehina, tzv. proantocijanidini (kondenzovani tanini), odgovorne su za jednak (opor) karakter vina. Molekuli flavanola nemaju glikozilovane forme, ali mogu biti vezani za polisaharide u grožđu i mogu biti ekstrahovani u obliku kompleksa u toku vinifikacije.

Antocijani su glikozilovani, hidrosolubilni pigmenti, koji daju obojenost voću i cveću. Najzastupljeniji su u pokožici grožđa, a manje ih ima u mesu. U grožđu i vinu identifikovano je pet antocijana, međusobno različitih prema supstituciji B-prstena sa dva ili tri supstituenta (OH i OCH_3) [11]. Glikozidne forme su zastupljenije u prirodi. U vinima dobijenim od vrste *Vitis vinifera* identifikovani su samo monoglukozidi antocijana, kao i monoglukozidi antocijana acilovani *p*-kumarinskom, kafeinskom i sirćetnom kiselinom. Malvidin monoglukozid (malvin) je zaslužan za formiranje bazične boje crvenog grožđa, a samim tim i crvenog vina. Osim njega u grožđu se može naći još četiri različitih antocijana: cijanidin, peonidin, delfinidin i petunidin.

Neflavonoidna jedinjenja

Derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, stilbeni, kao i tzv. hidrolizabilni tanini spadaju u neflavonoidna jedinjenja vina. Ona su u grožđu i vinu prirodno prisutna, a ima i onih koji se u vino ekstrahuju iz drveta u toku procesa maturacije ili se dodaju u toku procesa vinifikacije. Neflavonoidna jedinjenja stabilizuju boju crvenih vina kroz intra- i intermolekulske interakcije, iako su sama po sebi bezbojna [12]. Pored boje, značajna su i za ukus i biološku aktivnost samih vina.

U grožđu i vinu identifikovano je sedam benzojevih kiselina: galna, gentizinska, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehuinska, siringinska, salicilna i vanilinska kiselina. U vinu se može naći i elaginska kiselina poreklom iz drvenih buradi ili iz tanina, vinskih aditiva [11]. Salicilna i gentizinska kiselina su u grožđu i vinu prisutne

u tragovima. U vinu se ove kiseline uglavno nalaze u svojim slobodnim formama [13]. Galna kiselina je najzastupljenija u vinu. Ona zajedno sa elaginskom kiselinom ulazi u sastav galotanina i elagitanina.

Hidroksicimetne kiseline su u vinima uglavnom zastupljene u esterifikovanoj formi. Takođe se mogu naći i u obliku prostih glukozida. Iz ove grupe jedinjenja u vinima je najzastupljenija kafeinska kiselina u slobodnom ili esterifikovanom obliku. Ona inače čini 75 do 100% ukupnog sadržaja derivata cimetne kiseline u voću.

Jedno od najznačajnijih jedinjenja koje spada u grupu stilbena je *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-stilben). U toku same fermentacije ovo jedinjenje dospeva u vino iz pokožice grožđa. Za razliku od *trans* izomera, *cis*-resveratrol je u tragovima prisutan u samom grožđu, a smatra se da nastaje iz *trans* oblika u procesu vinifikacije [14]. U prirodi je najzastupljena glikozidna forma resveratrola, tzv. piceid (3-O-β-D-glukozid) [15]. U vrsti *V. vinifera* identifikovano je više oligomera resveratrola.

Tanini nastaju polimerizacijom elementarnih fenolnih molekula [11]. Ova jedinjenja mogu da stvaraju stabilne agregate sa proteinima i drugim biljnim polimerima. Galotanini i elagitanini spadaju u hidrolizabilne tanine koji u svojoj strukturi sadrže galnu ili elaginsku kiselinu koje se oslobađaju nakon kisele hidrolize. Pored toga tanini u svojoj strukturi sadrže i molekule glukoze. Hidrolizabilni tanini se dodaju kao aditivi u vino, a u vino mogu dospeti i iz hrastovih buradi. Sa druge strane, (+)-katehin i (-)-epikatehin su osnovne strukturne jedinice kondenzovanih tanina koji se takođe nalaze u vinu [16].

Mikro– i makroelementi u crvenom vinu

Sadržaj mikro– i makroelemenata može značajno uticati na organoleptički kvalitet i nutritivnu vrednost vina. Koncentracija ovih elemenata u vinu može prilično da varira. Poznato je da konzumiranje vina u umerenim količinama (1–2 čaše na dan) snabdeva organizam elementima esencijalnim za njegovo funkcionisanje [17]. Međutim, iznad optimalnog nivoa pojedini elementi mogu negativno uticati na organoleptičke osobine vina i biti štetni po zdravlje ljudi [18,19]. *The International Organisation of Vine and Wine* - OIV je internacionalna organizacija koja se bavi vinovom lozom i vinom i kao takva propisuje maksimalno dozvoljene vrednosti za sadržaj metala u vinima [20]. Takođe, većina zemalja ima sopstvene regulative. Faktori koji mogu uticati na elementalni sastav vina su: sorta grožđa, sadržaj neorganskih jedinjenja u zemljištu, klimatski uslovi, tehnika vinifikacije, transport i skladištenje vina [1]. Naime, korišćenje organskih i mineralnih đubriva, neorganskih pesticida, zagađenost spoljašnje sredine, upotreba aditiva mogu značajno promeniti elementalni sadržaj vina [2,21].

BIOLOŠKI EFEKTI VINA

Pozitivan efekat polifenola na zdravlje ljudi od davnina je poznat [11]. Među alkoholnim pićima crveno vino pokazuje najjači efekat protiv pojave oboljenja povezanih sa oksidativnim stresom [22]. Za antioksidativnu sposobnost polifenola zaslužna je njihova struktura koja im omogućava da deluju kao redukcionim agensima, donori vodonika i „hvatači“ singletnog kiseonika [23]. Smatra se da je konzumacija crvenog vina zajedno sa maslinovim uljem ključna za objašnjenje „Francuskog paradoksa“ – smanjenja incidencije kardiovaskularnih oboljenja uprkos povećanom unosu hrane bogate zasićenim masnim kiselinama [24]. Zahvaljujući svojim antioksidativnim, baktericidnim i vitaminskim svojstvima fenolna jedinjenja su u vezi sa prevencijom od nastanka kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja, kao i dijabetesa i kancera [25,26]. Pretpostavlja se da inhibicija oksidativnih procesa podrazumeva:

- neutralisanje lipidnog, alkoksil i peroksil radikala doniranjem vodonika

- heliranje jona metala
- regeneraciju α -tokoferola kroz reakciju α -tokoferol radikala.

Brojne studije su proučavale antioksidativne efekte flavonoida. Studija Van Acker i saradnika (1996) jasno je ukazala na to da su flavonoidi sa kateholnom grupom u prstenu B najaktivniji „hvatači“ slobodnih radikala. Ova studija je pokazala i da je ostatak strukture flavonoida od malog značaja za samu aktivnost, osim u slučaju kvercetina u čijoj strukturi kombinacija kateholne grupe sa dvostrukom vezom između C2 i C3 i hidroksilnom grupom na C3 u prstenu C uslovljava izrazitu antiradikalnu aktivnost [57]. Samim tim, antioksidativna aktivnost kvercetina je duplo veća u odnosu na katehin [38]. Takođe, kvercetin ima veću sposobnost da helira jone prelaznih metala od katehina [58]. Sa druge strane, katehin i epikatehin pokazuju sličan antioksidativni potencijal, dok cijanidin ima antioksidativni potencijal sličan kvercetinu [38].

Antioksidativni kapacitet fenolnih kiselina i njihovih estara zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu funkcionalnu grupu [27,28]. Monohidroksibenzoeve kiseline sa hidroksilnom grupom u položajima *orto* ili *para* u odnosu na karboksilnu grupu nemaju antioksidativnu aktivnost, za razliku od onih sa hidroksilnom grupom u *meta* položaju [28]. Broj hidroksilnih grupa je direktno proporcionalan antioksidativnoj aktivnosti, pa su samim tim polifenoli efikasniji antioksidanti od monofenolnih jedinjenja [27]. Galna kiselina, sa svoje tri hidroksilne grupe efikasniji je antioksidant od odgovarajućih difenolnih kiselina (protokatehuinske i gentizinske). Resveratrol je jedno od najznačajnijih i najproučavanijih polifenolnih jedinjenja zaslužnih za održavanje redoks statusa u organizmu. Ovo jedinjenje je i dobar promotor aktivnosti različitih antioksidativnih enzima [29]. U studiji Losa (2003) pokazano je da stilbeni utiču na održavanje nivoa glutaciona u monojedarnim ćelijama periferne krvi, time ih štiteći od oksidativnih oštećenja usled dejstva 2-deoksi-D-riboze [30]. Osim toga, ova studija je pokazala da resveratrol pozitivno deluje i na smanjenje oksidacije tiolnih grupa proteina u ćelijama humanih krvnih pločica. Slično tome, resveratrol indukuje povećanje nivoa glutaciona u humanim limfocitima aktiviranim vodonik peroksidom. U sledećoj studiji, pokazano je da resveratrol povećava sintezu nekoliko antioksidativnih enzima, uključujući glutation peroksidazu, glutation-S-transferazu i glutation reduktazu [31].

Antikancerogeni efekti fenolnih jedinjenja prvenstveno se odnose na zaustavljanje ćelijskog ciklusa, inhibiciju onkogene signalne kaskade i angiogeneze, menjanje nivoa ROS u ćeliji, promociju ekspresije tumor supresornih proteina, kao što je p53, kao i na povećanje sposobnosti diferencijacije i transformacije u normalne ćelije. Osim toga, prirodno prisutna fenolna jedinjenja pozitivno deluju na zaustavljanje migracije ćelija pri ćelijskoj invaziji i ekstravazaciji [32]. Samim tim fenolna jedinjenja potpomažu lokalizaciju kancerskih ćelija i čine ih osetljivijim na terapeutike. Polifenoli takođe mogu da se ponašaju i kao prooksidanti inicirajući prekidanje ćelijske DNK, usled dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta, a samim tim i ćelijsku smrt kancerskih ćelija [33,34].

Godinama unazad postoji sve veća tendencija za pronalaženje efikasnijih antimikrobnih prirodnih proizvoda, koji bi mogli poboljšati otpornost ljudi prema patogenim bakterijama uz minimalne sporedne efekte [35,36]. Proučavanje antimikrobne aktivnosti specifičnih polifenolnih jedinjenja, kao što su resveratrol, kvercetin i brojne fenolne kiseline predmet je mnogih naučnih studija [37,38]. Ono se odnosi kako na strukturne specifičnosti fenolnih jedinjenja kao antibakterijskih agenasa, tako i na razumevanje mehanizama antibakterijskog delovanja datih jedinjenja. Pretpostavlja se da se mehanizmi zasnivaju na: inhibiranju sinteze nukleinskih kiselina, inhibiranju funkcionisanja ćelijske membrane, inhibiranju energetskog metabolizma, inhibiranju samog vezivanja bakterija i stvaranja biofilma, inhibiranju porina na ćelijskoj membrani bakterija, menjanju membranske propustljivosti kao i na samom smanjivanju patogenosti bakterija [39,40].

SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA U ODABRANIM UZORCIMA VINA

Analiza spektrofotometrijskog merenja sadržaja ukupnih fenola, sadržaja ukupnih flavonoida, monomernih antocijana, kao i anti-DPPH radicalske aktivnosti u uzorcima komercijalno dostupnih crvenih vina sorti vranac, merlo i kaberne sovinjon (berba 2010-2012), je pokazala da sorta vinove loze, kao i klimatski uslovi u godini proizvodnje vina značajno utiču na pomenute parametre. Vina sorte vranac sadržala su od $1513,0 \pm 54,6$ do $2362,1 \pm 77,6$ mgGAE/L ukupnih fenola [41]. U sortama merlo i kaberne sovinjon koncentracije su bile veće i to od $2184,5 \pm 93,7$ do $3730,2 \pm 164,7$ mg/L, u okviru vina merlo sorte i od $2529,4 \pm 80,6$ do $2873,4 \pm 93,2$ mg/L u okviru vina sorte kaberne sovinjon. Slične vrednosti za koncentraciju ukupnih fenola dobijene su u ranijim studijama koje su proučavale vina pomenutih sorti poreklom iz Makedonije, Crne Gore, Grčke, Argentine i Brazila [42,47]. Analizom uzoraka klonskih vina sorte vranac (CI, CII i CIII) pokazano je da je sadržaj ukupnih fenola (od $1349,0 \pm 56,3$ do $2668,8 \pm 102,8$ mgGAE/L) takođe sličan sadržaju nađenom u ranijim istraživanjima vina sorte vranac poreklom iz Crne Gore, Srbije i Makedonije [42,43,48-52]. Sadržaj ukupnih fenola u klonskim vinima sorte Merlo, VCR1 i VCR101 analiziranim u ovoj studiji kretao se u okviru $2184,5 \pm 93,7$ – $3337,9 \pm 115,4$ mgGAE/L. Taj sadržaj je znatno veći u odnosu na sadržaj nađen u klonskim vinima iste sorte (022, 025 i 029), poreklom iz Srbije, kao i u odnosu na sadržaj fenola u vinima poreklom iz Hrvatske (53–55). Koncentracija tanina u ispitivanim uzorcima merlo vina ($551,6 \pm 28,7$ do $793,8 \pm 37,5$ mg/L) u skladu je sa vrednostima pronađenim u crvenim vinima merlo i drugih sorti crnog grožđa (53,56–58). Dobijeni rezultati za sadržaj ukupnih flavonoida i monomernih antocijana takođe su u skladu sa literaturnim podacima [49,51,53,59–62].

Faktori spoljašnje sredine, kao što su temperaturne klimatske razlike, broj sunčanih sati i osvetljenost terena, kao i količina padavina imaju veliki uticaj na stepen fenolne zrelosti grožđa, a samim tim i na fenolni sastav vina. Naime, čini se da su nepovoljniji meteorološki uslovi (obilne padavine i značajno manji broj sunčanih sati) u 2010. godini uslovi da vina proizvedena te godine imaju najniži sadržaj ukupnih fenola.

Fenolni profil vina

U cilju detekcije i kvantifikacije polifenolnih jedinjenja u vinu korišćena je tečna hromatografija sa ultraljubičastim detektorom sa nizom fotodioda (PDA) i masenim detektorom sa tri analizatora – trostruki kvadrupol (engl. triple quadrupole – QQQ) (LC-MS/MS). Dobijeni rezultati su pokazali da su najzastupljenija fenolna jedinjenja u svim analiziranim uzorcima vina (+)-katehin i galna kiselina, sa najvećim izmerenim vrednostima $43,22 \pm 0,33$ mg/L za koncentraciju (+)-katehina i $28,65 \pm 0,42$ mg/L za koncentraciju galne kiseline u uzorku merlo vina iz 2012. godine. Opseg izmerenih koncentracija ovih jedinjenja u analiziranim crvenim vinima u skladu je sa prethodno publikovanim vrednostima (44,63–67). Komercijalno vino sorte vranac sadržalo je znatno manje (+)-katehina u odnosu na vina dobijena od klonova CI, CII i CIII. Poređenjem komercijalno dostupnog i klonskih vina sorte merlo može se primetiti da je najniža srednja vrednost koncentracije galne kiseline izmerena u komercijalno dostupnom vinu iz 2010 i 2011. godine ($10,23 \pm 0,22$ mg/L i $13,39 \pm 0,34$ mg/L). Slične koncentracije galne kiseline nađene su u klonskim vinima (022, 025 i 029) merlo sorte poreklom iz Srbije [53,68]. S druge strane, koncentracija galne kiseline izmerena u okviru ove studije znatno je veća u odnosu na koncentraciju nađenu u merlo vinu poreklom iz Srbije ispitivanom u studiji Beara i sar., 2017 [69]. Isti je slučaj i sa (+)-katehinom; najsiromašnije vino je komercijalno dostupno merlo vino iz 2010. godine ($16,98 \pm 0,36$ mg/L), dok je najmanja koncentracija (+)-katehina u 2011. godini nađena takođe u komercijalno dostupnom vinu ($23,10 \pm 0,21$ mg/L). Koncentracija (-)-epikatehina u analiziranim vinima kretala se u opsegu od $2,96 \pm 0,04$ do $21,74 \pm 0,28$ mg/L. Sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina u analiziranim klonskim vinima je višestruko veći u odnosu na klonska vina (022, 025 i 029) merlo sorte poreklom

iz Srbije [68]. Opseg izmerenih vrednosti za sadržaj kvercetina u okviru analiziranih uzoraka kretao se od $0,27 \pm 0,01$ do $6,10 \pm 0,09$ mg/L. Klonska vina sorte merlo sadržala su više kvercetina i miricetina u odnosu na komercijalno dostupno vino. Glukozidna forma resveratrola (piceid) zastupljenija je u odnosu na sam resveratrol što je očekivano jer u crvenom vinu piceid može biti i do deset puta zastupljeniji u odnosu na sam resveratrol. U vinima sorte vranac očigledna je njihova najveća zastupljenost u uzorcima iz 2010. godine. Kišovita 2010. godina je očigledno pogodovala većem stvaranju fitoaleksina resveratrola. Ukupna koncentracija resveratrola i njegovih glukozida u okviru merlo vina 2011. godišta manja je u komercijalno dostupnom vinu u odnosu na klonska vina VCR1 i VCR101. Koncentracije *trans*-piceida i *trans*-resveratrola izmerene u ovoj studiji u skladu su sa vrednostima nađenim u makedonskim vinima iste sorte u okviru studije Kostadinović i sar. 2012 [70]. Najzastupljenije jedinjenje iz grupe derivata hidroksicimetne kiseline je kafeinska kiselina. Sadržaj ovog jedinjenja nađen u uzorcima vina vranac u saglasnosti je sa sadržajem nađenim u vinima iste sorte i istog geografskog porekla u studiji Pajović-Šćepanović i sar., 2018 [67].

ELEMENTALNI SASTAV VINA

Za određivanje koncentracije makroelemenata (Ca, Na, K, Mg i Fe) u okviru ove studije korišćen je optički emisioni spektrometar sa indukovanom spregnutom plazmom (ICP-OES), iCAP-6500 Duo, Thermo Scientific, UK, koji poseduje CID86 čip detektor. Određivanje koncentracije preostalih šesnaest mikroelemenata (Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Sb, Ba, Tl, Pb), kao i elemenata prisutnih u tragovima, urađeno je na masenom spektrometru sa indukovanom spregnutom plazmom (ICP-MS), iCAP Q, Thermo Scientific X series 2, UK. Visok odnos koncentracija kalijuma i natrijuma pronađen u svim analiziranim vinima veoma je važan za normalno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema kod ljudi. Analizirana vina su značajan izvor i kalijuma, kalcijuma i magnezijuma, elemenata koji su esencijalni za funkcionisanje ljudskog organizma [71]. Najzastupljeniji mikroelement u analiziranim uzorcima je gvožđe. Nađena koncentracija ovog elementa je bila ispod 6 mg/L, što se smatra graničnom vrednošću pri kojoj može doći do stvaranja zamućenja vina [72]. Iz istog razloga je važno i to što je koncentracija bakra u svim analiziranim uzorcima ispod 1 mg/L [72]. Osim toga, bakar je element koji može ispoljiti prooksidativno dejstvo pri dozama iznad 1 mg/L [72]. Niža koncentracija od date, koja je nađena u svim analiziranim uzorcima, ukazuje na netoksičan nivo bakra u njima [12,73]. Sadržaj cinka u svim uzorcima je u skladu sa vrednostima dozvoljenim od strane OIV (do 5 mg/L) [74]. Uzorak merlo vina iz 2012. godine je, među komercijalnim vinima, uzorak sa najvećim sadržajem gvožđa, cinka, mangana i aluminijuma, dok je sadržaj bakra znatno veći u uzorcima vina merlo 2012 i vranac 2010 u poređenju sa svim ostalim uzorcima. Gvožđe, bakar i cink su elementi važni za funkcionisanje proteina uključenih u transfer elektrona pa je njihov unos neophodan za održanje redoks balansa u organizmu [75]. Koncentracija bakra znatno varira u uzorcima klonskih sortnih vina vranac u zavisnosti od godine proizvodnje. Tako primera radi, uzorak CI iz 2012. godine sadrži 15 puta više bakra u odnosu na uzorak istog vina iz 2011. godine. Ovakav rezultat može biti posledica različitih spoljašnjih faktora, kao što su između ostalih, transportovanje i čuvanje uzoraka. Izmerene koncentracije Fe, Cu, Mn i Zn u analiziranim vinima u skladu su sa prethodno dobijenim vrednostima u hrvatskim i češkim crvenim vinima [76,77]. Još jedan od esencijalnih elemenata crvenih vina, selen, kvantifikovan je u većini analiziranih uzoraka. Populacioni preporučeni unos selena od strane Naučne komisije za hranu u Evropskoj uniji iznosi 55 µg/dan [78]. Uzorak vina najbogatiji selenom je merlo 2011, dok je kaberne sovignon 2011 jedini uzorak pomenute sorte koji sadrži selen.

Vrednosti dobijene za koncentraciju teških metala arsena, kadmijuma i olova u ovoj studiji su ispod granica toksičnosti naznačenih od strane evropske direktive kao i od strane OIV [20] ($0,20$ mg/L za As, $0,01$ mg/L za Cd i $0,15$ mg/L za Pb). Koncentracije elemenata prisutnih u tragovima, hroma, nikla, kobalta i vol-

frama u analiziranim uzorcima u okviru su ranije publikovanih vrednosti [76,77]. Na osnovu dobijenih rezultata merenja takođe se može zaključiti da je koncentracija potencijalno toksičnih elemenata (Pb, As, Cd, Ni, Sb) daleko ispod određenih granica, pri čemu je uzet u obzir unos datih elemenata (TDI, TWI, PTWI i BMDL01) u okviru preporučene dnevne doze (1–2 čaše) vina. Iako nisu definisane dozvoljene koncentracije mangana u vinu, vrednosti dobijene u ovoj studiji u skladu su sa literaturnim podacima [76,77].

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST VINA

Spektrofotometrijsko određivanje

Anti-DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka komercijalnih vina ispitana je pomoću UV-Vis spektrofotometrije. Dobijeni rezultati jasno pokazuju da komercijalno dostupna vina sorti merlo i kaberne sovignon imaju znatno veću anti-DPPH radikalsku aktivnost u odnosu na vino sorte vranac. Anti-DPPH radikalska aktivnost vina sorte vranac 2011. i 2012. godine proizvodnje znatno je veća u odnosu na vino iz 2010. godine. Pozitivne korelacije između anti-DPPH radikalske aktivnosti i koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i monomernih antocijana ukazali su na pozitivan doprinos koji date klase jedinjenja imaju u odnosu na anti-DPPH radikalsku aktivnost. Slične korelacije su pronađene i publikovane u pređašnjim studijama [50,79-81]. Poređenjem anti-DPPH radikalske aktivnosti uzoraka vina sorte merlo može se zaključiti da uzorci klonskih vina VCR1 i VCR101 imaju znatno veću aktivnost u odnosu na komercijalno dostupno vino, kao i da su anti-DPPH aktivnosti svih merlo vina iz 2011. godine veća u odnosu na vina iz 2010. godine proizvodnje. Dobijeni korelacioni dijagrami i u slučaju ovih vina ukazuju na odličnu pozitivnu korelaciju između dobijene anti-DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola ($R^2 = 0,91$). Merlo vina iz 2011. godine proizvodnje takođe pokazuju i aktivnosti u odnosu na ABTS, hidroksil i superoksid radikale. Dok su anti-DPPH i anti-ABTS testovi odabrani kao najčešće korišćeni antiradikalni testovi u analizi prirodnih proizvoda, ispitivanje anti-hidroksil i anti-superoksid radikalske aktivnosti od posebne je važnosti s obzirom na to da su dati radikali prirodno prisutni u živim organizmima. Za razliku od superoksid radikala, koji može biti detoksikovao dejstvom enzima superoksid dismutaze, hidroksil radikal se može eliminisati samo neenzimskim putem [67]. Merlo vina iz 2011. godine proizvodnje pokazala su redukujuću aktivnost u FRAP eseju ekvivalentnu redukujućoj aktivnosti od 3,52 do 3,62 mg askorbinske kiseline po mL vina. To znači da jedna čaša vina (200 mL) ima redukujuću sposobnost kao 704 do 724 mg askorbinske kiseline. Dobijeni rezultati navode na zaključak da konzumiranje crvenog vina u umerenim količinama ima pozitivan uticaj na održavanje redoks balansa u uslovima *in vitro*.

Ciklična voltametrija i klasična polarografija

Ciklična voltametrija je u ovoj studiji korišćena kao brza i pouzdana metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka vina, kao alternativna metoda tradicionalnim spektrofotometrijskim tehnikama. U prethodnim studijama ova metoda je uspešno korišćena za određivanje fenolnog sadržaja u vinima i za korelaciju analitičkog odgovora sa antioksidativnim kapacitetom datih uzoraka [82-84]. Ova tehnika služi za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti. Kako bi se obuhvatile sve grupe antioksidativnih jedinjenja snimani su voltamogrami pri potencijalu od 0 do 1,3 V. Površina ispod voltamograma u anodnom smeru proporcionalna je koncentraciji antioksidanata prisutnih u analiziranim uzorcima i predstavlja antioksidativni kapacitet uzorka. Za poređenje antioksidativnog kapaciteta analiziranih uzoraka vina korišćen je Q600 faktor, kao i antioksidativni kompozitni indeks (ACI) izražen u procentima. Analizom klonskih vina sorte vranac dobijeni rezultati su pokazali da se u voltamogramu uzorka CIII vidi drastično povećanje Q600 faktora i ACI indeksa, što ukazuje na najveću antioksidativnu aktivnost ovog klonskog vina među

uzorcima iz 2010. i 2011. godine [85]. Sa druge strane, u grupi uzoraka 2012. godine proizvodnje, CII uzorak se ističe najvećom antioksidativnom aktivnošću.

Antioksidativna aktivnost odabranih uzoraka merlo vina praćena je i metodom klasične polarografije. Antioksidativna aktivnost je praćena kroz smanjenje granične anodne struje nastale usled stvaranja HPMC kompleksa u baznim rastvorima vodonik peroksida. Posmatran je efekat različitih vina na smanjenje polarografske struje kroz zavisnost procenta opadanja početne anodne struje u odnosu na zapreminu gradijentno dodavanih alikvota ispitivanih vina. Nagib linearnog dela dobijenih krivih (pomnožen sa 1000) iskorišćen je za izražavanje antioksidativnog kapaciteta uzoraka u %/mL analiziranih vina. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je najveće smanjenje osnovnog pika anodne struje primećeno pri dodavanju uzorka merlo VCR101 vina iz 2011. godine, pa je samim tim i antioksidativni potencijal datog uzorka najveći ($194,8 \pm 6,6$ %/mL). Polarografski esej je u ranijim studijama korišćen u analizi antioksidativne aktivnosti jakih alkoholnih pića, kao i belih i crvenih komercijalno dostupnih vina [50,86,87]. Međutim, u okviru ove studije pomenutom metodom po prvi put su analizirana specifična klonska vina.

Antioksidativna aktivnost odabranih uzoraka vina u ćelijama kvasca

Antioksidativna aktivnost analiziranih vina merlo sorte 2011. godine proizvodnje praćena je u ćelijama kvasca prethodno tretiranim vodonik peroksidom kroz stepen preživljavanja (SP) ćelija *S. cerevisiae*, sadržaj T-SH grupa, kao i kroz aktivnost antioksidativnih enzima glutathion peroksidaze (GPx), glutathion reduktaze (GR) i katalaze (Cat). U ovom testu uočeno je da izlaganje ćelija kvasca vodonik peroksidu smanjuje njihov stepen preživljavanja na 33% u poređenju sa kontrolnim ćelijama kvasca koje su tretirane samo 13% etanolom (100% preživljavanje). Pretretmanom ćelija kvasca svim analiziranim vinima raste njihova brzina preživljavanja u uslovima stresa, pri čemu je najizraženiji zaštitni efekat primećen za vino dobijeno od VCR1 klona vinove loze [88]. Pomenuti uzorak je i najbogatiji galnom kiselinom, (+)-katehinom, ukupnim resveratrolom i kvercetinom, pa se može pretpostaviti da su upravo pomenuta jedinjenja zaslužna za najveći stepen preživljavanja ćelija kvasca zahvaljujući izraženoj antiradikalnoj aktivnosti.

U ćelijama kvasca stresiranim vodonik peroksidom dolazi do značajnog povećanja aktivnosti enzima Cat, kao i značajno smanjenje GPx aktivnosti. Oba enzima katalizuju reakcije redukcije vodonik peroksida, mada u ovom slučaju, Cat preuzima dominantnu ulogu u odbrani od oksidativnog napada izazvanog izlaganjem vodonik peroksidu. Dalje je primećeno da svi analizirani uzorci vina pomeraju antioksidativnu odbranu sa katalazne strane, što je dominantno u ćelijama kvasca stresiranim vodonik peroksidom, na GPx-dominantnu odbranu [88]. Naime, pretretman ispitivanim uzorcima vina prevenira pad u aktivnosti GPx usled dejstva vodonik peroksida, pri čemu je efekat vina dobijenog od VCR101 klona vinove loze najveći. Aktivnost GPx u stresiranim ćelijama kvasca prethodno tretiranim datim vinom je više nego dva puta veća u odnosu na kontrolne ćelije. Sa druge strane, aktivnost GR je značajno povećana u ćelijama kvasca stresiranim vodonik peroksidom, što je u saglasnosti sa povećanim sadržajem T-SH grupa koji je izmeren u ovim ćelijama. Ovo zapažanje bi moglo ukazati na to da je smanjenje aktivnosti GPx u ćelijama kvasca tretiranim vodonik peroksidom pre usledilo zbog post-translatornih modifikacija koje su uticale na funkciju GPx, nego zbog smanjenja sadržaja ko-supstrata GSH. Analiza PCA rezultata dobijenih u okviru ispitivanja antioksidativne aktivnosti pokazuje da sva testirana vina pokazuju protektivan efekat u odnosu na stepen preživljavanja ćelija kvasca tretiranim vodonik peroksidom, dok povećana aktivnost GPx može biti jedan od bioloških mehanizama koji najviše doprinosi dokazanom protektivnom efektu. Ovakva zapažanja u saglasnosti su sa prethodno objavljenim literaturnim podacima [89,90].

Veštačka neuronska mreža

Sve promenljive uzete u obzir u analizi PCA takođe su iskorišćene za ANN (engl. *Artificial Neural Network*) modeliranje koje je u ovoj studiji po prvi put iskorišćeno u predviđanju aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na malu promenu koncentracije fenola u vinima. ANN model je dao prilično dobra predviđanja eksperimentalnih rezultata (SP, T-SH, GPx, GR i Cat), za širok opseg promenljivih. Dobijene vrednosti odgovaraju nivou eksperimentalnih greški, a prikazuju uticaj sadržaja fenolnih jedinjenja na antioksidativnu aktivnost vina izraženu pomoću SP, sadržaja T-SH grupa i aktivnosti GPx, GR i Cat. Analiza osetljivosti služi da pokaže uticaj ulaznih promenljivih, ali takođe pokazuje i značaj ulazne promenljive u određenoj tački ulaznog prostora [91]. Primećeno je da na SP najveći pozitivni uticaj imaju male promene u sadržaju tR, Qe i K, dok najveći negativni uticaj imaju male promene u sadržaju cP, cR i tP u sredini ulaznog prostora. Na sadržaj T-SH najveći pozitivni efekat imaju male promene u sadržaju ukupnih fenola u oblasti minimuma ulaznog prostora, dok je najveći negativni uticaj primećen pri malim promenama u sadržaju cR u centralnom delu ulaznog prostora. Na aktivnost GPx najpozitivnije deluju male promene u koncentraciji tR blizu gornje granice ulaznog prostora. Takođe je primećeno da tR ima isti šablon delovanja na aktivnost GPx kao i na SP. Pozitivan efekat tR na aktivnost GPx prikazan je u ranijim naučnim radovima [92,93]. GA takođe pokazuje isti šablon pozitivnog uticaja na aktivnost GPx kao i na SP u središnjem delu ulaznog prostora, gde koncentracija cP negativno utiče na date parametre. Dobijeni rezultati podržavaju ranije zapažanje o tome da je aktivnost GPx glavna odgovorna za povećanje SP u ćelijama kvasca stresiranim vodonik peroksidom i prethodno tretiranim analiziranim vinima. Ono što je takođe primećeno jeste da je aktivnost GR pod najvećim pozitivnim uticajem pri malim promenama u koncentraciji cP, dok najnegativniji uticaj na aktivnost GR pokazuju male promene u koncentraciji tR i PK u centralnom delu ulaznog prostora. Ovi nalazi su u skladu sa PCA kao i sa eksperimentalnim merenjima.

CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ODABRANIH UZORAKA VINA

Citotoksična aktivnost analiziranih uzoraka merlo vina 2011. godine proizvodnje ispitana je u odnosu na četiri kancerske ćelijske linije (HCT116 – ćelijska linija kancera creva, HeLa – ćelijska linija kancera cerviksa, A375 – ćelijska linija melanoma i PANC-1 – ćelijska linija kancera pankreasa). Posmatran je efekat analiziranih vina u tri različita zapreminska procenta (5, 10 i 20%). Dobijeni rezultati su pokazali da sva analizirana vina imaju najslabiji citotoksični efekat na ćelijsku liniju PANC-1. Poređenjem citotoksičnog efekta na ćelijske linije A375 i HeLa, može se zaključiti da sva tri analizirana vina pokazuju veću aktivnost u odnosu na ćelijsku liniju A375. Dalje, poređenjem efekata vina na ćelijske linije HCT116 i HeLa može se primetiti da je taj efekat različit u odnosu na zapreminsku koncentraciju vina. Dok je pri 5 i 10% koncentraciji efekat svih vina sličan, pri 20% koncentraciji jače je dejstvo komercijalnog i vina VCR1 na ćelijsku liniju HCT116. Međusobnim poređenjem citotoksičnog efekata analiziranih vina pri zapreminskoj koncentraciji od 5% u okviru jedne kancerske ćelijske linije, može se primetiti sličan efekat sva tri vina u odnosu na sve četiri ćelijske linije. S druge strane, pri 20% zapreminskoj koncentraciji VCR101 vino najjače deluje na ćelije HeLa, dok komercijalno vino najslabije deluje na ćelijsku liniju A375.

Odnos GSH/GSSG

Prooksidativno dejstvo analiziranih uzoraka crvenog vina sorte merlo, 2011. godine proizvodnje na melanomsku ćelijsku liniju (A375) ispitano je kroz odnos GSH/GSSG u ćelijama tretiranim vinom u odnosu na netretiranu kontrolu. Dobijeni rezultati su pokazali da je GSH/GSSG odnos u kancerskim ćelijama tretiranim sa sva tri uzorka merlo vina znatno manji od onog nađenog u kontrolnim (netretiranim) ćelijama A375. Ta-

kođe se vidi da je u ćelijama tretiranim VCR101 vinom GSH/GSSG odnos najniži ($0,66 \pm 0,05$) i da je značajno niži u odnosu na odnos nađen u ćelijama tretiranim komercijalnim vinom ($0,85 \pm 0,02$) i ćelijama tretiranim VCR1 vinom ($0,76 \pm 0,03$). Tretman komercijalnim vinom manje pomera ravnotežu prema GSSG i u odnosu na tretman VCR1 uzorkom ($p < 0,05$). Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je uzrok pomerene GSH/GSSG ravnoteže prema GSSG prooksidativno dejstvo crvenih vina u ćelijama A375. Ovaj rezultat je od izuzetnog značaja imajući u vidu hemio- i radio-rezistentnost melanomskih ćelija. Dati zaključak je u skladu sa dosadašnjim naučnim pretpostavkama i saznanjima da polifenolna jedinjenja biljnog porekla upravo prooksidativnim dejstvom ispoljavaju svoju antikancerogenu aktivnost [29,33,94,95].

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ODABRANIH UZORAKA VINA

Radi ispitivanja antibakterijske aktivnosti analiziranih uzoraka vina merlo u ovoj studiji korišćen je MIC esej kroz izražavanje minimalne koncentracije vina koja sprečava rast bakterija u eksperimentalnim uslovima. U tu svrhu ispitana je antibakterijska aktivnost vina u odnosu na četiri soja Gram-pozitivnih i četiri soja Gram-negativnih bakterija u koncentracijskom opsegu vina od 0,25 do 500 $\mu\text{L/mL}$. Dobijeni rezultati su pokazali da sva vina u datom opsegu koncentracija dostižu odgovarajuće vrednosti MIC, čime je potvrđeno njihovo antibakterijsko dejstvo u odnosu na ispitivane bakterijske sojeve. Vrednosti MIC svih analiziranih vina kreću se od 125 do 500 $\mu\text{L/mL}$. Uzorak VCR1 2011 je uzorak sa najjačom ukupnom antibakterijskom aktivnošću u odnosu na osam ispitivanih bakterijskih sojeva. S obzirom na to da je uzorak VCR1 2011, uzorak sa najvećim sadržajem ukupnog resveratrola, (+)-katehina i kvercetina, pokazana antibakterijska aktivnost može biti s tim u vezi. Prethodne naučne studije su pokazale da su fenolna jedinjenja sposobna da ireverzibilno menjaju ćelijsku membranu bakterija, pri čemu je antibakterijska aktivnost direktno zavisna od strukture samih jedinjenja kao i da postoji sinergija u antibakterijskom delovanju flavonoida [96-98]. Takođe se može primetiti da je antibakterijska aktivnost svih ispitivanih uzoraka vina očekivano izrazito slabija od pozitivne kontrole, antibiotika amikacina.

ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije su pokazali da su sva analizirana vina bogat izvor fenolnih jedinjenja, kao i makro i mikro elemenata u okviru dozvoljenih ili uobičajenih granica. Uzorci analiziranih vina su ispoljili antioksidativnu aktivnost *in vitro*. Takođe je utvrđeno da sva analizirana merlo vina povećavaju stepen preživljavanja ćelija *S. cerevisiae* u uslovima oksidativnog stresa. Protektivni efekat analiziranih uzoraka vina prvenstveno je zasluga aktivnosti GPx. Pomoću ANN razvijena je brza i precizna metoda za predviđanje aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na malu promenu koncentracije fenolnih jedinjenja u vinima sa visokom tačnošću predviđanja ($R^2 = 0,98$). Rezultati posebno ukazuju na to da sadržaj *trans*-resveratrola u vinima u okviru izmerenih gornjih granica pozitivno utiče na aktivnost GPx i ćelijsko preživljavanje. Sva analizirana vina pokazuju citotoksičnu aktivnost u odnosu na četiri kancerske ćelijske linije. Najsnažnije dejstvo uočeno je u odnosu na melanomske ćelije i ćelijsku liniju kancera creva HCT116, dok je najslabije delovanje primećeno u odnosu na ćelijsku liniju kancera pankreasa. Prooksidativno dejstvo merlo vina potvrđeno je na melanomskim ćelijama. Analizirana vina merlo sorte pokazuju i antibakterijsku aktivnost u odnosu na osam patogenih bakterijskih sojeva.

Ova studija predstavlja jednu od retkih studija baziranih na kombinaciji klasičnih i savremenih eksperimentalnih metoda u karakterizaciji crvenih vina. S druge strane, plastično je demonstrirano kako se primenom napredne statistike detaljnije može sagledati skrivena biološka aktivnost.

LITERATURA

1. Geana EI, Marinescu A, Iordache AM, Sandru C, Ionete RE, Bala C. Differentiation of Romanian Wines on Geographical Origin and Wine Variety by Elemental Composition and Phenolic Components. *Food Anal Methods*. 2014;7(10):2064–74.
2. Ivanova-Petropulos V, Jakabová S, Nedelkovski D, Pavlík V, Balážová Ž, Hegedűs O. Determination of Pb and Cd in Macedonian Wines by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS). *Food Anal Methods*. 2015;8(8):1947–52.
3. Fragopoulou E, Choleva M, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. *Metabolism*. 2018 Jun 1;83:102–19.
4. Maras V, Bogicevic M, Tomic M, Kodzulovic V, Sucur S, Cizmovic M, et al. Ampelometric, Genetic and Sanitary Evaluation of CV. Vranac. *Bull UASVM Hortic*. 2011;68(1).
5. Lorrain B, Chira K, Teissedre P-L. Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem*. 2011 Jun 15;126(4):1991–9.
6. Vujović D, Maletić R, Popović-Đorđević J, Pejin B, Ristić R. Viticultural and chemical characteristics of muscat hamburg preselected clones grown for table grapes. *J Sci Food Agric*. 2016;(April).
7. Mannini F. Clonal selection in grapevine: Interactions between genetic and sanitary strategies to improve propagation material. Vol. 528, *Acta Horticulturae*. 2000. p. 703–12.
8. Stockley C, Teissedre P-L, Boban M, Di Lorenzo C, Restani P. Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: a review. 2012. p. 995–1007.
9. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Env Chem Lett*. 2006;4:147–57.
10. Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R. Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J Agric Food Chem*. 2006;54:7692–702.
11. Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Phenolic Compounds. In: *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2006. p. 141–205.
12. Rentzsch M, Wilkens A, Winterhalter P. Non-flavonoid Phenolic Compounds. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. 2009. p. 509–21.
13. Pozo-Bayon AM, Hernandez TM, Martin-Alvarez PJ, Polo CM. Study of Low Molecular Weight Phenolic Compounds during the Aging of Sparkling Wines Manufactured with Red and White Grape Varieties. *J Agric Food Chem*. 2003;51:2089–95.
14. Cvejic JM, Djekic S V., Petrovic A V., Atanackovic MT, Jovic SM, Brceski ID, et al. Determination of trans- and cis-Resveratrol in Serbian Commercial Wines. *J Chromatogr Sci*. 2010;48:229–34.
15. Regev-Shoshani G, Shoseyov O, Bilkis I, Kerem Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem J*. 2003 Aug 15;374(Pt 1):157–63.
16. Cheynier V, Dueñas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet J-M, Sarni-Manchado P, et al. Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *Am J Enol Vitic*. 2006;57:298–305.
17. Đorđević N, Novaković M, Pejin B, Živković M, Savić A, Mutić J, et al. An insight into chemical composition and biological activity of Montenegrin Vranac red wine. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2018 Jan 7;230:142–8.
18. Nicolini G, Larcher R, Pangrazzi P, Bontempo L. Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis*. 2004;43(1):41–5.
19. Catarino S, Curvelo-Garcia AS, Sousa RB. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches. *Talanta*. 2006;70(5):1073–80.
20. OIV. International code of eonological practices. Vol. 33. 2017. 441 p.
21. Almeida CM, Vasconcelos MT. Multielement Composition of Wines and Their Precursors Including Provenance Soil and Their Potentialities As Fingerprints of Wine Origin. *Food Chem*. 2003;51:4788–98.
22. Woraratphoka J, Intarapichet K, Indrapichate K. Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chem*. 2007;104(4):1485–90.
23. Lima GPP, Vianello F, Corrêa Renata C, Campos RA da S, Borguini MG. Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. Vol. 05, *Food and Nutrition Sciences*. 2014. p. 1065–82.

24. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* (London, England). 1992 Jun 20;339(8808):1523–6.
25. Youdim KA, McDonald J, Kalt W, Joseph JA. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *J Nutr Biochem*. 2002;13(5):282–8.
26. Vujovic D, Pejin B, Djordjevic JP, Kosovic A, Velickovic M. An Insight Into Selected Properties of Merlot Wines Obtained from Three New Clone Candidates. *Rev Chim*. 2016;67(5):998–1000.
27. Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*. 2009;14:2202–11.
28. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996 Jan 1;20(7):933–56.
29. De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. Vol. 35, *Biochemical Society Transactions*. 2007. p. 1156–60.
30. Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. Vol. 33, *European Journal of Clinical Investigation*. 2003. p. 818–23.
31. Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res*. 2003;35:509–14.
32. Zhang X, Lin D, Jiang R, Li H, Wan J, Li H. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. Vol. 36, *Oncology Reports*. 2016. p. 271–8.
33. Ahmad A, Farhan Asad S, Singh S, Hadi S. DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer Lett*. 2000 Jun 1;154(1):29–37.
34. Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM. Oral administration of copper to rats leads to increased lymphocyte cellular DNA degradation by dietary polyphenols: implications for a cancer preventive mechanism. *BioMetals*. 2011 Dec 30;24(6):1169–78.
35. Erasto P, Bojase-Moleta G, Majinda RR. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry*. 2004 Apr 1;65(7):875–80.
36. Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 2002 Oct 1;73(6):536–9.
37. Wen A, Delaquis P, Stanich K, Toivonen P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol*. 2003 Jun 1;20(3):305–11.
38. Jaisinghani RN. Antibacterial properties of quercetin. Vol. 8, *Microbiology Research*. 2017.
39. Yixi X, Weijie Y, Fen T, Xiaoqing C, Licheng R. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Curr Med Chem*. 2015;22(1):132–49.
40. Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. Vol. 51, *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007. p. 116–34.
41. Đorđević NO, Novaković MM, Pejin B, Mutić JJ, Vajs VE, Pajović SB, et al. Comparative analytical study of the selected wine varieties grown in Montenegro. *Nat Prod Res*. 2017;31(15):1825–30.
42. Ivanova-Petropulos V, Ricci A, Nedelkovski D, Dimovska V, Parpinello GP, Versari A. Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chem*. 2015;171:412–20.
43. Bogicevic M, Maras V, Mugoša M, Kodžulović V, Raičević J, Šućur S, et al. The effects of early leaf removal and cluster thinning treatments on berry growth and grape composition in cultivars Vranac and Cabernet Sauvignon. *Chem Biol Technol Agric*. 2015;2(1):1–8.
44. Ilieva F, Kostadinović Veličkovska S, Dimovska V, Mirhosseini H, Spasov H. Selection of 80 newly isolated autochthonous yeast strains from the Tikveš region of Macedonia and their impact on the quality of red wines produced from Vranec and Cabernet Sauvignon grape varieties. *Food Chem*. 2017;216:309–15.
45. Kallithraka S, Tsoutsouras E, Tzourou E, Lanaridis P. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem*. 2006;99(4):784–93.
46. Gris EF, Mattivi F, Ferreira EA, Vrhovsek U, Filho DW, Pedrosa RC, et al. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *J Food Compos Anal*. 2013;31(1):31–40.
47. Casassa LF, Bolcato E a., Sari SE. Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food Chem*. 2015;174:110–8.

48. Košmerl T, Bertalančič L, Maraš V, Kodžulović V, Šučur S, Abramović H. Impact of Yield on Total Polyphenols, Anthocyanins, Reducing Sugars and Antioxidant Potential in White and Red Wines Produced from Montenegrin Autochthonous Grape Varieties. *Food Sci Technol*. 2013;1(1):7–15.
49. Radovanovic B, Radovanovic A, Tomic V. Relations between the phenolic composition and free radical scavenging, and antibacterial activities of red wines from different cultivars of *Vitis vinifera* L. *Int J Food Prop*. 2012;15(4):725–35.
50. Gorjanović SZ, Novaković MM, Potkonjak NI, Sužnjević DZ. Antioxidant Activity of Wines Determined by a Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenge. *J Agric Food Chem*. 2010 Apr 28;58(8):4626–31.
51. Fernández-Pachón MS, Villaño D, García-Parrilla MC, Troncoso a. M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chim Acta*. 2004;513(1):113–8.
52. Dimitrovska M, Tomovska E, Bocevska M. Characterisation of Vranec, Cabernet Sauvignon and Merlot wines based on their chromatic and anthocyanin profiles. *J Serbian Chem Soc*. 2013;78(9):1309–22.
53. Vujovic D, Pejin B, Popovic Djordjevic J, Velickovic M, Tesevic V. Phenolic natural products of the wines obtained from three new Merlot clone candidates. *Nat Prod Res*. 2016;30(8):987–90.
54. Vujović DS, Žunić DM, Popović BS, Pantelić MM, Popović-Djordjević JB. Agrobiological and wine quality traits of *Vitis vinifera* cv. Merlot clones selected in Serbia. *J Int des Sci la Vigne du Vin*. 2015;49(4):267–74.
55. Žurga P, Vahčić N, Pasković I, Banović M, Staver MM. Croatian Wines from Native Grape Varieties Have Higher Distinct Phenolic (Nutraceutic) Profiles than Wines from Non-Native Varieties with the Same Geographic Origin. *Chem Biodivers*. 2019;16(8).
56. Majkić TM, Torović LD, Lesjak MM, Četojević-Simin DD, Beara IN. Activity profiling of Serbian and some other European Merlot wines in inflammation and oxidation processes. *Food Res Int*. 2019;121:151–60.
57. Mercurio MD, Smith PA. Tannin quantification in red grapes and wine: Comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. Vol. 56, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. p. 5528–37.
58. Harbertson JF, Hodgins RE, Thurston LN, Schaffer LJ, Reid MS, Landon JL, et al. Variability of Tannin Concentration in Red Wines. *Am J Enol Vitic*. 2008;59(2):210–4.
59. Radovanović A, Radovanović B, Jovančičević B. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chem*. 2009;117(2):326–31.
60. Ivanova V, Stefova M, Chinnici F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J Serbian Chem Soc*. 2010;75(1):45–59.
61. Blanco-Vega D, Gomez-Alonso S, Hermosin-Gutierrez I. Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines. *Food Chem*. 2014;158:449–58.
62. Hosu A, Cristea V, Cimpoiu C. Analysis of total phenolic , flavonoids , anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem*. 2014;150:113–8.
63. Radovanović AN, Jovančičević BS, Radovanović BC. Antimicrobial Effectiveness of Selected Vranac Wines Against Six Gram-Positive and Six Gram-Negative Bacterial Strains. *Trop J Pharm Res*. 2014;13(May):819–24.
64. Anli RE, Vural N. Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules*. 2009;14(1):289–97.
65. Gambelli L, Santaroni GP. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *J Food Compos Anal*. 2004;17(5):613–8.
66. La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicanò T, Dugo G. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem*. 2006;94(4):640–50.
67. Pajović-Šćepanović R, Wendelin S, Eder R. Phenolic composition and varietal discrimination of Montenegrin red wines (*Vitis vinifera* var. Vranac, Kratošija, and Cabernet Sauvignon). *Eur Food Res Technol*. 2018;244(12):2243–54.
68. Pantelić M, Dabić Zagorac D, Natić M, Gašić U, Jović S, Vujović D, et al. Impact of clonal variability on phenolics and radical scavenging activity of grapes and wines: A study on the recently developed Merlot and Cabernet Franc clones (*Vitis vinifera* L.). *PLoS One*. 2016;11(10):1–15.
69. Beara IN, Torović LD, Pintač D, Majkić TM, Orčić DZ, Mimica-Dukić NM, et al. Polyphenolic profile, antioxidant and neuroprotective potency of grape juices and wines from Fruška Gora region (Serbia). *Int J Food Prop*. 2018;20(3):S2552–68.

70. Kostadinović S, Wilkens A, Stefova M, Ivanova V, Vojnoski B, Mirhosseini H, et al. Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices. *Food Chem.* 2012;135(4):3003–9.
71. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Sodium. *EFSA J.* 2005;209:1–26.
72. Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Dry Extract and Minerals. In: *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.* John Wiley & Sons; 2006. p. 102–4.
73. Mahmoudzadeh H. Clonal selection and superior cultivar selection of Iranian grape germplasm to cold hardiness. In: *XI International Conference on Grapevine Breeding and Genetics.* 2015. p. 255–8.
74. (OIV) IO of V and W. Compendium of international methods of wine and must analysis- Volume 1. 2018.
75. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr Opin Chem Biol.* 1999 Apr 1;3(2):220–5.
76. Kment P, Mihaljevič M, Ettler V, Šebek O, Strnad L, Rohlová L. Differentiation of Czech wines using multielement composition - A comparison with vineyard soil. *Food Chem.* 2005;91(1):157–65.
77. Vinković Vrček I, Bojić M, Žuntar I, Mendaš G, Medić-Šarić M. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chem.* 2011;124(1):354–61.
78. Kim B-H, Choi JS, Yi EH, Lee J-K, Won C, Ye S-K, et al. Relative Antioxidant Activities of Quercetin and Its Structurally Related Substances and Their Effects on NF- κ B/CRE/AP-1 Signaling in Murine Macrophages Byung-Hak. *Mol Cells.* 2013;35:410–20.
79. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Vol. 49, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2001. p. 2774–9.
80. Li N, Liu J-H, Zhang J, Yu B-Y. Comparative Evaluation of Cytotoxicity and Antioxidative Activity of 20 Flavonoids. *J Agric Food Chem.* 2008;56(10):3876–83.
81. Valente LMM, da Paixão D, do Nascimento AC, dos Santos PFP, Scheinvar LA, Moura MRL, et al. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food Chem.* 2010 Dec 15;123(4):1127–31.
82. Kilmartin P a, Zou H, Waterhouse AL. A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J Agric Food Chem.* 2001;49:1957–65.
83. De Beer D, Harbertson JF, Kilmartin PA, Roginsky V, Barsukova T, Adams DO, et al. Phenolics: A Comparison of Diverse Analytical Methods Dalene. *Am J Enol Vitic.* 2004;55(4):389–400.
84. Kilmartin PA, Honglei Z, Waterhouse AL. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. *Am J Enol Vitic.* 2002;53:294–302.
85. Đorđević NO, Pejin B, Novaković MM, Stanković DM, Mutić JJ, Pajović SB, et al. Some chemical characteristics and antioxidant capacity of novel Merlot wine clones developed in Montenegro. b. 2017;225(July):505–11.
86. Gorjanović SŽ, Novaković MM, Vukosavljević P V., Pastor FT, Tešević V V., Sužnjević DŽ. Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages. *J Agric Food Chem.* 2010;58(14):8400–6.
87. Sužnjević DŽ, Pastor FT, Gorjanović SŽ. Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta.* 2011 Sep 15;85(3):1398–403.
88. Đorđević NO, Todorović N, Novaković IT, Pezo LL, Pejin B, Maraš V, et al. Antioxidant Activity of Selected Polyphenolics in Yeast Cells: The Case Study of Montenegrin Merlot Wine. *Molecules.* 2018;23(1971):1–14.
89. Baroni M V., Di Paola Naranjo RD, García-Ferreira C, Otaiza S, Wunderlin DA. How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Sci Technol.* 2012;47(1):1–7.
90. Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni M V. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *J Funct Foods.* 2016;20:332–45.
91. Saltelli A, Annoni P. How to avoid a perfunctory sensitivity analysis. *Environ Model Softw.* 2010;25(12):1508–17.

92. Sadi G, Bozan D, Yildiz HB. Redox regulation of antioxidant enzymes: Post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem.* 2014;393(1–2):111–22.
93. Ourique GM, Finamor IA, Saccol EMH, Riffel APK, Pês TS, Gutierrez K, et al. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod Toxicol.* 2013;37(February 2013):31–9.
94. Khan HY, Zubair H, Faisal M, Ullah MF, Farhan M, Sarkar FH, et al. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: A mechanism for cancer chemopreventive action. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58:437–46.
95. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. Vol. 50, *IUBMB Life.* 2000. p. 167–71.
96. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. Vol. 19, *Microbial Drug Resistance.* 2013. p. 256–65.
97. Ma DSL, Tan LT-H, Chan K-G, Yap WH, Pusparajah P, Chuah L-H, et al. Resveratrol—Potential Antibacterial Agent against Foodborne Pathogens. *Front Pharmacol.* 2018;9:1–16.
98. Arima H, Ashida H, Danno G. Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem* ISSN. 2002;66:1009–14.

Dihidrohalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance

Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac

Odeljenje za fiziologiju biljaka, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu.

Kontakt: mariana.stanisic@ibiss.bg.ac.rs

Apstrakt

Sekundarni metaboliti jabuke (*Malus × domestica* Borkh.) florizin i floretin su dihidrohalkoni visoko specifični za vrste roda *Malus*. Autoalelopatski potencijal ovih fenolnih jedinjenja se ogleda u suzbijanju rasta klijanca i sadnica zasađenih na mestu prvobitnih voćnjaka jabuke. U osnovi njihove fitotoksičnosti su ultrastrukturne i molekularne promene koje se ogledaju u povećanju sadržaja malondialdehida, prolina i aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid-dismutaze, peroksidaza i katalaza, kao i nivoa ekspresije proteina uključenih u odbrambene mehanizme ćelije. Najnovija istraživanja ukazuju na fitotoksičnost ovih dihidrohalkona i prema drugim biljnim vrstama, kao npr. korovskoj model biljci *Arabidopsis thaliana*. Tretman floretinom izaziva značajnu inhibiciju rasta i razvika klijanaca *A. thaliana*, poremećaj gravitropskog odgovora i pojavu morfoloških i ultrastrukturnih malformacija u čijoj osnovi leži promena ekspresije *CDKA1;1*, *CDKB2;1*, *CYCA3;1* i *CYCB2;4* gena ćelijskog ciklusa, kao i gena uključenih u održanje homeostaze auksina (*PINs*, *AUX1*, *LAX3*, *ABCBs*, *TAA1* i *YUCs*) i biosinteze giberelina (*GA20ox2* i *GA3ox1*). Ovo otvara mogućnost za dalja istraživanja njihovog alelopatskog delovanja ali i potencijalnu primenu kao ekološki bezbednih bioherbicida.

Ključne reči: alelopatija, dihidrohalkoni, fenolna jedinjenja, floretin, florizin, jabuka (*Malus × domestica* Borkh.)

Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals

Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac

Institute for Biological Research 'Siniša Stanković' - National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade

Correspondence: mariana.stanistic@ibiss.bg.ac.rs

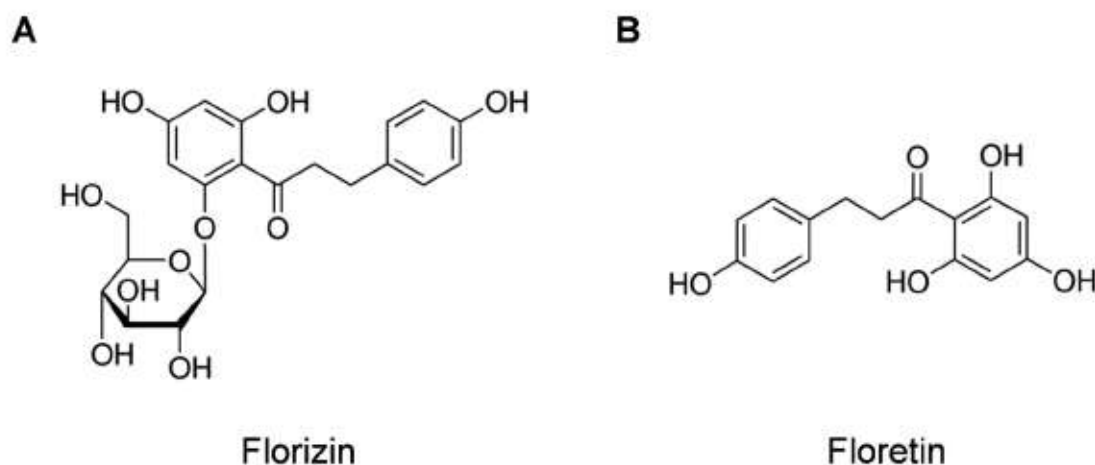
Abstract

Phloridzin and phloretin are dihydrochalcones highly specific to domestic apple (*Malus × domestica* Borkh.) and other species from genus *Malus*. Auto-allelopathic potential of these phenolics was recognized in 'Apple Replant Disease' (ARD) characterized by stunted growth, reduced root system and low yields in apple trees replanted on lands that previously supported apple orchards. Physiological basis of phloridzin and phloretin autotoxicity are ultrastructural and molecular alterations that include increased catalase, peroxidases and superoxide dismutase activities, raised malondialdehyde and proline contents, and high expression of genes involved in cell defence system. The latest research on model plant *Arabidopsis thaliana* indicates phytotoxicity of these dihydrochalcones towards other plant species. Phloretin inhibits *A. thaliana* seedlings growth and development inducing agravitropic phenotype and morphological and ultrastructural malformations in treated seedlings. Altered expression of *CDKA1;1*, *CDKB2;1*, *CYCA3;1* and *CYCB2;4* cell cycle genes and genes involved in auxin homeostasis (*PINs*, *AUX1*, *LAX3*, *ABCBs*, *TAA1* and *YUCs*) and gibberellin biosynthesis (*GA20ox2* and *GA3ox1*) are in the physiological bases of phloretin phytotoxicity. This mechanism makes phloretin a prospective candidate for an eco-friendly bioherbicide and paves the way for further research of phloretin role in ARD.

Key words: allelopathy, dihydrochalcones, apple (*Malus × domestica* Borkh.), phenolics, phloretin, phloridzin

Alelopatija je od davnina poznata kao pojava da jedna biljna vrsta suzbija i kontroliše rastenje i razviće biljaka u svom okruženju, što joj omogućava efikasnije korišćenje dostupnih resursa. Hemijska jedinjenja koja ispoljavaju alelopatske efekte nazivaju se alelohemikalijama. Većina ovih jedinjenja su sekundarni metaboliti koji nastaju kao nusprodukti primarnih metaboličkih puteva. Alelohemikalije mogu biti prisutne kako u vegetativnim, tako i u reproduktivnim biljnim organima, ali se njihove koncentracije mogu značajno razlikovati među organima pa čak i tkivima iste biljne vrste [1]. Ova jedinjenja najčešće dospevaju u zemljište eksudacijom korena, evaporacijom ili spiranjem sa listova i stabla, ili degradacijom biljnih ostataka u zemljištu aktivnošću mikroorganizama [2].

Uprkos svojoj sveprisutnosti i raznovrsnosti, alelohemikalije mogu biti svrstane u tri osnovne grupe: (1) terpenoide, (2) jedinjenja koja sadrže azot (N) i (3) fenolna jedinjenja [3]. Dihidrohalkoni (DHH) su posebna grupa fenolnih jedinjenja u čijoj se osnovi nalaze dva šestočlana ugljenikova (C6) prstena povezana mostom od tri ugljenikova atoma dok je dvostruka veza koja je karakteristična za prekursore flavonoida – halkone, kod DHH redukovana (Slika 1). Specifičan izvor DHH u prirodi su vrste roda *Malus*, uključujući i domestifikovanu jabuku (*Malus × domestica* Borkh.) kod koje DHH čine do 96-97% ukupnih fenolnih jedinjenja u listovima [4,5].



Slika 1. Struktura dihidrohalkona florizina (A) i floretina (B). Preuzeto iz Stanišić. 2019 [77]

Florizin (floretin 2'-O-glukozid) (Slika 1A) je prvootkriveni i najzastupljeniji DHH kod vrsta roda *Malus* koji čini 4-18% suve mase listova jabuke [6]. Zbog svoje visoke zastupljenosti, florizin se koristi kao osnovni parametar za klasifikaciju vrsta roda *Malus* [7] za determinaciju filogenetičkih i fitogeografskih odnosa u okviru subfamilije Maloideae [8], i u prehrambenoj industriji kao marker za utvrđivanje prisustva jabuke u voćnim sokovima [9]. Skorašnji napredak u razvoju analitičkih metoda omogućio je detektovanje ovog jedinjenja u tragovima i kod drugih vrsta porodice Rosaceae kao što su jagoda (*Fragaria ananassa* Duch.) [10] i divlja ruža (*Rosa canina*) [11], ali i vrsta iz drugih porodica kao što su Fabaceae i Ericaceae [12,13]. Ključni korak u sintezi florizina jeste proces glikozilacije aglikona floretina (3-(4-hidroksifenil)-1-(2,4,6-trihidroksifenil)-1-propanona) na poziciji 2' pomoću specifične uridin-difosfat-glikoziltransferaze (UDP-glukoza:floretin 2'-O-glukosiltransferaze) [14]. Osim u listovima, florizin se u znatnim količinama nalazi i u korenu, stablu i kori

jabuke iz koje je prvi put i izolovan davne 1835. godine [15]. Ubrzo nakon toga, započela su i prva istraživanja vezana za efekat florizina u organizmu sisara, a značajniji rezultati vezuju se za istraživanja nemačkog fiziologa Joseph von Mering-a koji je izazvao eksperimentalnu glikozuriju kod pasa ubrizgavanjem čistog florizina [16]. Nakon jednog veka istraživanja mehanizma delovanja florizina u organizmu sisara, Alvarado i Crane [17] ga definišu kao inhibitora glukoznog transporta, a Vick i Deidrich [18] utvrđuju da je afinitet renalnog glukoznog transportera prema florizinu i do 3000 puta veći nego prema molekulu glukoze. Danas je poznato da florizin specifično inhibira SGLT1 Na-glukozni kotransporter glodara i SGLT2 kotransporter u apikalnom domenu epitelnih ćelija renalnih tubula čoveka [19]. Zbog sposobnosti da snizi nivo glukoze u krvi nezavisno od insulina, florizin je našao primenu u terapiji dijabetesa tipa 2 [20,21]. Inhibicija usvajanja glukoze u crevima i reasorpcije u bubrežnim tubulama omogućava smanjenje telesne mase pacijenata i čini ga veoma privlačnim prirodnim terapeutikom i u lečenju gojaznosti [22].

Pored florizina, kod vrsta roda *Malus* identifikovano je još najmanje deset drugih DHH koji se razlikuju po mestu vezivanja i specifičnosti šećerne grupe, a svi su derivati aglikona floretina [23]. Zahvaljujući tipičnoj DHH strukturi, floretin je veoma fleksibilan molekul koji može aktivno da stupa u reakciju sa drugim biomolekulima u ćeliji (Slika 1B). Za razliku od florizina, sadržaj floretina je dosta nizak [24] ili ga čak nije moguće detektovati u nekim tkivima jabuke [25,6,26] usled brze konverzije u rastvorljive, glikozilovane forme koje su stabilne, nereaktivne i pogodne za transportovanje [27]. Izražena reaktivnost floretina rezultuje brojnim farmakološkim svojstvima kao što su: antimikrobno, antikancerogeno, antioksidativno, estrogeno, antiinflamatorno, krioprotektivno i neuroprotektivno [28,29], što ga čini pogodnim za njegovu primenu u farmaciji, medicini i kozmetici.

Fiziološka uloga dihidrohalkona jabuke

Uprkos izuzetno visokom sadržaju florizina u jabuci, pogotovo u listovima i korenu, kao i zapaženom biološkom delovanju, fiziološka uloga floretina u biljkama još uvek nije sa sigurnošću utvrđena. Istraživanja sprovedena tokom prošlog veka su ukazala na inhibiciju formiranja cvetnih pupoljaka jabuke pod dejstvom florizina [30,31], kao i suzbijanje izduživanja koleoptila ovasa [32]. U uslovima kulture *in vitro* je primećeno da florizin dovodi do povećanja broja aksilarnih pupoljaka kod jabuke [33], kao i do povećanja broja korenova kod divlje sorte za kalemljenje M9 [34]. Egzogeno dodavanje florizina dovodi i do stimulacije procesa somatske organogeneze kod uljane palme [35]. Smatra se da visoka koncentracija florizina, kao dominantnog fenolnog jedinjenja u semenu, pogotovo semenjači, onemogućava dotok kiseonika do embriona nakon imbibicije i time sprečava početak klijanja ukoliko seme nije prethodno prošlo period hladne stratifikacije (0-4 °C) [36]. Pri niskim temperaturama, više kiseonika može da se rastvori u vodeno/fenolnoj barijeri, a manji deo biva vezan od strane polifenola, što dovodi do njegovog olakšanog dopremanja do embriona i otpočinjanja klijanja [37]. Novija histohemijska istraživanja ukazuju da je lokalizacija florizina u ćelijama palisadnog tkiva listova povezana sa njegovom ulogom u zaštiti tkiva od štetnog UV zračenja [38] kao i sa antioksidativnim potencijalom [5].

Utišavanje halkan-sintaze (CHS), ključnog enzima u sintezi glavnih flavonoida i dihidrohalkona jabuke, dovelo je do gubitka gotovo svih pomenutih jedinjenja i indukovalo izražene fenotipske efekte kod mutanata jabuke, uključujući patuljast rast nastao kao rezultat intenziviranog akropetalnog transporta auksina [39]. Utišavanje gena za floretin specifičnu glikoziltransferazu UGT88F1 prouzrokovalo je smanjenje sadržaja floretina, florizina i drugih polifenolnih jedinjenja u transgenim biljkama jabuke. Ove promene izazvale su povećanje intenziteta akropetalnog transporta auksina iz izdanaka i uzrokovale izražen patuljasti fenotip koji je predstavljao fenokopiju prethodno okarakterisanih CHS-deficijentnih mutanata jabuke [40].

Postoje dosta nepouzdana i često kontradiktorni podaci o ulozi florizina u odbrani jabuke od bolesti i štetočina. Smatra se da je florizin uključen u odbranu biljaka jabuke od infekcije gljivom *Venturia inaequalis* koja izaziva ekonomski značajnu bolest – čadjavu pegavost lista i krastavost plodova jabuke. Infekcija venturijom dovodi do kolapsa ćelije i oksidacije njenih metabolita, među kojima i florizina, aktivnošću enzima polifenol-oksidade. Oksidovani produkti florizina inaktiviraju pektinaze gljive i time onemogućavaju širenje patogena koje se zasniva na razgradnji srednje lamele ćelijskog zida biljne ćelije [41]. Sličan mehanizam je predložen i u slučaju infekcije gljivom *Phlyctaena vagabunda* u kome oksidacija florizina igra značajnu ulogu u ograničavanju širenja infekcije [42]. Međutim, Gaucher i saradnici [43] su testovima *in vitro* ustanovili relativno nisku antimikrobnu aktivnost florizina, ali značajno veću aktivnost njegovog aglikona floretina. Takođe, jasna povezanost nivoa florizina i otpornosti na plamenjaču izazvanu bakterijom *Erwinia amylovora* nije utvrđena na polju [44].

Pitanje uloge florizina u odbrani jabuke od štetnih insekata uvodi nove dileme. Tako npr. florizin odbija vaši *Myzus persicae* i *Amphorophora agathomica* [45], dok je atraktant za *Rhopalosiphum insertum* i zelenu vaš jabuke (*Aphis pomi*) [46]. Larve vrste *Spodoptera littoralis* izbegavaju ishranu već oštećenim listovima jabuke koji povećano sintetišu florizin već nekoliko dana nakon nastanka oštećenja [47]. Fulcher i sar. [48] su ukazali na značaj florizina u odbrani biljaka jabuke od japanske bube (*Papillia japonica*), s obzirom na to da je stepen oštećenja listova korelirao sa sadržajem florizina u listovima 10 različitih sorti.

Alelopatsko delovanje fenolnih jedinjenja jabuke

Potencijalnu autoalelopatsku aktivnost florizina i floretina sugerisao je Börner davne 1959. godine [50], smatrajući ih odgovornim za razvoj bolesti jabuke poznate kao ARD (eng *Apple Replant Disease*). Ova bolest se manifestuje usporenim i zakržljanim rastom stabla i korena, kao i slabim plodonošenjem sadnica posadenim na zemljištu na kome su prethodno gajena stabla jabuke [51]. Ispitivanje korenovog sistema voćaka obolelih od ARD je ukazalo na pojavu propadanja epidermalnih ćelija i kortikalnog tkiva korena i značajnu redukciju u razvoju lateralnih korenova [52,53]. Takođe je primećen veoma mali broj funkcionalnih korenskih dlačica na obolelim korenovima [54]. Iako je problem uspostavljanja zasada jabuke na zemljištu prethodnih voćnjaka dokumentovan još pre dva stoleća, etiologija razvoja ARD je i danas ostala nepoznanica. Postoje mnogobrojne studije o učešću različitih zemljišnih organizama u razvoju ARD, kao što su parazitske nematode iz roda *Pratylenchus* [55], aktinomicete [56] i veliki broj gljiva [57,58]. Primena fungicida u predtretmanu zemljišta, kao i sterilizacija zemljišta koja je često dovodila do uspešnog suzbijanja razvoja simptoma bolesti, navela je na zaključak da su gljive najčešći uzročnici ove bolesti [59]. Sa druge strane, mnogobrojni kontradiktorni rezultati i činjenica da primena fungicida širokog spektra delovanja, iako menja sastav mikrobiotskih zajednica, ne utiče na bolji rast i povećanje prinosa jabuke [60] bacaju dodatnu senku na problem ARD-a.

Iako je Börner još 1959. i 1960. godine [50, 61] nagovestio ulogu florizina i floretina detektovanih u zemljištu voćnjaka jabuke u razvoju simptoma ARD, dugi niz godina njihovo autoalelopatsko delovanje nije proučavano. Dostupni literaturni podaci ukazuju da eksudati korena divljih vrsta jabuke, *Malus pumila* i *Malus prunifolia*, deluju inhibitorno na klijanje semena i razviće klijanaca sopstvene vrste [62,63]. Ovi rezultati nagoveštavaju da bi dihidrohalkoni koji dospevaju u zemljište izlučivanjem korena jabuke ili razgradnjom izumrlih biljnih delova (opalog lišća, plodova, kore ili korena) [64], mogli biti ključni faktori u razvoju simptoma ARD. Nicola i saradnici [65] su primetili da je tretman klijanaca jabuke sorte Fuji mešavinom zemlje i usitnjenih korenova M26 sorte za kalemljenje, nakon četiri meseca doveo do značajnog smanjenja sadržaja hlorofila, mase korenova i ukupne mase tretiranih biljaka. UHPLC analiza sa masenom spektrometrijom ukazala je

na značajan porast sadržaja florizina i floretina u primenjenoj mešavini u odnosu na kontrolnu podlogu. Tretman florizinom u niskoj koncentraciji (1,0 μM) je delovao stimulatorno na rast klijanaca vrste *M. hupehensis*, dok su visoke koncentracije (1–4 mM) ispoljile inhibitorno delovanje [66] izazvavši ultrastrukturne promene na hloroplastima i mitohondrijama ćelija listova i/ili korena. Primena visokih koncentracija dovela je do povećanja sadržaja malondialdehida (MAD) - indikatora lipidne peroksidacije membrane, ali i aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid-dismutaze (SOD), peroksidaze (POD) i katalaze (CAT). Pri višim koncentracijama florizina uočeno je i sniženje stopa transpiracije i fotosinteze [66]. Sličan efekat florizina primećen je i kod klijanaca divlje vrste *M. micromalus* u čijim korenovima je zabeležen porast aktivnosti SOD, POD i CAT, kao i sadržaj MAD i prolina srazmerno primenjenoj koncentraciji i trajanju tretmana [67]. Wang i sar. [68] su ukazali na smanjenje stope respiracije i aktivnosti enzima uključenih u ciklus trikarboksilnih kiselina u korenovima *M. hupehensis* tretiranih 4,0 mM florizinom. Nedavno, Yin i sar. [69] su ukazali da floretin i florizin primenjeni u koncentracijama detektovanim u zemljištu voćnjaka takođe izazivaju povećanje nivoa ekspresije proteina uključenih u odbrambene mehanizme ćelija korena *M. hupehensis*.

Dihidrohalkoni jabuke koji dospevaju u zemljište bilo eksudacijom korena ili razgradnjom biljnog materijala mogli bi delovati inhibitorno i na druge biljne vrste, uključujući i korove. Značajan ograničavajući faktor u proučavanju takvih alelopatskih interakcija u rizosferi predstavlja komplikovanost izolacije i identifikacije jedinjenja koje koren izlučuje, kao i kompleksnost ekosistema rizosfere i prisustvo mikroorganizama koji svojom aktivnošću mogu da modeluju delovanje alelohemikalija. U cilju otklanjanja činilaca koji utiču na promenu kvaliteta i kvantiteta izlučenih alelohemikalija, nedavno je uspostavljen model sistema *in vitro* kulture transformisanih korenova jabuke [26]. Uspostavljanje ovakvog model sistema zasnovano je na uvođenju pazušnih pupoljaka jabuke u kulturu *in vitro* i razvijanju pouzdanog i efikasnog sistema za regeneraciju izdanaka putem procesa *de novo* organogeneze [70] kao i optimizaciji faktora koji stimulišu regenerativni kapacitet eksplantata [70,71]. Postupak genetičke transformacije posredstvom *Agrobacterium rhizogenes* 15834 vektora indukovao je pojavu transformisanih korenova na izdancima sorti Melrouz, Zlatni delišes, Čadel i Gloster, a vremenski koordinisana smena tretmana sa i bez indol-3-buterne kiseline (IBA) omogućila je pionirski poduhvat uspostavljanja samostalne permanentne kulture korenova jabuke na podlozi bez regulatora rastanja [26]. Metodom tačne hromatografije pod ultra visokim pritiskom sa masenom spektrometrijom (UHPLC/(+/-)HESI-MS/MS) potvrđeno je da genetička transformacija nije dovela do promena u sadržaju glavnih sekundarnih metabolita u tkivu korena jabuke, florizina, glikozilovanih i aglikozilovanih flavonoida i fenolnih kiselina u odnosu na netransformisan koren jabuke. Na taj način, uspostavljanjem *in vitro* kulture transformisanih korenova jabuke stvoreni su uslovi za proučavanje alelopatskog potencijala jabuke u odsustvu mikroorganizama i drugih remetećih faktora rizosfere [26].

Fitotoksični potencijal eksudata korenova jabuke prema drugim biljnim vrstama uspešno je ispitan na model biljci arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.). Rezultati su pokazali da eksudat korenova jabuke ne deluje inhibitorno na klijanje semena arabidopsisa, ali je njegov fitotoksični efekat na rastenje i razviće klijanaca veoma izražen i ogleda se u značajnoj inhibiciji rasta korena i izdanaka (35,1% i 62,1%, redom) [26]. Eksudat korenova jabuke najviše utiče na proces obrazovanja lateralnih primordija, smanjivši broj bočnih korenova za 74% desetog dana tretmana. Analiza sadržaja sekundarnih metabolita u eksudatu transformisanih korenova jabuke je ukazala na nizak, ali veoma uravnotežen sadržaj dihidrohalkona florizina (8,01 ng mL⁻¹ tj. 0,017 μM) i floretina (7,49 ng mL⁻¹ tj. 0,027 μM), kao i kafeinske (14,58 ng mL⁻¹ tj. 0,08 μM) i hlorogene kiseline (8,82 ng mL⁻¹ tj. 0,025 μM) [26]. S obzirom na to da brojni literaturni podaci ukazuju na alelopatsko delovanje hlorogene i kafeinske kiseline, bilo samostalno, bilo u okviru biljnih izolata [72,73,74,75], fitotoksično delovanje floretina i florizina moralo je biti dodatno ispitano.

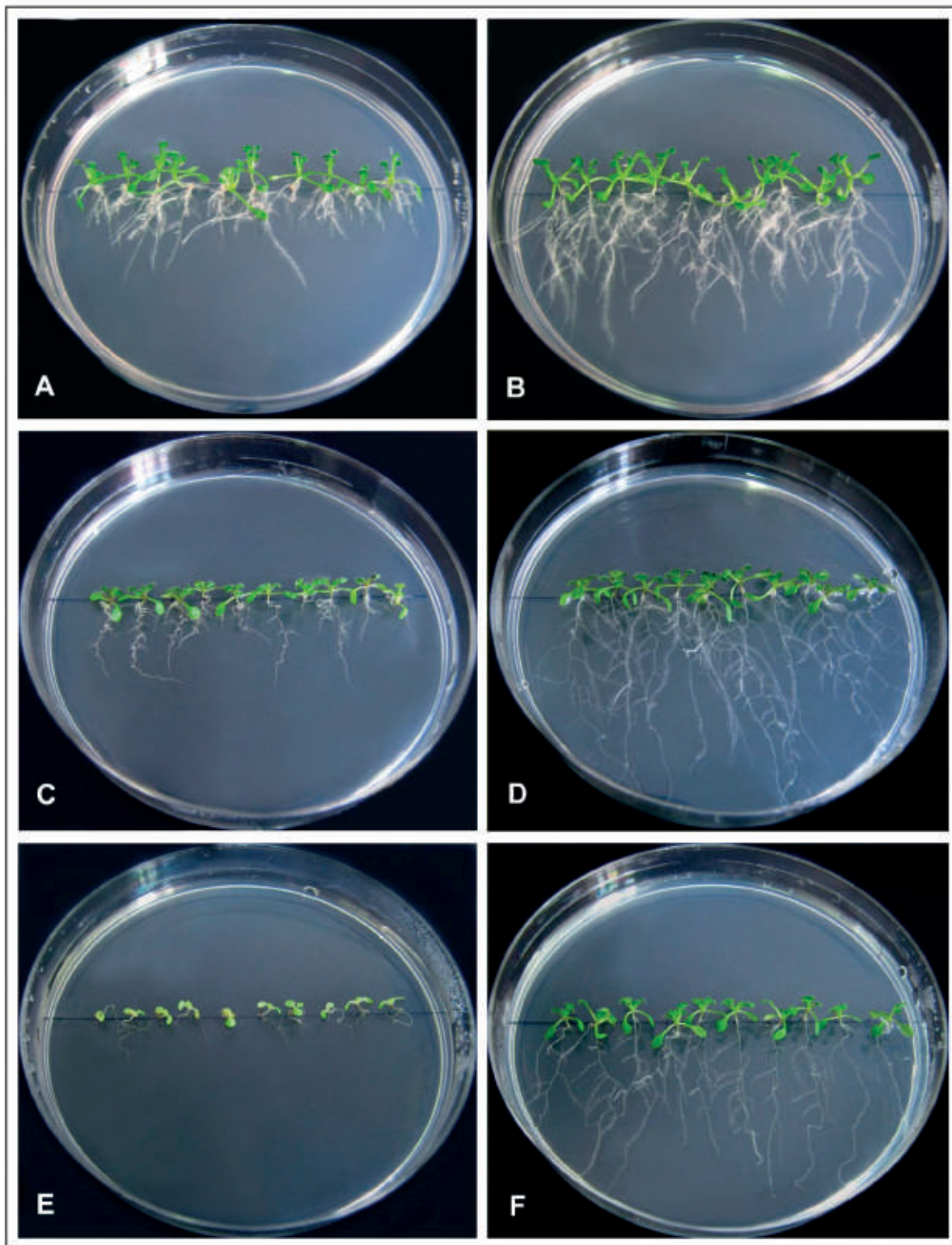
Alelopatski efekat biljnih izolata je najčešće posledica sinergističkog delovanja većeg broja jedinjenja prisutnih u relativno niskim koncentracijama [76]. Međutim, pojedinačna jedinjenja ostvaruju sličan alelopatski efekat kao i biljni izolati samo ukoliko su primenjeni u mnogostruko većim koncentracijama od onih u kojima su zastupljeni u biljnom izolatu [75]. Zbog toga je alelopatski potencijal florizina i floretina procenjen na osnovu efekata tretmana sa 125, 250 i 500 μM čistih supstanci, na klijanje i morfološke karakteristike tokom rastanja i razvića klijanaca arabidopsisa, iako su detektovane koncentracije ovih dihidrohalkona u tečnoj hranljivoj podlozi u kojoj su gajeni transformisani korenovi jabuke bile oko 100 puta niže [26].

Tretman florizinom ispoljio je dozno-zavisni efekat na klijance arabidopsisa ali je statistički značajno smanjenje dužine korena (21,3%) i broja lateralnih korenova (63,5%) zabeleženo tek na tretmanu sa 500 μM floretinom [77]. Inhibitorni uticaj ovog tretmana na posmatrane morfološke parametre je bio slabiji u poređenju sa efektom eksudata korenova jabuke, ali su oba tretmana imala izraženiji efekat na razviće lateralnih korenova, nego na izduživanje primarnog korena klijanaca. Alelopatski efekat eksudata korenova jabuke u odnosu na čist florizin bi se mogao pripisati sinergističkom dejstvu njegovih komponenti. Na tretmanu sa 500 μM florizinom zapažena je i veoma karakteristična promena u izgledu korena klijanaca, koji je rastao uvičajući se i formirajući oblik nalik sinusoidi, dok su lateralni korenovi bili veoma retki i male dužine [77].

Tretman floretinom je izazvao značajnu dozno-zavisnu inhibiciju rastanja i razvića klijanaca arabidopsisa koja je bila dosta izraženija nego u slučaju tretmana florizinom. Najosetljiviji na delovanje floretina je koren klijanaca koji je nakon 10 dana tretmana sa 500 μM floretinom bio znatno skraćen (74,2%) i sa manjim brojem lateralnih korenova (66,8%) u poređenju sa korenom kontrolnih netretiranih klijanaca (Slika 2) [77]. Floretin je ispoljio značajan efekat i na izdanke klijanaca koji su bili bledezelene boje, manje dužine (48,2%) i sa manjim brojem listova u poredjenju sa kontrolnim. Takođe, 500 μM floretin je uslovio i pojavu specifičnog agravitropskog fenotipa klijanaca koji se odlikovao izvrnutim rastom kotiledona i hipokotila i nepravilnim oblikom korena u vidu petlje (Slika 2) [77]. Prisustvo slobodne hidroksilne grupe na C2' poziciji i odsusvo glikozilne grupe u molekulu floretina omogućava ovom dihidrohalkonu da reaguje intenzivnije sa drugim biološkim molekulima [78] što može objasniti njegovo pojačano fitotoksično delovanje u poređenju sa florizinom.

Ultrastrukturalna analiza ćelija mezofila klijanaca tretiranih floretinom je ukazala na promene u morfologiji ćelijskog zida, kao i strukturi i položaju hloroplasta u ćeliji [77]. Blaga izuvijanost ćelijskog zida primećena treći dan tretmana, rezultovala je formiranjem izraženih ulegnuća i ispupčenja na ćelijskom zidu desetog dana tretmana. Hloroplasti su zadobili okrugao oblik i izmešteni su i grupisani u unutrašnjosti ćelije, dok su tilakoidi grana i strome poprimili kružnu formu i izgubili pravilnu orijentaciju. Smanjenje rezervi skroba u hloroplastima nakon desetog dana izlaganja floretinu, kao i potpuno odsustvo amiloplasta i lipidnih kapi u citoplazmi potvrđuju da se narušena struktura hloroplasta usled stresa izazvanog floretinom značajno odražava na funkciju ćelija [77].

Indol-3-sirćetna kiselina (IAA), kao osnovni biološki aktivan oblik auksina, ima centralnu ulogu u razviću biljnog organizma i usklađivanju odgovora biljke na promenljive uslove životne sredine putem regulacije procesa ćelijske deobe, elongacije i diferencijacije. Ključni aspekt delovanja auksina je zasnovan na fino koordinisanim procesima biosinteze, konjugacije, degradacije i polarnog transporta auksina (eng. *Polar Auxin Transport (PAT)*,) koji omogućavaju uspostavljanje lokalnog maksimuma i morfogenetskih gradijenata u okviru biljnog tkiva. Osnovni mehanizam koji kontroliše PAT obuhvata procese aktivnog ulaska (influksa) i izlaska (efluksa) iz ćelija preko nekoliko specifičnih grupa transportera označenih kao AUX1/LAX (eng. *AUXIN1/LIKE AUXIN1*) transporteri i PIN (eng. *PIN-FORMED*) i ABCB (MDR) proteini (eng. *MULTI-DRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN (MDR/PGP), ATP-BINDING CASSETTE (ABC)*) [79,80]. Kvantitativnom RT-PCR anali-



Slika 3. Klijanci *A. thaliana* nakon 10 dana tretmana na $\frac{1}{2}$ MS podlozi sa floretinom u rastućim koncentracijama od 125 μ M (A), 250 μ M (C) ili 500 μ M (E) u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. Kontrolni tretman je sadržao istu količinu rastvarača DMSO koliko i odgovarajući tretman floretinom (0,035% (B), 0,07% (D) i 0,14% (F) (v/v) DMSO za tretmane sa 125 μ M, 250 μ M i 500 μ M floretinom, redom). Klijanci su se razvijali u Petri kutijama postavljenim uspravno. Preuzeto iz Stanišić. 2019 [77]

zom (qPCR) ekspresije gena uključenih u glavni put biosinteze auksina (IpyA put) i polarni transport auksina, utvrđene su promene u ekspresiji koje ukazuju na narušenu homeostazu auksina i verovatno stoje u osnovi agravitropskog fenotipa klijanaca [77]. Tretman 500 μ M floretinom je koordinisano delovao na sve ispitivane gene *PIN* familije (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3* i *PIN7*), kao i *AUX1* i *LAX3* gene indukovavši gotovo identičan ekspresioni vremenski profil sa karakterističnim povećanjem ekspresije 6 h nakon početka tretmana i manjim smanjenjem nakon 12 h i 24 h u poređenju sa nivoom nakon 6 h [77]. Međutim, statistički značajna promena ekspresije zabeležena je isključivo kod *PIN1*, *PIN3* i *PIN7* gena, zaduženih za regulaciju akropetalnog transporta auksina i njegovo preusmeravanje i distribuciju u lateralnim zonama apeksa [81,82]. Floretin je značajno stimulisao i ekspresiju *ABCB1* gena, dok uticaj na ekspresiju *ABCB4* i *ABCB19* gena u korenovima klijanaca nije zabeležen [77].

Ekspresioni profili gena uključenih u biosintezu auksina su varirali ili čak bili suprostavljani u korenovima i izdancima tretiranih klijanaca [77], verovatno kao rezultat poznate funkcionalne redundancije članova *TAA* and *YUC* familije gena. *TAA1* i *YUC* geni kodiraju enzime koji učestvuju u najznačajnijem putu sinteze IAA kod arabidopsisa, koji se odvija preko indol-3-piruvata (IPyA) [83]. *TAA1* gen kodira triptofan aminotransferazu (TAA), koja katalizuje reakciju deaminacije L-triptofana do IPyA [84,85], dok *YUC* geni kodiraju monooksigenaze koje sadrže flavin i katalizuju reakciju konverzije IPyA do IAA [86]. Statistički značajano sniženje *TAA1* ekspresije u korenovima je primećeno 12 h nakon aplikacije floretina, u istoj vremenskoj tački u kojoj je ekspresija *TAR2* gena povećana [77] što je verovatno posledica uloge koje *TAA1* i *TAR2* geni dele u regulaciji formiranja auksinskog maksimuma u meristemskom tkivu korena [84]. Slično, ekspresija *YUC3* gena u korenovima je bila suprostavljena ekspresiji *YUC4* gena, dok ekspresija *YUC6* i *YUC8* gena nije bila statistički značajno izmenjena u odnosu na kontrolu [77]. Proučavajući ekspresiju gena *YUC* genske familije kod krasavca pri različitim stresogenim tretmanima, Yan i sar. [87] su primetili da je kao odgovor na nisku temperaturu, ekspresija *CsYUC10b* gena bila dramatično povišena, a ekspresija *CsYUC4* snižena. Slično, ekspresija *CsYUC10a* i *CsYUC11* je bila potpuno suprostavljena ekspresiji *CsYUC10b* gena u slučaju slanog stresa, sugerišući da različiti članovi *YUC* genske familije deluju antagonistički u istim stresnim uslovima kako bi održali odgovarajući nivo auksina u ćeliji i obezbedili održanje auksinske homeostaze. Činjenica da su enzimi koji katalizuju oba koraka u IpyA biosintetičkom putu kodirani multigenskim familijama daje jednostavan mehanizam za generisanje širokog opsega različitih ekspresionih odgovora u ćeliji.

Tretman floretinom doveo je i do promena u ekspresiji *GA20ox2* i *GA3ox1* gena koji kodiraju enzime GA20 i GA3 oksidazu odgovorne za završne korake u biosintezi bioaktivnih giberelina (GA) u citoplazmi [88]. U korenovima tretiranih klijanaca, promene ekspresije *GA3ox1* i *GA20ox2* gena u posmatranim vremenskim tačkama su imale gotovo identičan trend promene kao i one zabeležene u korenovima kod ispitivanih gena uključenih u polarni transport auksina [77]. Promena u nivou ekspresije *GA20ox2*, 6 h od početka tretmana je bila znatno izraženija nego u slučaju *GA3ox1* i ostalih pomenutih gena. Znatno povišena ekspresija *GA3ox1* i *GA20ox2* gena u korenovima tretiranih klijanaca ukazuje na moguće povećanje nivoa endogenih giberelina i njihovo inhibitorno delovanje na razvoj lateralnih korenova. Gou i saradnici [89] su potvrdili da porast sadržaja giberelina inhibira rane korake u formiranju lateralnih korenova topole (*Populus* sp.), dok giberelin-deficijentni i giberelin-neosetljivi mutanti razvijaju povećan broj lateralnih korenova u odnosu na kontrolu. Ovakvi mutanti imaju i sniženu ekspresiju *PIN3* gena što ukazuje na moguću interakciju giberelina i auksina u regulaciji formiranja lateralnih korenova [89].

U osnovi inhibicije rasta korenova klijanaca izazvane floretinom stoji i poremećaj ekspresije gena za kinaze zavisne od ciklina (CDK) koje imaju centralnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa i evolutivno očuvanom mehanizmu ćelijske deobe kod eukariotskih organizama [90,91]. CDK pripadaju familiji serinskih/treoninskih

protein-kinaza, čija je specifičnost prema supstratu određena vezivanjem za odgovarajući ciklin (CYC), a aktivnost regulisana od strane serije različitih CDK aktivatora i inhibitora [92]. Specifični kompleksi ciklina i kinaza zavisnih od ciklina kontrolišu prolazak ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa na različitim kontrolnim tačkama. Istraživanja ukazuju da alelohemikalije mogu uticati na različite aspekte kontrole ćelijskog ciklusa kod biljaka [93,94,95,96]. Tretman klijanaca arabidopsisa floretinom je doveo do povećanja nivoa ekspresije gena za kinaze zavisne od ciklina *CDKA1;1* i *CDKB2;1* i cikline *CYCA3;1* i *CYCB2;4* koja se odlikovala karakterističnim vremenskim profilom sa maksimalnim povećanjem 6 h od početka tretmana, izuzev *CYCB2;4* gena kod koga je ekspresija bila povećana u svim vremenskim tačkama tretmana.

Zaključak

Narušena strukturna organizacija ćelije usled delovanja floretina, direktno se odražava na njeno funkcionisanje, i moguće da je povezana sa disbalansom u sintezi i transportu auksina i giberelina kao ključnih regulatora esencijalnih procesa u biljnom organizmu. Narušavanje bilo koje komponente složenog sistema interakcija, neizostavno rezultuje promenama koje se odražavaju na nivou morfologije kao najviše instance. Izraženo fitotoksično dejstvo floretina otvara vrata daljim istraživanjima u cilju saznanja molekularnih i fizioloških mehanizma njegovog delovanja. Buduća istraživanja mehanizma delovanja floretina bi mogla doprineti rasvetljavanju njegove uloge u razvoju simptoma ARD, ali i utrti put primeni floretina kao novog ekološko-bezbednog herbicida u skladu sa sve većim svetskim potrebama za proizvodnjom zdrave hrane i zaštitom potrošivih prirodnih resursa.

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora: 451-03-68/2022-14/ 200007.

Literatura

1. Qasem JR, Foy CL. Weed allelopathy, its ecological impacts and future prospects: a review. *Journal of Crop Production* 2001;4:43-92.
2. Bertin C, Yang X, Weston LA. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 2003;256:67-83.
3. Hvattum E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16(7):655-62.
4. Pontais I, Treutter D, Paulin JP, Brisset MN. *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiologia Plantarum* 2008; 132:262-271.
5. Dugé de Bernonville TD, Gaucher M, Guyot S, Durel CE, Dat JF, Brisset MN. The constitutive phenolic composition of two *Malus domestica* genotypes is not responsible for their contrasted susceptibilities to fire blight. *Environmental and Experimental Botany* 2011;74:65-73.
6. Mikulic Petkovšek M, Stampar F, Veberic, R. Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars. *Canadian journal of plant science* 2009; 89:745-753.
7. Williams AH. Dihydrochalcones; their occurrence and use as indicators in chemical plant taxonomy. *Nature* 1964;202(4934):824-5.
8. Aldasoro JJ, Aedo C, Navarro C. Phylogenetic and phytogeographical relationships in *Maloideae* (*Rosaceae*) based on morphological and anatomical characters. *Blumea-Biodiversity, Evol Biogeogr Plants* 2005;50(1):3-32.
9. Fernández de Simón B, Pérez-Illarbe J, Hernández T, Gómez-Cordovés C, Estrella I. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *J Agric Food Chem.* 1992;40(9):1531-5.
10. Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, et al. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2003;51(10):2896-9.
11. Hvattum E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(7):655-62.
12. Turner A, Chen SN, Joike MK, Pendland SL, Pauli GF, Farnsworth NR. Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: a new antiadherence assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:8940-47.
13. Dong H, Ning Z, Yu L, Li L, Lin L, Huang J. Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. *Molecules* 2007;12:552-62.
14. Zhou K, Hu L, Li P, Gong X, Ma F. Genome-wide identification of glycosyltransferases converting phloretin to phloridzin in *Malus* species. *Plant Sci.* 2017;265:131-45.
15. De Koninck L. Ueber das phloridzin (phlorrhizin). *European Journal of Organic Chemistry* 1835;15:75-77.
16. von Mering J. Ueber kunstlichen Diabetes. *Centralbl Med Wiss* 1886; 531.
17. Alvarado F, Crane R. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1962;56:170-72.
18. Vick H, Diedrich DF, Baumann K. Reevaluation of renal tubular glucose transport inhibition by phlorizin analogs. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1973;224:552-57.
19. Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Wright EM. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:27099-105.
20. Gaisano H, Ostenson C, Sheu L, Wheeler M, Efendic S. Abnormal expression of pancreatic islet exocytotic soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors in Got-Kakizaki rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology* 2002;143:4218-26.
21. McCrimmon R, Evans M, Jacob R, Fan X, Zhu Y, Shulman GI et al. AICAR and phlorizin reverse the hypoglycemia-specific defect in glucagon secretion in the diabetic BB rat. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2002;283: 1076-83.
22. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Sheltz M, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *The New England Journal of Medicine* 2001;345: 1359-67.

23. Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 2010;71:838-43.
24. Hunter LD, Hull LA. Variation in the concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry* 1993;34:1251-54.
25. Hrazdina G. Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry* 2003;64:485-92.
26. Stanišić M, Ćosić T, Savić J, Krstić-Milošević D, Mišić D, Smigocki A, et al. Hairy root culture as a valuable tool for allelopathic studies in apple. *Tree Physiol* 2019; 39:888-905.
27. Jones P, Vogt T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 2001;213:164-74.
28. Nithiya T, Udayakumar R. *In vitro* antioxidant properties of phloretin-an important Phytocompound. *J. Biosci. Med.* 2016;4,85-94.
29. Behzad S, Sureda A, Barreca D, Nabavi SF, Rastrelli L, Nabavi SM. Health effects of phloretin: from chemistry to medicine. *Phytochem. Rev.* 2017;16:527-33.
30. Grochowska MJ. Studies on natural growth regulators in apple trees in relation to biennial bearing. *Bulletin De L'Academie Polonaise des Sciences* 1963;9:585-90.
31. Grochowska MJ. Identification of the growth inhibitor connected with flower bud formation in apple. *Bulletin De L'Academie Polonaise des Sciences* 1964;12:379-93.
32. Hancock CR, Barlow HWB, Lacey HJ. The behaviour of phloridzin in the coleoptile straight growth test. *Journal of Experimental Botany* 1962;12:401-08.
33. Jones OP. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature* 1976;262:392-93.
34. James DJ, Thurbon IJ. Rapid *in-vitro* rooting of the apple rootstock M9. *Journal of Horticultural Sciences* 1979;54:309-11.
35. Hanower J, Hanower P. Inhibition et stimulation, en culture *in vitro*, de l'embryogenèse des souches issues d'explants foliaires de palmiers à huile. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* 1984;298:45-8.
36. Bewley JD, Black M. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York. Springer; 1994.
37. Come D, Tissaoui T. Interrelated effect of imbibition temperature and oxygen on seed germination. In: Heydecker W, editor. *Seed ecology*. Butterworths, London;1973.p.157-68.
38. Gaucher M, de Bernonville TD, Lohou D, Guyot S, Guillemette T, Brisset MN, et al. Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry* 2013;90:78-89.
39. Dare AP, Tomes S, Cooney JM, Greenwood DR, Hellens RP. The role of enoyl reductase genes in phloridzin biosynthesis in apple. *Plant physiology and biochemistry* 2013;72:54-61.
40. Dare AP, Yauk YK, Tomes S, McGhie TK, Rebstock RS, Cooney JM et al. Silencing a phloretin-specific glycosyltransferase perturbs both general phenylpropanoid biosynthesis and plant development. *Plant J.* 2017;91:237-50.
41. Raa J. Polyphenols and natural resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis* Netherlands Journal of Plant Pathology 1968;74:37-45.
42. Lattanzio V, Di Venere D, Linsalata V, Bertolini P, Ippolito A, Salerno, M. Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49:5817-21.
43. Gaucher M, de Bernonville TD, Lohou D, Guyot S, Guillemette T, Brisset MN et al. Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry* 2013;90:78-89.
44. Bell AC. Host plant resistance to fire blight (*Erwinia amylovora*) in the Rosaceae subfamily Maloideae. North Carolina State University; 2004.
45. Terra WR, Ferreira C, Jordao BP, Dillon RJ. Digestive enzymes. In: *Biology of the insect midgut*. Springer, Dordrecht;1996. p.153-94.
46. Klingauf F. Die wirkung des glucosids phlorizin auf das wirtswhalverhalten von Rhopalosiphum insertum und Aphis pomi de geer (Homoptera: Aphididae) Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie 1971;68:41-55.
47. Gutbrodt B, Mody K, Wittwer R, Dorn S. Within-plant distribution of induced resistance in apple seedlings: rapid acropetal and delayed basipetal responses. *Planta* 2011;133:1199-207.

48. Fulcher AF, Ranney TG, Burton JD, Walgenbach JF, Daneshmand DA. Role of foliar phenolics in host plant resistance of *Malus* taxa to adult Japanese beetles. *HortScience* 1998;33:862-65.
50. Börner H. The apple replant problem. I. The excretion of phlorizin from apple root residues. *Contributions Boyce from Thompson Institute* 1959;20:39-56.
51. Wittenmayer L, Szabó K. The role of root exudates in specific apple (*Malus x domestica* Borkh.) replant disease (SARD). *Journal Plant Nutrition Soil Science* 2000;163:399-404.
52. Savory BM. Studies on the occurrence and aetiology of specific replant diseases of perennial fruit crops. Ph.D. thesis. University of London, London; 1966.
53. Hoestra H. Replant diseases of apple in the Netherlands. Ph.D. thesis. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, the Netherlands; 1968.
54. Caruso FL, Neubauer BF, Begin MD. A histological study of apple roots affected by replant disease. *Canadian Journal of Botany* 1989;67:742-49.
55. Jaffee BA, Abawi GS, Mai WF. Role of soil microflora and *Pratylenchus penetrans* in an apple replant disease. *Phytopathology* 1982;72:247-51.
56. Wescott III SW, Beer SV, Israel HW. Interactions between actinomycete-like organisms and young apple roots grown in soil conducive to apple replant disease. *Phytopathology* 1987;77:1071-77.
57. Taylor JB, Wallace BD. Root canker in stone fruit caused by the fungus *Peniophora sacrata*. *Orchardist of New Zealand* 1970;434:263-65.
58. Braun PG. Effects of *Cylindrocarpum* and *Pythium* species on apple seedlings and potential role in apple replant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 1995;17:336-41.
59. Mazzola M. Elucidation of the microbial complex having a causal role in the development of apple replant disease in Washington. *Phytopathology* 1998;88:930-38.
60. Yao S, Merwin IA, Abawi GS, Thies JE. Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology and Biochemistry* 2006;38:587-99.
61. Börner, H. Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem. *Bot. Rev.* 1960;26:393-424.
62. Zhang JH, Mao ZQ, Wang LQ, Shu HR (2007) Bioassay and identification of root exudates of three fruit tree species. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 257-261.
63. Bai R, Zhao X, Ma F, Li C. Identification and bioassay of allelopathic substances from the root exudates of *Malus prunifolia*. *Allelopathy Journal* 2009;23:477-84.
64. Yin C, Xiang L, Wang G, Wang Y, Shen X, Chen X et al. How to plant apple trees to reduce replant disease in apple orchard: a study on the phenolic acid of the replanted apple orchard *PloS one* 2016;11(12):e0167347.
65. Nicola L, Vrhovsek U, Soini E, Insam H, Pertot I. Phlorizin released by apple root debris is related to apple replant disease. *Phytopathologia Mediterranea* 2017;55:432-42.
66. Jianghong Z, Zhiqun M, Liqin W. Effect of phloridzin on physiological characteristics of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Scientia Agricultura Sinica* 2007;40:492-98.
67. Cui X, Wang Y, Zhen W. The effects of phlorizin stress on the protective enzyme and metabolic regulation substances in the root of *M. micromalus*. *Frontiers of Agriculture in China* 2010;4:323-27.
68. Wang QQ, Hu YL, Zhou H, Zhan X, Mao ZQ, Zhu SH. Effects of phloridzin on the tri-carboxylic acid cycle enzymes of roots of *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Agricultura Sinica* 2012;45:3108-114.
69. Yin C, Duan YN, Xiang L, Wang G, Zhang X, Shen X et al. Effects of phloridzin, phloretin and benzoic acid at the concentrations measured in soil on the root proteome of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Scientia Horticulturae* 2018;228:10-17.
70. Mitić N, Stanišić M, Milojević J, Tubić L, Ćosić T, Nikolić R et al (2012). Optimization of *in vitro* regeneration from leaf explants of apple cultivars Golden Delicious and Melrose. *HortScience* 2012;47(8):1117-22.
71. Stanišić M, Ninković S, Savić J, Ćosić T, Banjac, N. The effects of β -lactam antibiotics and hygromycin B on *de novo* shoot organogenesis in apple cv. Golden Delicious. *Archives of Biological Sciences* 2018;70(1):179-90.
72. Patterson DT. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of Soybean (*Glycine max*). *Weed Science* 1981;29:53-9.

73. Garg N, Garg OP. Effect of exogenous treatment with some phenolic compounds on nitrogen fixation, growth and yield in *Cicer arietinum* L. (chickpea). *Current Science* 1989;58:31-2.
74. Reigosa MJ, Pazos-Malvido E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology* 2007;33:1456-66.
75. Batish DR, Singh HP, Kaur S, Kohli RK, Yadav SS. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology* 2008;165:297-305.
76. Einhellig FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: Macías FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG, editors. *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. CRC Press; 2004. p.217-38.
77. Stanišić M. Alelopatski potencijal sekundarnih metabolita transformisanih korenova jabuke-efekat floretina i florzazina u kulturi *in vitro*. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; 2020.
78. Barreca D, Bellocco E, Laganà G, Ginestra G, Bisignano C. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosylated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chem.* 2014;160:292-97.
79. Zažimalová E, Murph AS, Yang H, Hoyerová K, Hošek P. Auxin Transporters - Why So Many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2;1-15.
80. Geisler M, Aryal B, Di Donato M, Hao P. A critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant Cell Physiol.* 2017;58:1601-1604..
81. Friml J, Justyna W, Eva B, Kurt M, Klaus P. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 2002;415:806-09.
82. Billou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Frimi J et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 2005;433: 39-44.
83. Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M et al. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108;18512-18517.
84. Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Doležal K, et al. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 2008;133:177-191.
85. Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, et al. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108:18518-18523.
86. Brumos, J., Alonso, J. M., and Stepanova, A. N. (2014). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiol. Plant.* 151, 3–12.
87. Yan S, Che G, Ding L, Chen Z, Liu X, Wang H et al. Different cucumber *CsYUC* genes regulate response to abiotic stresses and flower development. *Sci. Rep.* 2016; 6:1-12.
88. Reid JB, Symons GM, Ross JJ. Regulation of gibberellin and brassinosteroid biosynthesis by genetic, environmental and hormonal faktors. In: Davies PJ, editore. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands;2004. p. 179-203.
89. Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB. Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *The Plant Cell* 2010;22:623-639.
90. De Veylder L, Beeckman T, Inzé D. The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007;8:655-665.
91. Berckmans B, De Veylder L. Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* 2009;12:599-605.
92. Inzé D, De Veylder L. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2006;40:77-105.
93. Nishida N, Tamotsu S, Nagata N, Saito C, Sakai A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 2005;31:1187-1203.
94. Sanchez-Moreiras AM, De La Pena TC, Reigosa MJ. The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. *Phytochemistry* 2008;69:2172-2179.
95. Soltys D, Rudzinska-Langwald A, Kurek W, Gniazdowska A, Sliwinska E, Bogatek R. Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta* 2011;234:609-621.

96. Dmitrović S, Simonović A, Mitić N, Savić J, Cingel A, Filipović B, Ninković S. Hairy root exudates of allelopathic weed *Chenopodium murale* L. induce oxidative stress and down-regulate core cell cycle genes in Arabidopsis and wheat seedlings. Plant Growth Regulation 2015;75: 365-382.

Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida

Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Beograd

Kontakt: sladja@ibiss.bg.ac.rs

Apstrakt

U hortikulturi je prisutna stalna potreba za ukrasnim biljkama sa novim karakteristikama, gde boja cveta predstavlja jednu od najvažnijih osobina koja određuje njihovu komercijalnu vrednost. Sa razvojem metoda genetičkog inženjeringa otvorena je mogućnost kreiranja biljaka sa željenom bojom cvetova koja se ne može postići klasičnim ukrštanjem ili mutagenезom. Boja cvetova kod biljaka određena je sadržajem tri biljna pigmenta: antocijanina, karotenoida i betalaina. Do sada, najveći napredak postignut je genetičkom modulacijom biosinteze antocijanina. Na ovaj način postignute su nove boje cvetova kod najmanje 50 ukrasnih vrsta, a neki od tih modifikovanih varijeteta su već dugi niz godina u slobodnoj prodaji. Međutim, promena boje cveta manipulacijom biosintetskog puta karotenoida je dokumentovana kod svega nekoliko ukrasnih vrsta i poslednjih godina intenzivirana su istraživanja u tom pravcu. U ovom radu je razmatran potencijal ovog pristupa, sa posebnim osvrtom na rezultate postignute na promeni boje cvetova kod kultivara ljubičice uvođenjem gena za kapsantin-kapsorubin sintazu.

Ključne reči: Genetičke transformacije, *crt* geni, *ccs*, *Viola cornuta*.

Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis

Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel

Institute for Biological Research „Siniša Stanković” – National Institute of the Republic of Serbia,
University of Belgrade, Despot Stefan Boulevard, 11060 Belgrade

Correspondence: sladjja@ibiss.bg.ac.rs

Abstract

In horticulture, there is a constant need for ornamental plants with new characteristics, where the flower color is one of the most important features that determines their commercial value. With the development of genetic engineering methods, it has been possible to create plants with the desired flower color which cannot be achieved by classical breeding or mutagenesis. The flower color in plants is determined by the content of three plant pigments: anthocyanins, carotenoids and betalains. Up to date, the greatest progress has been made by genetic modulation of anthocyanin biosynthesis. In this way, the new flower colors have been achieved in at least 50 ornamental species, and some of these modified varieties have been on market for many years. However, the alteration of flower color by manipulating the carotenoid biosynthetic pathway has been documented in only a few ornamental species, and the research has been significantly increased last few years. In this paper, the potential of this approach is considered, with special reference to the results achieved on flower color alteration of pansy cultivars by introducing the gene for capsanthin-capsorubin synthase.

Keywords: Genetic transformations, *crt* genes, *ccs*, *Viola cornuta*.

UVOD

Boja cveta predstavlja jednu od najvažnijih osobina ukrasnih biljaka i za to su odgovorni biljni pigmenti: antocijanini, karotenoidi i betalaini. Antocijanini su najrasprostranjeniji u prirodi i cvetovima daju širok spektar boja, počev od plave, pa do žute i crvene. Karotenoidi su zaslužni za žutu, narandžastu i crvenu boju cvetova, dok betalaini, koji su otkriveni samo kod vrsta iz reda *Caryophyllales*, daju različite nijanse ljubičaste, svetlo smeđe, žute, narandžaste i crvene boje [1].

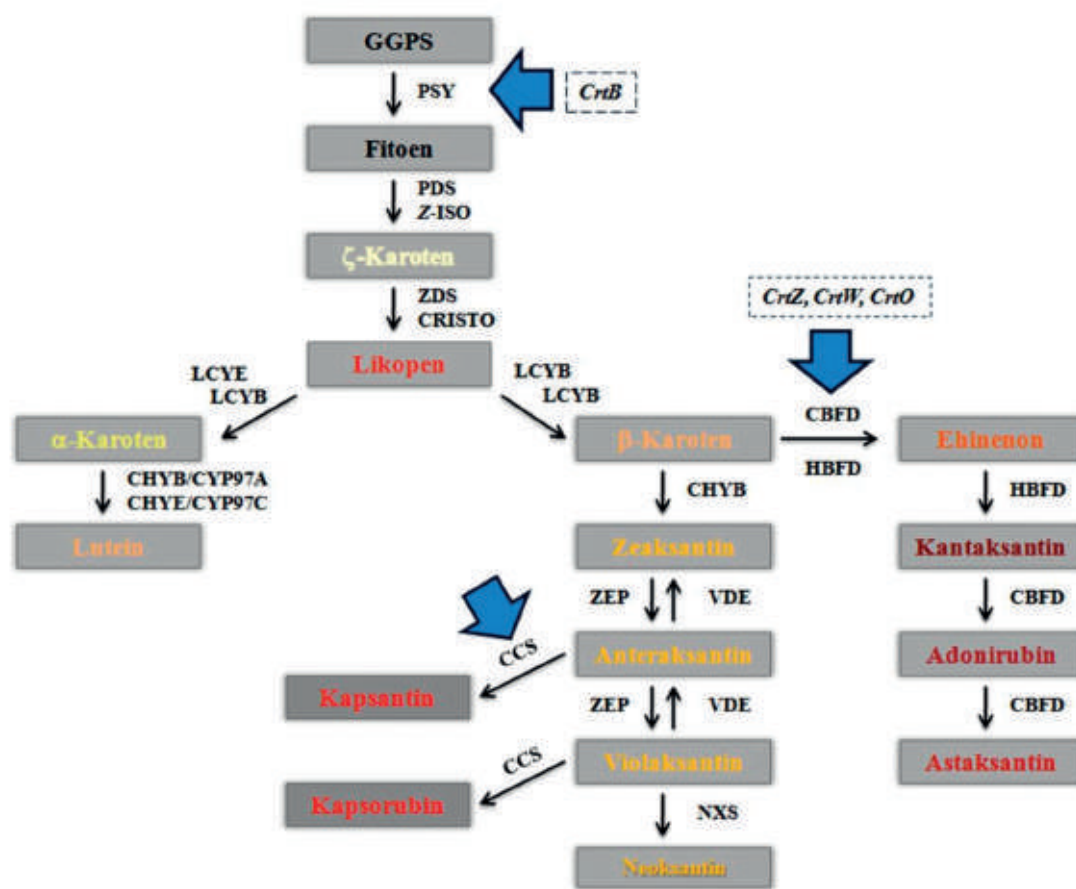
Biljni karotenoidi su po strukturi lipofilni C40 izoprenoidi sa polienskim lancima koji sadrže prstenove na svojim krajevima i konjugovane dvostruke veze zahvaljujući kojima apsorbuju vidljivu svetlost [2]. U biljkama se nalaze i u fotosintetičkim i u nefotosintetičkim tkivima. U fotosintetičkim tkivima, odnosno listovima biljaka, karotenoidi su smešteni u hloroplastima gde imaju brojne funkcije neophodne za proces fotosinteze, kao što su izgradnja fotosistema, apsorpcija svetlosti i zaštita fotosintetičkog aparata od fotooksidacije [3]. U nefotosintetičkim tkivima, plodovima i cvetovima, njihova uloga je prvenstveno u obezbeđivanju obojenosti kojom će privući oprašivače i životinje koje se hrane plodovima, kako bi došlo do širenja semena u cilju reprodukcije biljaka [4,5]. Pored toga, od karotenoida mogu nastati isparljivi apokarotenoidi koji, kao važna komponenta mirisa cvetova ili arome plodova, pospešuju interakcije između biljaka i životinja. Karotenoidi služe i kao prekursori za sintezu dve grupe fitohormona, abscisinske kiseline (ABA) i strigolaktona, koji imaju ključnu ulogu u razviću biljke i njenom odgovoru na stres [6,7]. U ljudskoj ishrani obezbeđuju prekursore za biosintezu vitamina A, a zbog svoje snažne antioksidativne aktivnosti koriste se i u cilju zaštite od raznih hroničnih oboljenja kao što su kancer, kardiovaskularne bolesti i bolesti oka [8,9].

U cvetovima i plodovima biljaka karotenoidi se sintetišu *de novo* u hromoplastima, fotosintetički neaktivnim plastidima [10], gde se akumuliraju u lipoproteinskim partikulama, odnosno plastoglobulama, ali i u strukturama kao što su fibrili, membrane, kristali i tubule. Smatra se da se tokom sazrevanja plodova, kao i razvića cvetova, hromoplasti mogu diferencirati od bilo kog tipa plastida, nefotosintetičkih ili fotosintetičkih, u zavisnosti od tkiva u kojima se nalaze. Tako, na primer, u pojedinim delovima cveta hromoplasti nastaju od amiloplasta, gde je konverzija plastida praćena razgradnjom skroba i proizvodnjom šećernog nektara [11], dok prilikom diferencijacije hromoplasta od hloroplasta dolazi do potpune degradacije hlorofila, dezintegracije tilakoida i reorganiziranja membranskog sistema plastida, pri čemu se formiraju strukture u kojima će se potom akumulirati karotenoidi [12].

Biosinteza karotenoida

U poslednje dve decenije svi geni glavnog biosintetskog puta karotenoida su identifikovani, klonirani i funkcionalno okarakterisani [8, 13-16], Slika 1.

Biosinteza karotenoida započinje kondenzacijom dva molekula geranilgeranil-difosfata (GGPP) pomoću enzima fitoen-sintaze (PSY) pri čemu nastaje bezbojni fitoen (C40). Slede reakcije desaturacije pomoću enzima fitoen-desaturaze (PDS) i ζ-karoten-desaturaze (ZDS), kao i reakcije izomerizacije pomoću enzima ζ-karoten-izomeraze (Z-ISO) i karotenoid-izomeraze (CRTISO), nakon čega dolazi do formiranja crvenog *all-trans* likopena, prvog obojenog karotenoida [17]. U biosintetskom putu karotenoida likopen predstavlja tačku grananja i supstrat za dva kompetitivna enzima, likopen-β-ciklazu (LCYB) i likopen-ε-ciklazu (LCYE). Oba enzima katalizuju ciklizaciju linearnog molekula likopena na jednom ili oba njegova kraja pri čemu se formiraju cikloheksanski prstenovi. Dodavanjem jednog ε-prstena molekulu likopena pomoću LCYE nastaje δ-karoten. Potom, δ-karoten podleže daljoj ciklizaciji, ali pošto LCYE ne može da koristi monociklične karotenoide kao supstrat, dodavanje drugog, β-prstena vrši LCYB i tada nastaje narandžasti pigment α-karoten



Slika 1. Shema biosinteze karotenoida sa glavnim mestima u biosintetskom putu gde se vršila metabolička modulacija biosinteze. Skraćenice enzima u biosintetskom putu: GGPS - geranilgeranil pirofosfat sintaza; PSY - fitoen sintaza; PDS - fitoen desaturaza; ZDS - ζ-karoten desaturaza; LCYB - likopen-β-ciklaza; LCYE - likopen-ε-ciklaza; CHYB - β-karoten hidroksilaza; CYP97C - citohrom P450 monooksigenaza 97C; VDE - violaksantin de-epoksidaza; ZEP - zeaksantin epoksidaza; CCS - kapsantin-kapsorubin sintaza; NXS - neoksantin sintaza; HBFD - karotenoid 4-hidroksi-β-ring 4-dehidrogenaza; CBFD - karotenoid β-ring 4-dehidrogenaza.

[18]. Ukoliko je likopen supstrat za LCYB, prvo dolazi do dodavanja jednog β-prstena i nastaje γ-karoten, a potom isti enzim dodaje i drugi β-prsten pri čemu nastaje narandžasti pigment β-karoten [5], odnosno pro-vitamin A. Svi ovi karotenoidi koji se sastoje samo od ugljovodoničnog niza, uključujući i α- i β-karoten, nazivaju se karotenima.

U narednim koracima biosinteze karotenoida dejstvom hidroksilaza dolazi do dodavanja kiseonika cikličnim karotenima u vidu hidroksilnih grupa, kao i epoksidnih prstenova, dejstvom epoksidaza, gde nastaju ksantofili. Postoje dva različita tipa hidroksilaza: β-karoten-hidroksilaza (CHYB), koja hidroksiluje β-prsten cikličnog karotena, i citohrom P450 monooksigenaza 97C (CYP97C) koja hidroksiluje i β- i ε-prstene karotena. Hidroksilacijom α-karotena nastaje žuti pigment lutein koji predstavlja finalni produkt β,ε-granjanja u biosintezi karotenoida [19]. Sa druge strane, narandžasti pigment β-karoten podleže hidroksilaciji pomoću CHYB pri čemu nastaje žuti zeaksantin koji pomoću enzima zeaksantin-epoksidaze (ZEP) prelazi u anteraksantin i violaksantin. Dejstvom violaksantin-de-epoksidaze (VDE), violaksantin se može konvertovati nazad u zeaksantin. Ove reakcije epoksidacije i de-epoksidacije, kao i zeaksantin, anteraksantin i violaksantin, koji u njima učestvuju, sastavni su deo ciklusa ksantofila [2]. Anteraksantin i violaksantin, aktivnošću enzima kapsantin-kapsorubin sintaze (CCS), mogu biti konvertovani u kapsantin i kapsorubin, glavne karotenoide koji daju karakterističnu narandžastu i crvenu boju [15,20]. Poslednji korak u biosintezi karotenoida jeste konverzija violaksantina u neoksantin pomoću neoksantin-sintaze (NXS).

Dok je sinteza karotenoida u listovima u čvrstoj koordinaciji sa sintezom hlorofila, a njihov sastav i količina izuzetno konzervirani u višim biljkama [21], karotenoidni profili cvetova mogu se drastično razlikovati među biljnim vrstama, pa čak i među varijetetima iste vrste. Tako, na primer, narandžasti cvetovi *Osmanthus fragrans* Lour. i *Calednula officinalis* cv. 'Alice orange' nastaju akumulacijom β - i α - [22], odnosno β -, γ - i δ -karotena [23], dok su u žutim cvetovima *Gentiana lutea* [24], *Dendranthema grandiflorum* [25], *Eustoma* [26], *Ipomoea obscura* [27] i *Tagetes* [28] najčešći β , ϵ -ksantofili, od kojih su najprisutniji lutein i njegovi derivati. Istu boju daju i β , β -ksantofili, pa se tako u cvetovima *Oncidium* [29] i *Ipomoea sp.* [27] u najvećoj količini akumulira violaksantin. Violaksantin i anteraksantin cvetovima *Lilium spp.* cv. 'Conneticut King' daju žutu boju, dok su cvetovi kultivara 'Saija', gde se pored anteraksantina akumulira i kapsantin, crvene boje [30]. Dva pigmenta sa kraja biosintetskog puta karotenoida, kapsantin i kapsorubin, odgovorni su za crvene cvetove *Lilium tigrinum* cv. 'Red Night' [31].

Neke biljke akumuliraju i jedinstvene karotenoide, koji se retko nalaze u cvetovima drugih vrsta. Roze cvetovi *Hybiscus syriacus* nastaju akumulacijom lutein-5,6-epoksida, auroksantina i hrizantemaksantina [32], dok su izrazito crveni cvetovi *Adonis aestivalis* i *A. annua*, posledica akumulacije velike količine astaksantina [33]. U kruničnim listićima kalifornijskog maka (*Eschscholzia californica* Cham.) [34] i šafrana (*Crocus sativus*) [35] dominantno se akumulira krocetin, a u žigu tučka šafrana akumuliraju se apokarotenoidi, glikozidi krocetina i pirokrocina, koji im daju crvenu boju [36].

Takođe, značajna raznolikost karotenoidnih profila postoji i u plodovima biljaka. Plodovi paradajza (*Solanum lycopersicum*), na primer, imaju crvenu boju zahvaljujući likopenu koji čini 85% ukupnih karotenoida [37], dok su kapsantin i kapsorubin najzastupljeniji ksantofili u plodovima crvene paprike, *Capsicum annuum* [38]. Sa druge strane, boja korenova šargarepe (*Daucus carota*) i slatkog krompira (*Ipomoea batatas*) ili ploda dinje, rezultat je akumulacije velike količine β -karotena [39, 40].

Regulacija biosinteze i degradacije karotenoida

Uprkos važnosti i brojnim funkcijama koje karotenoidi imaju u biljkama, regulacija njihove sinteze i akumulacije nije u potpunosti razjašnjena. Do sada je utvrđeno da akumulacija karotenoida u različitim biljnim organima generalno zavisi od brzine sinteze i degradacije koje su regulisane na transkripcionom i post-transkripcionom nivou [41]. Međutim, posebno u nefotosintetičkim tkivima, ovi mehanizmi su pod snažnim uticajem brojnih internih (senescencija, cirkadijalni ritam, epigenetski mehanizmi i ABA) i eksternih signala kao što su svetlost, temperatura ili abiotički stres, što čini složenu mrežu regulacije, o kojoj još uvek ne postoji kompletna slika.

Transkripciona regulacija predstavlja prvi i primarni kontrolni mehanizam karotenogeneze, i u cvetovima viši nivoi transkriptata enzima biosinteze karotenoida povezani su sa većim sadržajem karotenoida [16,42]. Na primer, usled povećane ekspresije većine karotenogenih gena, posebno DXS i PSY, u narandžastim laticama nevena se akumulira mnogo veća količina ksantofila luteina nego u žutim [43], dok cvetovi azijskog ljiljana pokazuju veću ekspresiju gena biosinteze karotenoida u žutim ili narandžastim nego u belim cvetovima [27]. Biosinteza fitoena je početni korak koji određuje brzinu sinteze karotenoida i njihovu količinu [44]. Tako je u mladim cvetnim pupoljcima *Gentiana lutea* nivo ekspresije *psy* i *dxs* (1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat) gena najniži, dok sa povećavanjem ekspresije ova dva gena tokom sazrevanja cvetova dolazi do sve veće akumulacije karotenoida [45]. I u plodovima paradajza, prilikom njihovog sazrevanja i promene boje iz zelene u crvenu, povećana sinteza likopena nastaje zahvaljujući povećanoj transkripciji uzvodnih gena njegove biosinteze, kao što su *psy*, *pds* i *crts* [46]. U narednim koracima, snižavanje ekspresije ili odsustvo nekog od nizvodnih gena dovodi do akumulacije uzvodnih produkata biosinteze i određuje tip

karotenoida u hromoplastima [47]. Kod paradajza likopen se akumulira zahvaljujući sniženoj transkripciji nizvodnih gena kao što su *lcyb*, *lcy* i *chy*, dok je kod *Osmanthus fragrans* velika količina β -karotena u cvetovima rezultat nižeg nivoa transkripcije nizvodnih *chyb* i *ze* gena [48]. Kod ploda paprike žuta i narandžasta boja rezultat su odsustva, odnosno snižene ekspresije *ccs* gena [49]. Pored toga, razlika u aktivnosti LCYB i LCYE, enzima koji se nalaze u tački grananja biosintetskog puta karotenoida, može da utiče na balans između β , β - i β , ϵ -karotenoida [50]. U kruničnim listićima *Oncidium* visok procenat β , β -karotenoida povezan je sa većom ekspresijom *lcyb* u odnosu na *lcy* [51], dok je, nasuprot tome, u kruničnim listićima hrizanteme veća ekspresija *lcy* u odnosu na *lcyb* uzrok visokog procenta β , ϵ -karotenoida [52].

Kod nekih biljnih vrsta boja cvetova određena je ne samo sintezom karotenoida, već i njihovom degradacijom. Među familijom karotenoid-dioksigenaza (CCD), koje su odgovorne za dobijanje apokarotenoida i omogućavaju produkciju ABA i strigolaktona [53], katalitička aktivnost CCD1 i CCD4 može imati ulogu u determinaciji obojenosti cvetova i plodova. Najpoznatiji primer je hrizantema gde je ekspresija karotenoidnih biosintetičkih gena u žutim i belim cvetovima gotovo jednaka, ali su sintetisani karotenidi degradovani aktivnošću CCD4 koji se eksprimira samo u belim cvetovima [54]. Isti tako, i kod *Lilium bownii* var. *colchesteri*, nakon cvetanja boja se za jedan dan promeni iz žute u belu, usled smanjenja količine karotenoida u cvetovima kao rezultat povećane ekspresije *CCD4* [55]. Aktivnost *CCD4* je zabeležena i kod krokusa [56], cvetova krompira [57], kao i vrsta roda *Brassica* [58]. Pored toga, integracija gena za enzime GGPS, PSY, LCYB i CHYB iz *I. obscura* var. *lutea* sa žutim cvetovima i prisustvo novosintetisanih pigmenata zeaksantina i neoksantina, u cvetovima transgenih biljaka *I. nil* doveli su do promene boje cveta iz bele u žutu boju tek sa utišavanjem *CCD4* gena [59,60]. *CCD1* takođe degraduje karotenoide i doprinosi emisiji važnih komponenti mirisa cvetova petunije i *Osmanthus fragrans* [22, 61]. Međutim korelacija između ekspresije *CCD1* i akumulacije karotenoida nije jasna i pretpostavlja se da se *CCD1* nalazi u citoplazmi i da ima ograničen pristup karotenoidima u hromoplastima [36].

Transkripcioni faktori imaju ključnu ulogu u aktivaciji ili supresiji gena biosintetskog puta karoteinoda i mnogobrojni signalni putevi u odgovoru na uticaj sredine ili programe razvića stapaju se na nivou ovih regulatora ekspresije gena [41,62]. U poslednjoj deceniji prilično veliki broj pretpostavljenih regulatora transkripcije biosinteze karotenoida identifikovan je kod raznih biljnih vrsta, karakterističnih za različite tipove tkiva. Međutim, dok je njihova uloga u regulaciji biosintetskog puta karotenoida u fotosintetičkim tkivima ili pri sazrevanju plodova paradajza i citrusa bar jednim delom dobro izučena, podaci o transkripcionim faktorima koji kontrolišu metabolizam karotenoida u cvetovima prilično su oskudni. Do danas su poznata samo tri regulatora specifična za cvetove (*COI1/MYB305*, *RCP1* i *RCP2*), ali se gotovo ništa ne zna o njihovim funkcionalnim mehanizmima. *COI1/MYB305* kod duvana reguliše akumulaciju β -karotena i cvetnog nektara, utičući na transkripcionu regulaciju *NtPSY*, *NtZDS* i *NtLCY* gena [63]. *RCP1* otkriven je kod *Mimulus lewisii* i funkcioniše kao pozitivni regulator svih gena u biosintezi karotenoida, ali pošto mesta njegovog vezivanja za DNK još uvek nisu utvrđena, nije jasno da li on ima direktan ili indirektan uticaj na ekspresiju. Pored toga, *RCP1* ograničava biosintezu antocijanina i samim tim reguliše sadržaj karotenoida i antocijanina u cvetovima *M. lewisii* [64]. Identifikovan u istoj biljci, i *RCP2* pokreće ekspresiju gena celokupnog biosintetskog puta karotenoida, ali vrlo verovatno na indirektan način, preko regulacije formiranja hromoplasta [65].

Post-transkripcioni i post-translacioni mehanizmi predstavljaju dodatni nivo kontrole i finog podešavanja akumulacije karotenoida. Post-transkripciona regulacija uključuje kontrolu splajsovanja, dok se post-translaciona regulacija odvija kroz mehanizme kao što su protein-protein interakcije, povratne petlje, promene redoks stanja i metaboličko kanalisanje kroz komplekse više enzima [62]. Primer post-transkripcione regulacije je alternativno spajanje PSY, što rezultira varijantama PSY enzima različitih aktivnosti [66, 67].

Protein-protein interakcije enzima karotenogenog puta sa šaperonima i Clp proteazama pomažu u održavanju njihove stabilnosti i proteostaze, što je dokumentovano za DXS i PSY, glavne litimirajuće enzime biosintetskog puta karotenoida [68], dok stvaranje enzimskih kompleksa, poput GGPPS-PSY ili fuzije enzima u formiranju astaksantina može efikasno kanalisati međuproizvodne metabolite i povećati stopu karotenogeneze [69,70].

PROMENA BOJE CVETA PRIMENOM GENETIČKOG INŽENJERSTVA

U oblasti hortikulture, gde važan segment čine ukrasne biljne vrste, postoji stalna potreba za kultivirima sa izmenjenim karakteristikama, posebno sa novim bojama i drugačijim šarama cvetova. Sa razvojem biotehnologije stvoreni su uslovi za manipulaciju genima u cilju promene ovih karakteristika, a koje se ne mogu postići klasičnim ukrštanjem ili mutagenезom [71,72]. U poslednjih 35 godina najčešće je modifikovan put biosinteze antocijanina, najrasprostranjenijih pigmenata u prirodi. Na ovaj način postignute su nove boje cvetova kod najmanje 50 ukrasnih vrsta, a transgene linije karanfila (*Dianthus caryophyllus*) i ruža (*Rosa x hybrida*) sa plavom ili ljubičastom bojom cvetova, mogu se naći i u komercijalnoj prodaji [73,74].

Međutim, manipulacija biosintetskog puta antocijanina suočena je i sa nekoliko prepreka. Osnovni problem je što antocijanini, pre nego što se uskladište u vakuolama, često prolaze kroz procese glikozilacija, acilacija i metilacija koje potencijalno mogu uticati na promenu boje [75]. Ove reakcije je veoma teško kontrolisati, što otežava usmeravanje sinteze u pravcu stvaranja određenog antocijanina. Pored toga, antocijanini menjaju boju pod uticajem različitih faktora poput pH vakuole [76], kopigmentacije [77], kompleksacije metalnim jonima [78] i veličine i oblika ćelije [79], pa akumulacija odgovarajuće vrste antocijanina ne garantuje i očekivanu obojenost cvetova. Iz ovih razloga u poslednjoj dekadi fokus istraživanja promene boje cveta proširen je i ka metaboličkim modifikacijama druge glavne grupe pigmenata, karotenoida (Tabela 1).

Gen	Vrsta	Poreklo gena	Novosintetisani pigment	Boja cveta (divlji tip)	Promenjena boja	Referenca
crtW, crtZ	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Paracoccus</i>	Astaksantin	žuta	ružičasta	[81]
	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	Ehinenon derivati, astaksantin	žuta	crvena	[83]
	<i>Ipomoea obscura</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	Kantaksantin, adonirubin, astaksantin,	bela	ružičasta	[84]
crtW	<i>Petunia</i> sp.	<i>A. aurantiacum</i>	Astaksantin	svetlo-žuta	narandžasta	[85]
	<i>Lotus japonicus</i>	<i>A. aurantiacum</i>	Astaksantin	žuta	narandžasta	[86]
crtO	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Cyanobacterium synechocistis</i>	Ketolutein, ehinenon derivati, 4-ketozeaksantin	žuta	žuta	[82]
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Hematococcus pluvialis</i>	Astaksantin	žuta	crvena	[80]
crtB	<i>Iris germanica</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	Likopen	žuta	svetlo-crvena	[89]
	<i>Fortunella hindsii</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	Astaksantin	bela	narandžasta	[90]
GGPP, PSY, LCYB, crt1	<i>Ipomoea nil</i>	<i>Ipomoea obscura</i> , <i>Pantoea ananatis</i>	Zeaksantin, neoksantin	bela	bela	[59]
XES	<i>Petunia x hybrida</i>	<i>Ipomoea obscura</i> , <i>Tagetes erecta</i> , <i>Solanum lycopersicum</i>	Anteraksantin, zeaksantin, β -karoten, β -kriptoksantin	svetlo-žuta	nijanse narandžaste	[95]
BCH	<i>Oncidium</i>	supresija gena	Neoksantin, violaksantin	žuta	svetlo-žuta	[92]
CCD4	<i>Ch. morifolium</i>	supresija gena	-	žuta	bela	[36]
CCS	<i>Iris germanica</i>	<i>Lilium lancifolium</i>	Kapsantin, kapsorubin	žuta	nijanse crvene	[15]
	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Lilium lancifolium</i>	Kapsantin, kapsantinu-sličan	žuta	narandžasta	[101]
	<i>Viola cornuta</i>	<i>Lilium lancifolium</i>	Kapsantin	žuta	narandžasta	[96]

Tabela 1. Spisak gena i biljnih vrsta na kojima je dobijena promena boje cvetova putem genetičke modulacije biosinteze karotenoida.

Prvi podaci o uspešnosti metaboličkog inženjeringa biosinteze karotenoida dobijeni su početkom ovog veka, genetičkom modifikacijom duvana, *Nicotiana tabacum*. Tada su Mann i saradnici [80] introdukcijom gena za β -karoten-ketolazu (*crtO*) iz zelene alge *Haematococcus pluvialis* dobili biljke koje su akumulirale nove κ -karotenoide, naročito astaksantin i to pre svega u nektarijama cvetova. Kao rezultat, blede žute nektarije postale su svetlo-crvene. Nekoliko godina kasnije, slične rezultate su dobili Ralley i saradnici [81] koji su postigli sintezu astaksantina koristeći dva gena, 3,3'- β -hidroksilazu (*crtZ*) i 4,4'- β -oksigenazu (*crtW*), iz morskih bakterija roda *Paracoccus*. Nasuprot tome, transformacija *N. glauca crtO* genom iz cijanobakterija, nije dovela do akumulacije astaksantina, već samo ketokarotenoida kao što su 4'-ketolutein, ehinenone 3'-hidroksiehinenon i 4-ketozeaksantin, koji predhode njegovoj sintezi [82]. Akumulacija astaksantina kod *N. glauca* postignuta je tek uvođenjem *crtW* i *crtZ* iz *Brevundimonas sp.* [83]. Ekspresijom ovih gena, endogeni karotenoidi kao što su β -karoten i zeaksantin, uspešno su konvertovani u keto-hidroksilne karotenoide, uključujući i astaksantin, što je osim promene boje cveta iz žute u crvenu, izmenilo i boju listova, koji su u fazi senescencije bili crveni. Slični rezultati su dobijeni nedavno i genetičkom transformacijom ladoleža sa belim cvetovima sa *crtW* i *crtZ* genima. Pokazano je da 16,5% ukupnih karotenoida u listovima pripada grupi novosintetisanih ketokarotenoida. Takođe, potvrđena je mogućnost nasleđivanja ovih osobina na potomke [84]. Iako je ovim istraživanjima potvrđena mogućnost promene boje cveta ili njegovih određenih delova putem modifikacije biosinteze karotenoida, njihov cilj je prvenstveno bio demonstracija potencijala ove metode za proizvodnju komercijalno i farmakološki značajnih ketokarotenoida, kao što su kantaksantin i posebno astaksantin, koji se u prirodi izuzetno retko akumuliraju u tkivima biljaka. Prva studija usmerena na dobijanje novih boja cvetova ukrasnih biljaka putem modifikacije biosinteze karotenoida bila je transformacija kultivara petunije sa blede-žutim cvetovima *crtW* genom poreklom iz *Agrobacterium aurantiacum* [85]. U transgenim biljkama sintetisan je astaksantin, a u zavisnosti od stepena njegove akumulacije, boja cvetova kretala se od tamno žute pa sve do narandžaste. Slično tome, Suzuki i saradnici [86] upotrebili su *crtW* da uvedu biosintezu astaksantina u *Lotus japonicus*. Transformisane biljke akumulirale su nekoliko novih karotenoida u cvetovima, uključujući i astaksantin, što je promenilo njihovu prirodno žutu boju u različite nijanse narandžaste.

Pored genetičkog inženjeringa sinteze astaksantina, još jedna strategija manipulacije biosinteze karotenoida može biti iskorišćena za promenu boje cvetova. To je ektopična ekspresija gena za fitoen sintazu (*psy* kod biljaka i *crtB* kod bakterija) u cilju povećanja ukupnog sadržaja karotenoida. Kao što je navedeno ranije, sinteza fitoena je kod mnogih vrsta limitirajući faktor sinteze karotenoida i nivo ekspresije PSY u direktnoj je korelaciji sa akumulacijom karotenoida. Ovaj pristup prethodno je upotrebljen u cilju povećanja sadržaja karotenoida kod plodova paradajza, krtola krompira, lišća duvana i semena nekoliko biljnih vrsta [87]. Najpoznatiji primer njegove uspešnosti je introdukcija gena biosintetskog puta β -karotena (provitamin A) u endosperm pirinča [88], koji je prirodno bele boje i ne sadrži karotenoide. Nasuprot tome, u semenima *psy-crtI* transgenog pirinča, pored povećanja nutritivne vrednosti, došlo je i do promene boje u zlatno-žutu (eng. „golden rice”). Ove studije pokazale su da pojačana ekspresija gena za PSY ili CRTB u biljkama može rezultirati povećanom pigmentacijom i potencijalno dovesti do dobijanja novih nijansi cvetova. Tako je ekspresija *crtB* gena poreklom iz *Pantoea agglomerans*, kod *Iris germanica* cv. 'Fire Bride' dovela do promene boje plodnika i cvetne drške iz zelene u narandžastu, kao i prašnika i bazanog dela segmenta listova iz bele u roze [89], a kod *Fortunella hindsii* Swingle za posledicu imala promenu boje cveta iz bele u narandžastu, kao i promenu boje korenova i opalih listova [90]. Sa druge strane, introdukcija 5 gena (za GGPS, PSY, LCYB i CHYB preklom iz *I. obscura* i bakterijskog *crtI*), uprkos sintezi pigmenata zeaksantina i neoksantina, nisu doveli do promene bele boje cvetova *Ipomoea nil* [59]. Ovaj izostanak promene boje potvrdio je da količina akumuliranih karotenoida ne zavisi samo od ekspresije gena koji učestvuju u njihovoj biosin-

tezi, već i degradacije, koja je prvenstveno pod kontrolom CCD4. Žuta boja cvetova *I. nil* dobijena je tek utišavanjem gena za CCD4 ciljanom mutagenezom pomoću CRISPR/Cas9 sistema, kada je količina karotenoida u kuničnim listovima povećana za 20 puta u odnosu na cvetove kontrolnih biljaka [60]. Isto tako, gotovo potpunom supresijom ekspresije CCD4 uvođenjem dve sekvence CmCCD4aRNAi, boja cvetova kod kultivara hrizantema 'Jimba' promenjena je iz bele u žutu [91]. Utišavanje gena, kao još jedna efikasna strategija modifikacije boje cvetova, primenjeno je i kod *Oncidium* 'Gower Ramsey'. Snižavanjem ekspresije gena za β -karoten hidroksilazu (BCH) putem RNK interferencije, boja cvetova ovog varijeteta orhideja promenjena je iz jarko žute u svetlo žutu boju, usled smanjenja količine neoksantina i violaksantina [92].

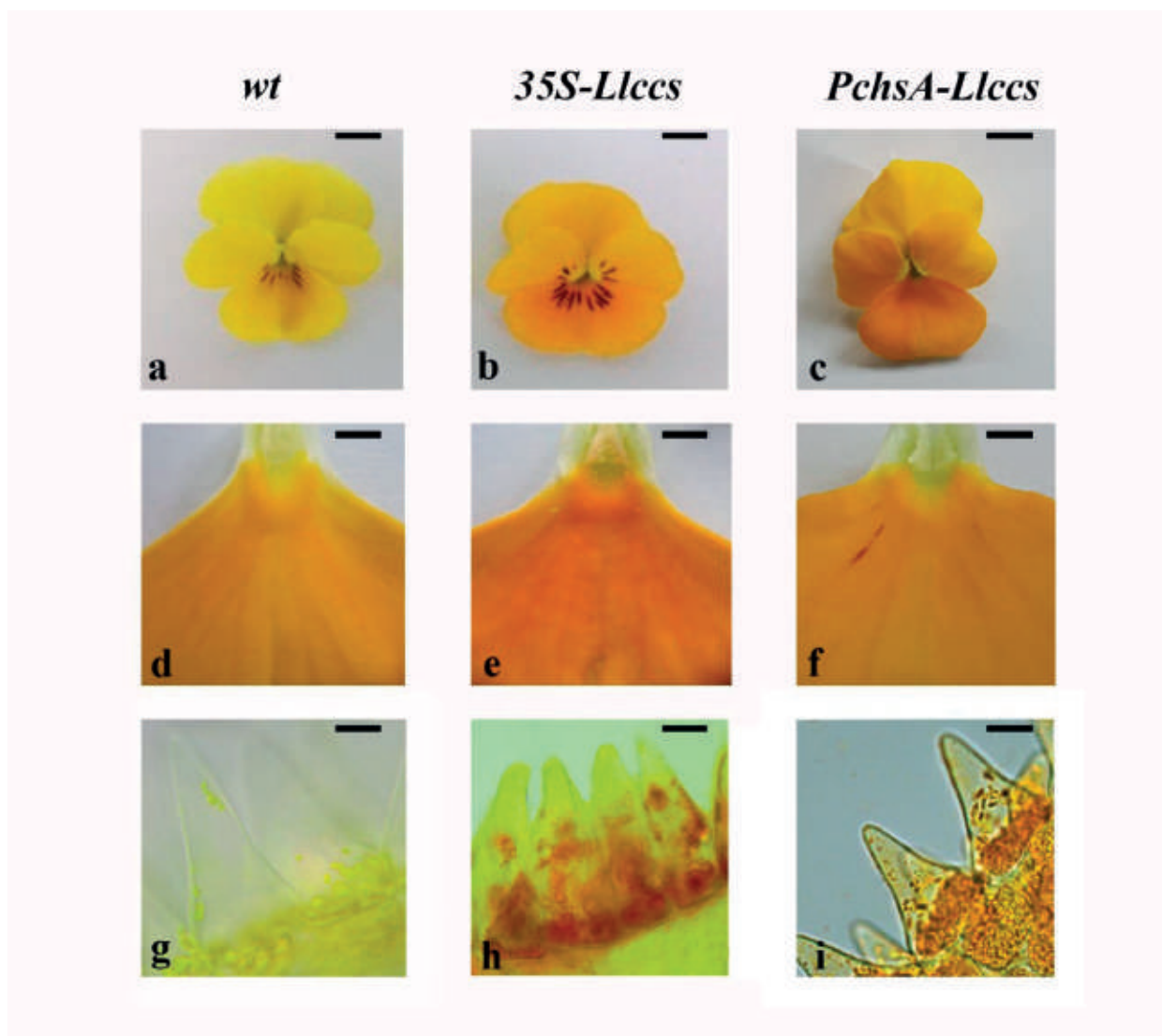
Još jedan važan faktor koji utiče na akumulaciju karotenoida, a čijom se manipulacijom može postići izmenjena boja cveta, jeste esterifikacija ksantofila. Enzim koji katalizuje ovaj proces, ksantofil esteraza (XES), prvobitno je indentifikovan analizom *pyp1* (PALE YELLOW PETAL 1) mutanata paradajza, čije cvetove karakterišu potpuno odsustvo estara ksantofila, smanjena količina ukupnih karotenoida i nepravilan razvoj hromoplasta [93]. Značaj esterifikacije ksantofila, takođe je potvrđen poređenjem svetlo žutih cvetova *Petunia hybrida* i tamno žutih cvetova njenog bliskog srodnika *Calibrachoa hybrida*, gde je pokazano da je nizak nivo XES i slab afinitet prema *trans*-ksantofilima ključni uzrok zbog koga cvetovi petunije nisu tamnije boje [94]. Štaviše, heterologna ekspresija XES poreklom iz žutih varijeteta paradajza, nevena ili *Ipomoea obscura* u transgenoj petuniji pospešila je esterifikaciju ksantofila, stvaranje karotenoid-lipoprotein vezujućih struktura u hromoplastima i uticala na ekspresiju endogenih gena biosinteze karotenoida - što je povećalo količinu akumuliranih karotenoida u laticama i dovelo do tamnije obojenosti cvetova [95].

I kao poslednji u nizu, gen za kapsantin-kapsorubin sintazu (*ccs*) pokazao se kao korisno oruđe u cilju promene boje cveta. Kapsantin-kapsorubin sintaza žute pigmente anteraksantin i violaksantin prevodi u pigmente koji daju crvenu boju, kapsantin i kapsorubin - dva ketoksantofila koji sadrže jedan, odnosno dva neuobičajena κ -prstena. To su glavni pigmenti crvene paprike i narandžastih ili crvenih cvetova nekoliko pripadnika *Lilium spp.*, a identifikovani su i kod nekoliko drugih vrsta kao što su *Aesculus* i *Berberis*. Spisak svih biljnih vrsta gde se sintetišu ovi pigmenti prikazan je u [96]. Do danas klonirani i funkcionalno okarakterisani su jedino *ccs* geni iz *C. annuum* [97] i *Lilium lancifolium* [98]. Efikasnost koriscenja *ccs* iz paprike pokazana je njegovom introdukcijom u *N. benthamiana* pomoću virusnog vektora, gde su listovi nakon transfekcije promenili boju usled sinteze i akumulacije kapsantina u hloroplastima [99]. Isto tako, heterologna ekspresija nekoliko gena biosintetskog puta karotenoida, uključujući *ccs* paprike, dovela je do akumulacije zeaksantina, astaksantina i kapsantina u endospermu pirinča [100]. Sa druge strane, funkcionalnost *ccs* gena iz *L. lancifolium* prvi put je pokazana u transgenom kalusu *Iris gerimanica*, gde je ekspresija *Llccs* pod kontrolom konstitutivnog CaMV 35S promotora dovela do značajne akumulacije kapsantina i kapsorubina, kao i promene boje iz žute u različite nijanse narandžasto-crvene [15].

Potencijal introdukcije, za cvet specifičnog, *Llccs* gena za modifikaciju biosinteze karotenoida pokazan je i kod dikotiledonih biljaka koje prirodno akumuliraju prekursore kapsantina i kapsorubina. Preusmeravanje biosinteze karotenoida prema kapsantinu i kapsantin-sličnom karotenoidu kroz ektopičnu ekspresiju *Llccs* gena pod kontrolom himernog promotora (E35S-PchsA), uspešno je primenjeno za promenu boje cveta paradajza i prvi je primer promene boje cveta bilo koje biljne vrste genetičkom modifikacijom biosinteze kapsantina [101]. Za razliku od žutih cvetova netransformisanih biljaka, cvetovi transformisanog paradajza bili su u različitim nijansama narandžaste boje, a novosintetisani pigmenti detektovani su ne samo u cvetovima već i u listovima transgenih biljaka.

Sitnocvetna ljubičica, *V. cornuta* L. je prva i za sada jedina ukrasna biljna vrsta kod koje je izmenjena boja cveta metaboličkim inženjeringom kapsantina [96]. U tu svrhu korišćeni su kultivari u čijim cvetovima,

koji su prirodno žute boje, dolazi do akumulacije velikih količina ksantofila, uključujući anteraksantin i violaksantin - koji su prekursori kapsantina i kaspurubina, ali prirodno ne dolazi do njihove biosinteze zbog nepostojanja *ccs* gena. Nakon uspostavljanja efikasnog protokola za *in vitro* regeneracije za ovu biljnu vrstu [102, 103], introdukcija i ekspresija *Llccs* pod kontrolom CaMV 35S dovela je do promene boje kruničnih listića cvetova iz žute u nijanse narandžaste boje (Slika 2 b, e, h). Pokazano je da je ova promena nastala usled akumulacije kapsantina, novosintetisanog pigmenta u hromoplastima transgenih biljaka, čija je količina bila proporcionalna nivou *Llccs* ekspresije [96]. Pored toga, istraživanja koja su u toku, pokazuju mnogo intenzivniju pigmentaciju hromoplasta pri ekspresiji *Llccs* pod kontrolom E35S-PchsA promotora - gde je pojačani 35S promotor fuzionisan sa promotorom gena za halkon sintazu (*chsA*) *Petunia hybrida*, koji usmerava cvet-specifičnu ekspresiju ovog gena - u odnosu na *Llccs* pod kontrolom konstitutivnog CaMV 35S (Slika 2 c, f, i). Ovo ukazuje da se povećanje sinteze kapsantina i/ili kaspurubina (kao i drugih karotenoida) radi postizanja intenzivnije obojenosti cvetova može postići pažljivim odabirom promotora, među kojima oni tkivno specifični mogu predstavljati najpodesnije kandidate.



Slika 1. Promena boje cvetova sitnocvetne ljubičice (*Viola cornuta*) nastala usled ektopijske ekspresije gena za kapsantin-kaspurubin sintazu poreklom iz cvetova ljiljana. (a) Cvet netransformisane biljke, wt-divlji tip; (b, c) Cvetovi transformisanih ljubičica dobijenih posle genetičkih transformacija pod kontrolom 35S (b) i 35S-PchsA promotora (c); (d) Detalj donjeg kruničnog listića netransformisane biljke i (e, f) transformisanih ljubičica dobijenih posle genetičkih transformacija pod kontrolom 35S (e) i 35S-PchsA promotora (f); (g) Čelije abaksijalne strane kruničnih listića netransformisane biljke i (h, i) transformisanih ljubičica dobijenih posle genetičkih transformacija pod kontrolom 35S (h) i 35S-PchsA promotora (i) gde se može uočiti akumulacija novosintetisanog pigmenta u hromoplastima. Barovi: a-c, 10 mm; d-f, 1 mm; g-i, 10 μ m.

Na kraju, mora se posebno naglasiti, da se samo kod malog broja biljnih vrsta prirodno sintetišu kapsantin i/ili kapsorubin [96,104]. Prirodni izvori hrane koji sadrže ova dva κ -ksantofila gotovo da su ograničeni na plodove paprike i njihove produkte. Zbog značaja za zdravlje, kao što su snažna aktivnost uklanjanja aktiviranog kiseonika i inhibicija peroksidacije lipida slobodnim radikalima [105] kao i potencijalna antitumorska aktivnost, kapsantin i kapsorubin su odlična ciljna grupa za genetički inženjering različitih biljnih vrsta kao izvora za proizvodnju ovih metabolita, kao i poljoprivrednih kultura u cilju poboljšanja njihove nutritivne vrednosti.

ZAKLJUČAK

Promena boje cveta metaboličkim inženjeringom biosintetskog puta karotenoida je relativno novo i do sada nedovoljno istraženo polje biotehnologije ukrasnih biljaka. Iako su genetičke manipulacije karotenogeneze koje prvenstveno nisu bile usmerene na promenu pigmentacije, potvrdile mogućnost promene boje cveta kako uvođenjem novih, tako i povećanom ekspresijom ili utišavanjem postojećih gena, ona je do sada dokumentovana za svega nekoliko ornamentalnih vrsta. Pored toga, najjednostavnija manipulacija biosintezom karotenida pomoću jednog gena najčešće ne dovodi do intenzivne promene u akumulaciji karotenoida (a time i intenzivne promene obojenosti cvetova). Povećanje njene efikasnosti, gotovo izvesno, zahteva introdukciju više gena i njihovu ekspresiju na jedan koordinisani način, što u metaboličkom inženjrstvu biljaka predstavlja poseban izazov.

Geni i enzimi u biosintetskom putu karotenoida opsežno su proučavani poslednjih 20 godina, međutim, regulacija, skladištenje i degradacija karotenoida u biljkama, a posebno u cvetovima, ostaje da se u potpunosti razjasni. Iako su istraživanja na klasičnim model-sistem biljakama, poput arabidopsisa, duvana ili paradajza, pružila osnovna znanja o različitim aspektima metabolizama i regulacije karotenoida, za nekoliko regulatornih gena i enzima, a posebno veliki broj faktora transkripcije, pokazalo se da snažno utiču na biosintezu i akumulaciju karotenoida kao odgovor na metaboličke, razvojne i sredinske signale. Poznavanje njihovog mehanizma delovanja i manipulacija ovim faktorima može biti ključna za dugoročni uspeh u metaboličkom inženjeringu biosintetskog puta karotenoida.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ugovor broj 451-03-68/2022-14-200007.

Literatura

1. Brockington SF, Yang Y, Gandia-Herrero F, Covshoff S, Hibberd JM, Sage RF et al. Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist* 2015; 207: 1170-80.
2. Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2015; 2: 15036.
3. Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Ughy B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research* 2013; 52: 539-61.
4. Hirschberg J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2010; 4: 210-18.
5. Zhu C, Bai C, Sanahuja G, Yuan D, Farré G, Naqvu S et al. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010; 504: 132-141.
6. Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Peuch-Pagès V, Dun EA, Pillot JP et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 2008; 455: 189-94.
7. Walter MH, Strack D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports* 2011; 28: 663-92.
8. Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 228-65.
9. Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 2014; 6: 466-88.
10. Waters M, Pyke K. Plastid development and differentiation. In: Møller SG (ed), Blackwell Publishing Ltd, Oxford. *Plastids* 2005; 13: 30-59.
11. Horner HT, Healy RA, Ren G, Fritz D, Klyne A, Seames C, Thornburg RW. Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection. *American Journal of Botany* 2007; 94: 12-24.
12. Bian W, Barsan C, Egea I, Purgatto E, Chervin C, Zouine M et al. Metabolic and molecular events occurring during chromoplast biogenesis. *Journal of Botany* 2011; 289859.
13. Cunningham FX, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1998; 49: 557-83.
14. Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 2008; 54: 733-49.
15. Jeknić Z, Morré JT, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen THH. Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from Tiger Lily (*Lilium lancifolium* Thunb. 'Splendens'). *Plant Cell Physiology* 2012; 53: 1899-912.
16. Ohmiya A. Qualitative and quantitative control of carotenoid accumulation in flower petals. *Scientia Horticulturae* 2013; 163: 10-9.
17. Isaacson T, Ohad I, Beyer P, Hirschberg J. Analyses *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology* 2004; 136: 4246-55.
18. Cunningham FX, Gantt E. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ϵ -cyclases. *Proc. of the National Academy of Sciences of the USA* 2001; 98: 2905-10.
19. Nisar N, Li L, Shan I, Khin NC, Pogson BJ. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant* 2015; 8: 68-82.
20. Guzman I, Hamby S, Romero J, Bosland PW, O'Connell MA. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Science* 2010; 179: 49-59.
21. Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel E. T. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. 2011; *BMC Syst. Biol.* 5 (1), 77.
22. Baldermann S, Kato M, Kurosawa M, Kurobayashi Y, Fujita A, Fleischmann P. et al. Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. *Journal of Experimental Botany* 2010; 61: 2967-2977.
23. Kishimoto S, Maoka T, Sumitomo K, Ohmiya A. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 2005; 65: 2781-2787.

24. Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G. cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1625: 305-308.
25. Kishimoto S, Maoka T, Nakayama M, Ohmiya A. Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Phytochemistry* 2004; 65: 2781-2787.
26. Nakayama M, Miyasaka M, Maoka T, Yagi M, Fukuta N. A carotenoid-derived yellow Eustoma screened under blue and ultraviolet lights. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 2006; 75: 161-165.
27. Yamamizo C, Kishimoto S, Ohmiya A. Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *Journal of Experimental Botany* 2010; 61: 709-719.
28. Park YJ, Park SY, Arasu VA, Al-Dhabi NA, Ahn HG, Kim JK et al. Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tagetes* flowers. *Molecules* 2017; 22: 313.
29. Hieber AD, Mudalige-Jayawickrama RG, Kuehnle AR. Color genes in the orchid *Oncidium Gower Ramsey*: identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta* 2006; 223: 521-531.
30. Yamagishi M, Kishimoto S, Nakayama M. Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of Asiatic hybrid lily. *Plant Breeding* 2010; 129: 100-107.
31. Marki-Fisher E, Eugster CH. Das carotenoid spektrum der antheren und petalen von *Lilium tigrinum* cv. 'Red Night'. *Helvetica Chimica Acta* 1985; 68: 1708-1715.
32. Hanny BW, Henson RD, Thompson AC, Gueldner RC, Hedin PA. Identification of carotenoid constituents in *Hybiscus syriacus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1972; 20: 914-916.
33. Cunneungham FX, Gantt E. A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant Journal* 2005; 41: 478-492.
34. Wakelin AM, Lister CE, Conner AJ. Inheritance and biochemistry of pollen pigmentation in California poppy (*Eschscholzia californica* Cham.) *International Journal of Plant Science* 2003; 164: 867-875.
35. Frusciante S, Diretto G, Bruno M, Ferrante P, Pietrella M, Prado-Cabrero A et al. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proc. of National Academy of Science of the USA* 2014; 111: 12246-12251.
36. Ohmiya A, Kato M, Shimada T, Nashima K, Kishimoto S, Nagata M. Molecular basis of carotenoid accumulation in horticultural crops. *The Horticulture Journal* 2019; 88: 135-149.
37. Tadmor Y, King S, Levi A, Davis A, Meir A, Wasserman B et al. Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. *Food Research International* 2005; 38: 837-841.
38. Kim JS, An CG, Park JS, Lim YP, Kim S. Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes and cultivation methods. *Food Chemistry* 2016; 201: 64-71.
39. Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2015; 2: 15036.
40. Burri BJ. Evaluating sweet potato as an intervention food to prevent vitamin A deficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2011; 10: 118-130.
41. Stanley L, Yuan YW. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: So many regulators, so little consensus. *Frontiers in Plant Science* 2019; 10, 1017.
42. Shilpa P, Ravishankar KV, Shivashankara KS, Sadashiva AT, Kumar NS. Molecular mechanisms involved in biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *Journal for Horticultural Science* 2017; 11: 91-103.
43. Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, Della Penna D. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology* 2001; 45: 281-293.
44. Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L. Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular Plant* 2018; 11: 58-74.
45. Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, Nishihara M, Sandmann G. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Molecular Biology* 2002; 48: 277-285.
46. Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2015; 2: 15036.
47. Galpaz N, Burger Y, Lavee T, Tzuri G, Sherman A, Melamed T, et al. Genetic and chemical characterization of an EMS induced in *Cucumis melo* CRTISO gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2013; 539: 117-125.

48. Han Y, Wang X, Chen W, Dong M, Yuan W, Liu X et al. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans*. *Tree Genetics and Genomes* 2014; 10: 329-338.
49. Rodriguez-Urbe L, Guzman I, Rajapakse W, Richins RD, O'Connell MA. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany* 2012; 63: 517-526.
50. Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, Kandianis CB, Sowinski SG et al. Natural genetic variations in lycopen epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 2008; 319: 330-333.
51. Chiou CY, Pan HA, Chuang YN, Yeh KW. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars. *Planta* 2010; 232: 937-948.
52. Kishimoto S, Ohmiya A. Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Physiologia Plantarum* 2006; 128: 437-447.
53. Ibdah M, Azulay Y, Portnoy V, Wasseerman B, Bar E, Meir A. et al. Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* 2006; 67: 1579-1589.
54. Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S, Sumimoto K. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology* 2006; 142: 1193-1201.
55. Hai NTL, Masuda J, Miyajima I, Thien NQ, Mojtahedi N, Hiramatsu M et al. Involvement of carotenoid cleavage dioxygenase 4 gene in tepal color change in *Lilium brownii* var. *colchesteri*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 2012; 81: 366-373.
56. Rubio-Moraga A, Ahrazem O, Rambla JL, Granell A, Gómez-Gómez L. Crocins with high levels of sugar conjugation contribute to the yellow colours of early-spring flowering crocus tepals. *PLoS ONE* 2013; 8: e71946.
57. Campbell R, Ducreux LJ, Morris WL, Morris JA, Suttle JC, Ramsay G. et al. The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase 4 from potato. *Plant Physiology* 2010; 154: 656-664.
58. Zhang B, Liu C, Wang Y, Yao X, Wang F, Wu J et al. Disruption of a carotenoid cleavage dioxygenase 4 gene converts flower color from white to yellow in *Brassica* species. *New Phytologist* 2015; 206: 1513-1526.
59. Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, Ohmiya A, Ono M. Overexpression of carotenogenic genes in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. *Plant Biotechnology* 2017; 34: 177-85.
60. Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, Ohmiya A, Ono M. Alteration of flower colour in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Research* 2018; 27: 25-38.
61. Simkin AJ, Underwood BA, Auldridge M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E. et al. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of β -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology* 2004; 136: 3504-3514.
62. Sun T, Li L. Toward the 'golden' era: the status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants. *Plant Science* 2020; 290: 110331
63. Wang W, Liu G, Niu H, Timko MP, Zhang H. The F-box protein COI1 functions upstream of MYB305 to regulate primary carbohydrate metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. TN90). *Journal of Experimental Botany* 2014; 65 (8): 2147-2160.
64. Sagawa JM, Stanley LE, la Fountain AM, Frank HA, Liu C, Yuan YW. An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in *Mimulus lewisii* flowers. *New Phytologist* 2016; 209: 1049-1057.
65. Stanley, L. E., Ding, B., Sun, W., Mou, F., Hill, C., Chen, S., et al. A tetratricopeptide repeat protein regulates carotenoid biosynthesis and chromoplast development in monkeyflowers (*Mimulus*). *Biorxiv* 2017; 171249.
66. Ahrazem O, Diretto G, Argandoña J, Fiore A, Rubio Moraga A, Rial C., et al. The specialised roles in carotenogenesis and apocarotenogenesis of the phytoene synthase gene family in saffron. *Frontiers in Plant Science* 2019; 10: 249.
67. Chen L, Li W, Li Y, Feng X, Du K, Wang G. et al. Identified trans-splicing of YELLOW-FRUITED TOMATO 2 encoding the PHYTOENE SYNTHASE 1 protein alters fruit color by map-based cloning, functional complementation and RACE. *Plant Molecular Biology* 2019; 100: 647-658.
68. Pulido P, Llamas E, Llorente B, Ventura S, Wright, LP, Rodríguez-Concepción M. Specific Hsp100c haperones determine the fate of the first enzyme of the plastidial isoprenoid pathway for either refolding or degradation by the stromal Clp protease in Arabidopsis. *PLoS Genet* 2016; 12: e1005824.

69. Camagna, M., Grundmann, A., Bär, C., Koschmieder, J., Beyer, P., Welsch, R. 2019. Enzyme fusion removes competition for geranylgeranyl diphosphate in carotenogenesis. *Plant Physiol*, 179: 1013–1027.
70. Nogueira M, Enfissi EM, Welsch R, Beyer P, Zurbriggen MD, Fraser PD, Construction of a fusion enzyme for astaxanthin formation and its characterisation in microbial and plant hosts: a new tool for engineering ketocarotenoids. *Metabolic Engineering* 2019; 52: 243–252
71. Azadi P, Bagheri H, Nalouisi AM, Nazari F, Chandler SF. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advances* 2016; 34: 1073–1090.
72. Noman A, Aqeel M, Deng J, Khalid N, Sanaullah T, Shuilin H. Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science* 2017; 8: 530.
73. Holton TA. Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing same. Patent Publication number 1996; WO/96/36716.
74. Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hues flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiology* 2007; 48: 1589–1699.
75. Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N. et al. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010; 74: 1760–1769.
76. Yoshida K, Miki N, Momonoi K, Kawachi M, Katou K, Okazaki Y. et al. Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009; 85: 187–197.
77. Takeda K, Fujii A, Senda Y, Iwashina T. Greenish blue flower colour of *Strongylodon macrobotrys*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2010; 38: 630–633.
78. Momonoi K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K et al. A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant Journal* 2009; 59: 437–447.
79. Dyer AG, Whitney HM, Arnold S.J, Glover BJ, Chittka L. Mutations perturbing petal cell shape and anthocyanin synthesis influence bumblebee perception of *Antirrhinum majus* flower colour. *Arthropod-Plant Inte* 2007; 1: 45–55.
80. Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nature Biotechnology* 2000; 18: 888–92.
81. Ralley L, Enfissi EMA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM, Fraser PD. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant Journal* 2004; 39: 477–86.
82. Zhu C, Gerjets T, Sandmann G. *Nicotiana glauca* engineered for the production of ketocarotenoids in flowers and leaves by expressing the cyanobacterial *crtO* ketolase gene. *Transgenic Research* 2007; 16(6): 813–21.
83. Mortimer CL, Misawa N, Perez-Fons L, Robertson FP, Harada H, Bramley PM et al. The formation and sequestration of nonendogenous ketocarotenoids in transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology* 2017; 173: 1617–35.
84. Otani M, Kitayama K, Ishikuro H, Hattori J, Maoka T, Harada H et al. Construction of transgenic *Ipomoea obscura* that exhibits new reddish leaf and flower colors due to introduction of *b'carotene* ketolase and hydroxylase genes. *Plant Biotechnology* 2021; 38, 219–226.
85. Umemoto N, Takano M, Shimada H, Mamiya K, Toguri T. Flower color modification by xanthophyll biosynthetic genes in petunia. *Plant cell Physiology Suppl.* 2006; S110.
86. Suzuki S, Nishihara M, Nakatsuka T, Misawa N, Ogiwara I, Yamamura S. Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Reports* 2007; 26: 951–9.
87. Rosati C, Diretto G, Giuliano G. Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects. *Biotechnol. Genet. Eng.* 2009; 26: 151–174.
88. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P et al. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 2000; 287: 303–305.
89. Jeknić Z, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen TH. Alteration of flower color in *Iris germanica* L. 'Fire Bride' through ectopic expression of phytoene synthase gene (*crtB*) from *Pantoea agglomerans*. *Plant Cell Reports* 2014; 33: 1307–21.
90. Cao H, Wang J, Dong X, Han Y, Ma Q, Ding Y et al. Carotenoid accumulation affects redox status, starch metabolism, and flavonoid/anthocyanin accumulation in citrus. *BCM Plant Biology* 2015; 15: 27.

91. Ohmiya A, Sumitomo K, Aida R. "Yellow Jimba": Suppression of carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) expression turns white chrysanthemum petals yellow. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 2009; 78: 450-455.
92. Wang HM, To KY, Lai HM, Jen ST. Modification of flower colour by suppressing β -ring carotene hydroxylase in *Oncidium*. *Plant Biol.* 2016; 18, 220–229.
93. Ariizumi T, Kishimoto S, Kakami R, Maoka T, Hirakawa H, Suzuki Y et al. Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 2014; 79: 453-465.
94. Kishimoto S, Oda-Yamamizo C, Ohmiya A. Comparison of petunia and calibrachoa in carotenoid pigmentation of corollas. *Breeding Science* 2019; 69: 117-26.
95. Kishimoto S, Oda-Yamamizo C, Ohmiya A. Heterologous expression of xanthophyll esterase genes affects carotenoid accumulation in petunia corollas. *Scientific Reports* 2020; 10, 1299.
96. Trajković M, Jevremović S, Dragičević M, Simonović AD, Subotić AR, Milošević S et al. Alteration of flower color in *Viola cornuta* cv. "Lutea Splendens" through metabolic engineering of capsanthin/apsorubin synthesis. *Horticulturae* 2021; 7(9): 324.
97. Bouvier F, Hugueney P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B. Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant Journal* 1994; 6: 45–54.
98. Jeknić Z, Morré JT, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen THH. Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from Tiger Lily (*Lilium lancifolium* Thunb. 'Splendens'). *Plant Cell Physiology* 2012; 53: 1899-912.
99. Kumagai MH, Keller Y, Bouvier F, Clry D, Camara B. Functional integration of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin–capsorubin synthase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* 1998; 14: 305–315.
100. Ha SH, Kim JK, Jeong YS, You MK, Lim, SH, Kim JK. Stepwise pathway engineering to the biosynthesis of zeaxanthin, astaxanthin and capsanthin in rice endosperm. *Metab. Eng.* 2019; 52: 178–189.
101. Jeknić S. Alteration of flower color in *Solanum lycopersicum* through ectopic expression of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from *Lilium lancifolium*. Bachelor's Thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, USA, 2015; pp. 1–37.
102. Antonić D, Trajković M, Cingel A, Subotić A, Jevremović S. Plant regeneration from *in vitro*-derived leaf and petiole explants of *Viola cornuta* L. 'Lutea Splendens'. *Propagation of Ornamental Plants* 2017; 17: 95–102.
103. Trajković M, Antonić D, Cingel A, Ghalawenji N, Subotić A, Jevremović S. Advancement in protocol for *in vitro* seed germination, plant regeneration and cryopreservation of *Viola cornuta*. *3 Biotech* 2019; 9: 17.
104. Deli J, Matus Z, Tóth G. Carotenoid composition in the fruits of *Asparagus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 2793–2796.
105. Maoka T, Goto Y, Isobe K, Fujiwara Y, Hashimoto K, Mochida K. Antioxidative activity of capsorubin and related compounds from paprika (*Capsicum annuum*). *J. Oleo. Sci.* 2001; 50: 663–665.



NAPREDNE METODE MOLEKULARNE BIOLOGIJE

ADVANCED METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY



Bioinformatički alati za analizu mikroRNK

Katarina Zeljić

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: katarina.zeljic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Otkrivanje velikog sveta nekodirajućih RNK molekula i njihove regulatorne funkcije je rezultovalo značajnim porastom broja publikacija i interesovanja istraživača za ovu oblast. Posebno su brojna istraživanja jedne od klasa malih nekodirajućih RNK, mikroRNK (miRNK), kao biomarkera za predikciju, dijagnozu i prognozu različitih humanih patologija. Razvoj i primena bioinformatičkih alati za analizu miRNK koje su slobodno dostupne na internetu su omogućile sprovođenje funkcionalnih analiza miRNK, njihovih interakcija i asocijacija sa humanim bolestima. Primenom tzv. *in silico* softvera za miRNK analizu istraživačima je omogućeno relativno jednostavno izvođenje zaključaka i dalje preciznije usmeravanje toka istraživanja. U poglavlju će biti dat pregled nekoliko odabranih i besplatno dostupnih bioinformatičkih alata čije korišćenje ne zahteva poznavanje programiranja, a koje omogućavaju sprovođenje detaljnih analiza miRNK, funkcionalnih anotacija i asocijacija sa humanim bolestima.

Ključne reči: miRNK, bioinformatika, *in silico*, softver, alat

Bioinformatics tools for the analysis of microRNA

Katarina Zeljić

University of Belgrade – Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

Correspondence: katarina.zeljic@bio.bg.ac.rs

Abstract

The discovery of a large world of non-coding RNA molecules and their regulatory functions has resulted in a significant increase in publications and research interest in this field. There are numerous studies of one of the classes of small non-coding RNA, microRNA (miRNA) as a biomarker for the prediction, diagnosis and prognosis of various human pathologies. The development and application of bioinformatics tools for miRNA analysis that are freely available on the internet have enabled the implementation of functional analyzes of miRNAs, their interactions and associations with human diseases. Applying the so-called *in silico* software for miRNA analysis allowed researchers to relatively easily draw conclusions and precisely direct the flow of research. The chapter will provide an overview of several selected and freely available bioinformatics tools whose use does not require knowledge of programming, and which allow detailed analysis of miRNAs, functional annotations and associations with human diseases.

Key words: miRNA, bioinformatics, *in silico*, software, tools

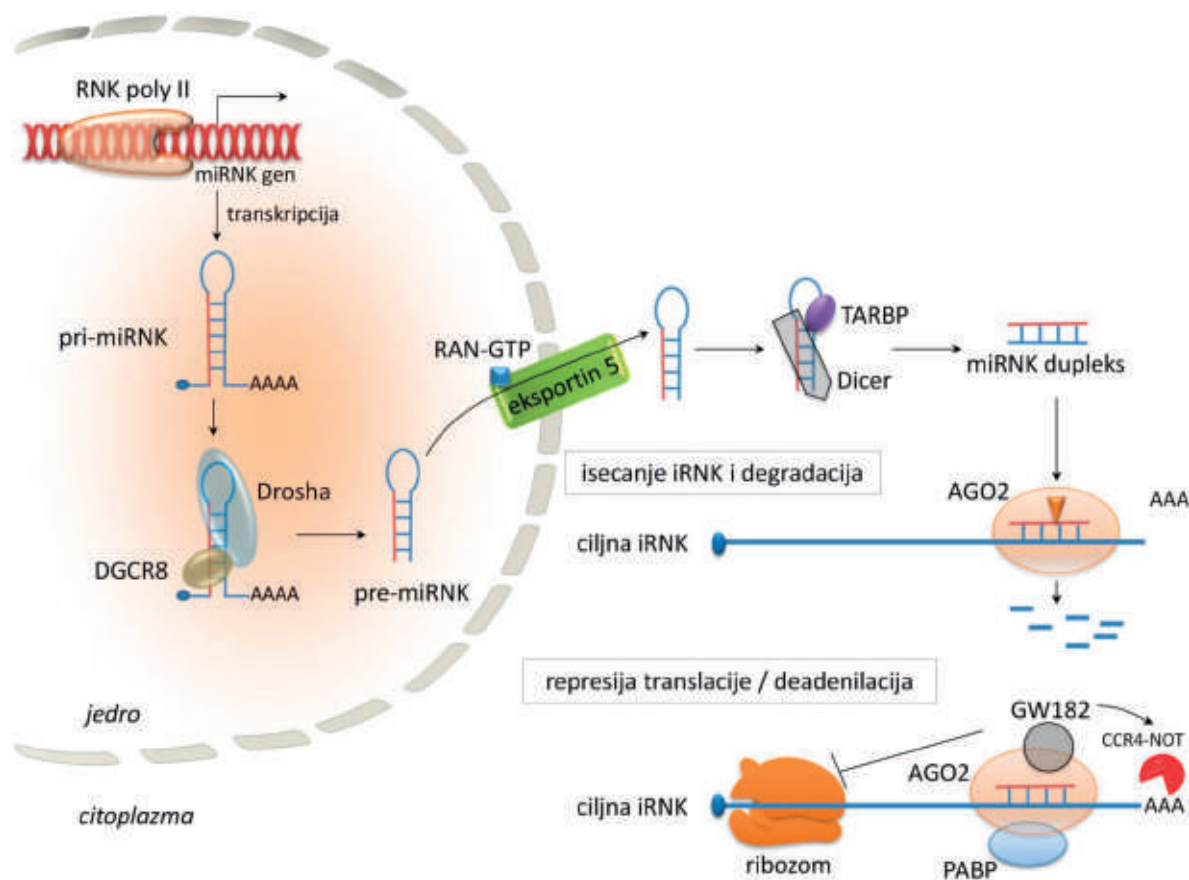
UVOD

MikroRNK: ULOGA I BIOGENEZA

Kraj XX veka je u oblasti molekularne biologije doneo važna otkrića i rasvetljenje postojanja velikog segmenta nekodirajućeg genoma, tj. nekodirajućih RNK. Isprva se mislilo da je veći deo humanog genoma sačinjen od proten-kodirajućih gena, da bi takav stav bio potpuno izmenjen saznanjem da je manje od 2% humanog genoma protein-kodirajuće. Izuzevši klasu informacione RNK (iRNK), svi drugi RNK molekuli su nekodirajući. Među njima najveću pažnju zauzimaju male i duge nekodirajuće RNK, koje se poslednje decenije veoma intenzivno proučavaju. Male nekodirajuće RNK, dužine oko 20-30 nukleotida, imaju ulogu u procesu utišavanja gena – RNK interferenciji (engl. RNA interference). One se mogu podeliti na tri klase: male interferirajuće RNK, mikroRNK i piwi RNK. Klasifikacija je izvršena prema dužini, biogenezi, tj. načinu obrade prekursora od kog nastaju, proteina sa kojim ulaze u kompleks za utišavanje i bioloških procesa u čijoj kontroli učestvuju.

Jedna od klasa malih nekodirajućih RNK, mikroRNK (miRNK) su jednolančani molekuli RNK dužine od 18-24 nukleotida koje imaju važnu ulogu regulatora ekspresije ciljnih gena na posttranskripcionom nivou [1]. Reč je o endogenoj i evoluciono očuvanoj grupi regulatornih RNK koje su identifikovane kod različitih vrsta. Prva miRNK *lin-4* je otkrivena 1993. godine kod vrste nematode *Caenorhabditis elegans* [2], a u narednom periodu je kod čoveka, kao i drugih vrsta otkriven homolog *lin-4*. Prva miRNA identifikovana kod čoveka 2000. godine je bila *let-7*. Od tada pa do danas je rastao broj identifikovanih miRNK kod različitih pripadnika živog sveta. Prema podacima iz centralne baze, miRBase, koja sadrži popis svih do sada otkrivenih miRNK produkata kod 271 vrste, navedeno je da ukupan broj miRNK iznosi preko 38 000. Kod čoveka je do danas otkriveno preko 2 500 miRNK.

Uloga miRNK je višestruka i neophodna za normalnu regulaciju homeostaze ćelije, razvića, proliferacije, diferencijacije i apoptoze [3]. Za ostvarivanje regulatorne funkcije, neophodno je da zrele forme miRNK budu sintetisane. Zrele miRNK nastaju složenim i fino regulisanim procesom koji započinje transkripcijom miRNK gena delovanjem RNK polimeraze II (Slika 1). Primarni transkript koji nastaje, pri-miRNK, dužine nekoliko hiljada nukleotida, podleže obradi u jedru delovanjem endoribonukleaznog enzima Drosha koji dimerizuje sa dvolančanim RNK vezujućim proteinom DGCR8 (engl. Di George critical region 8), čime nastaje pre-miRNK koja ima strukturu ukosnice i dužine je oko 70-100 nukleotida. Pre-miRNK se transportuje iz jedra u citoplazmu pomoću Exportin 5/RAN-GTP kompleksa. Delovanjem endoribonukleaznog enzima Dicer i kofaktora TARBP (engl. TAR RNA binding protein) se vrši dalja obrada u citoplazmi i nastaje miRNK dupleks. Samo jedan lanac iz miRNK dupleksa će imati ulogu u posttranskripcionoj regulaciji i naziva se "vodeći lanac", dok će preostali, "lanac putnik", biti degradovan. Razdvajanje miRNK lanaca miRNK dupleksa zavisi od termodinamičke stabilnosti i stabilnosti sparivanja baza na 5' kraju. Zrela miRNK, zajedno sa proteinom iz familije Argonaut (AGO2 proteinom), GW182 i PABP čini utišavajući kompleks - RISC (engl. RNA induced silencing complex). Regulacija ekspresije gena se ogleda u endonukleolitičkoj degradaciji iRNK ciljnih gena od strane efektornog proteina AGO2 usled prepoznavanja i vezivanja regiona semena (engl. seed region), kog čini 2-7 nukleotida 5' kraja miRNK, sa 3' netranslatirajućim regionom (engl. 3'- untranslated region, 3'-UTR) iRNK. Vezivanje miRNK sa iRNK nije perfektno (potpuno) kod životinja, za razliku od biljaka. Drugi vid posttranskripcione regulacije od strane miRNK podrazumeva represiju procesa translacije ili deadenilaciju iRNK. Ovo su vidovi regulacije koji se najčešće aktiviraju ukoliko sparivanje miRNK i iRNK nije perfektno. Iako su miRNK prevashodno poznate kao molekuli koji dovode do represije translacije, postoje podaci koji ukazuju da miRNK mogu da deluju i kao aktivatori translacije [4, 5].



Slika 1. Biogeneza miRNK molekula i njihova funkcija. RNK polimeraza II vrši transkripciju miRNK gena. miRNK geni se nalaze u intergenskim regionima, ali se mogu nalaziti i u intronima protein kodirajućih i nekodirajućih gena, kao i u egzonima. Transkripcijom nastaje pri-miRNK, dužine oko 1kb, koja podleže obradi u jedru i citoplazmi. U jedru se delovanjem endoribonukleaze Drosha i kofaktora DGCR8 vrši isecanje „drške“ pri-miRNK i nastaje pre-miRNK dužine oko 65 nukleotida. Nakon završetka obrade u jedru, pre-miRNK se transportuje u citoplazmu eksportinom 5 sa kofaktorom RAN-GTP. U citoplazmi endoribonukleaza Dicer sa kofaktorom TARBP nastavlja obradu uklanjanjem petlje pre-miRNK čime nastaje miRNK dupleks dužine oko 22 nukleotida. Selektovani lanac vodič iz miRNK dupleksa ima ulogu u posttranskripcionoj regulaciji ekspresije ciljnih gena. Lanac vodič miRNK zajedno sa AGO2 proteinom čini kompleks za utišavanje, koji će, nakon što se prepoznaju i spare regioni semena miRNK i 3' netranslatirajući region ciljne iRNK, vršiti degradaciju iRNK, translacionu represiju ili deadenilaciju. iRNK će biti degradovana utišavajućim kompleksom u slučaju perfektnog sparivanja miRNK-iRNK. U slučaju neperfektnog miRNK-iRNK sparivanja dolazi do represije translacije narušavanjem inicijacionog kompleksa ili deadenilacije koju vrši CCR4-NOT koja je regrutovana od strane proteina GW182 i PABP.

Jedna zrela miRNK može regulisati ekspresiju nekoliko gena, a ekspresija jednog gena može biti regulisana sa nekoliko različitih miRNK. Koliko je važna uloga ovih molekula u posttranskripcionoj kontroli nivoa gena ilustruje podatak da je oko 2/3 humanog genoma regulisano posredstvom miRNK [6]. Poremećena regulacija nivoa miRNK je odlika različitih patoloških stanja kod čoveka, npr. razvoja malignih tumora, kardiovaskularnih bolesti i dr. S obzirom na fizičke i biološke karakteristike koje imaju, miRNK mogu se koristiti kao pogodni biomarkeri za dijagnozu i prognozu različitih bolesti, uključujući malignitete [7-9]. U telesnim tečnostima životinja su prisutne cirkulišuće miRNK koje su upakovane u vanćelijske mikrovezikule ili egzozome [3], što pored činjenice da miRNK imaju ulogu u međućelijskoj komunikaciji, ukazuje da one mogu biti vrlo korisni neinvazivni biomarkeri različitih patoloških stanja u organizmu, kao što je kancer [3, 10].

Porast znanja naučne zajednice o miRNK i uopšte akumulacija velikih količina podataka je praćena paralelnim razvojem bioinformatike za potrebe karakterizacije i analize miRNK koja je istraživačima u ovoj oblasti dala brojne pogodnosti.

ZNAČAJ RAZVOJA BIOINFORMATIČKIH ALATA ZA ANALIZU miRNA

Veliko interesovanje istraživača posvećeno izučavanju miRNA u različitim kontekstima, npr. povezanosti sa humanim patologijama, je u prethodnoj deceniji vodilo intenzivnom razvoju kako eksperimentalnih, tako i razvoju analitičkih kompjuterskih pristupa, tj. bioinformatike i bioinformatičkih alata. Danas su istraživačima na raspolaganju mnogobrojni softveri koji se mogu relativno lako koristiti za detekciju i identifikaciju miRNA, predikciju ciljnih gena, funkcionalnu anotaciju, asocijaciju miRNA sa humanim bolestima i druge vidove analiza miRNA od interesa. Važan aspekt u razvoju ovakvih softvera je posedovanje programerskih veština. Imajući u vidu da su krajnji korisnici napravljenih softvera prevashodno istraživači, koji neretko ne poznaju programiranje u dovoljnoj meri, od velike je važnosti da softveri budu jednostavni, laki i intuitivni za korišćenje. Stiče se utisak da je u današnje vreme sprovođenje istraživanja u oblasti miRNA gotovo nemoguće bez upotrebe *in silico* alatki. Nastojanje bioinformatičara je razvoj što preciznijih, pouzdanijih i brzih softvera koji bi naišli na sve veću upotrebu kod korisnika. Zajednička saradnja istraživača i programera je upravo omogućila razvoj takvih softvera [11].

Razvoj visokopropusnih tehnika je omogućio da se za relativno kratko vreme analizom odgovarajućih bioloških uzoraka identifikuju brojne miRNA. Nakon identifikacije sledi karakterizacija, što uključuje i korišćenje softvera za funkcionalne anotacije. Ovaj korak je važan za utvrđivanje miRNA molekula koje su uključene u određenim biološkim procesima [12]. U tu svrhu se sprovode takozvane analize obogaćivanja (engl. enrichment) o kojima će takođe biti reči u okviru ovog poglavlja. Značaj kompjuterskog pristupa u analizi miRNA omogućava i fokusiranija istraživanja koja se mogu validirati u eksperimentalnim uslovima, bilo u *in vitro*, *in vivo* modelima ili na kliničkim uzorcima.

Evidentno je da akumulacija velikih količina podataka uslovljava upotrebu bioinformatičkih alata, što je odlika bazičnih i aplikativnih istraživanja miRNA. Veliki broj alata je besplatno dostupan na internetu i može se koristiti na on line platformi - internetu (engl. web based tool). Cilj ovog poglavlja je davanje kratkog pregleda dostupnih internet alata za analizu miRNA koji može poslužiti istraživačima za brz odabir najpogodnijeg softvera za potrebe njihovih eksperimenata.

PREGLED BIOINFORMATIČKIH ALATA

Do sada ne postoji ni jedan sveobuhvatni bioinformatički alat u okviru kog bi se mogla uraditi celokupna analiza tj. svi tipovi mogućih analiza miRNA od početka do kraja. Stoga su razvijeni pojedinačni softveri za različite tipove analiza miRNA, kao i nekolicina integrativnih alata. Broj publikovanih radova u vezi sa novo-razvijenim alatima za analizu miRNA je u značajnom porastu poslednjih 20 godina. Posebno interesovanje istraživača za to se može ilustrovati i činjenicom da je broj dostupnih softvera za miRNA analizu znatno viši u poređenju sa drugim nekodirajućim RNA molekulima [13]. Većina alatki je razvijena kao platforma na internetu, što ih čini lako dostupnim, jednostavnim za upotrebu i bez poznavanja programiranja. Pored njih, postoje softveri čije korišćenje zahteva instalaciju na lokalnom računaru, ali takvi alati nisu razmatrani u okviru ovog poglavlja.

Dostupni internet alati se mogu podeliti na nekoliko grupa, u zavisnosti od mogućnosti koje pružaju:

- (1) alati za identifikaciju miRNA i baze podataka
- (2) alati za predikciju targeta miRNA - predviđanje vezujućih mesta miRNA
- (3) alati za funkcionalnu karakterizaciju (anotaciju)
- (4) alati za utvrđivanje interakcija miRNA-miRNA, kao i miRNA i drugih nekodirajućih RNA molekula
- (5) alati za asocijaciju miRNA sa humanim bolestima

Navedena podela alata nije isključiva i jedinstvena i može biti detaljnija u zavisnosti od primenjenih kriterijuma za klasifikaciju. Na primer, prema nekim autorima, jedna od mogućih podela je na sedam grupa i to: baze podataka koje sadrže miRNA sekvence, validacija targeta, predikcija targeta, podaci o miRNA ekspresiji, miRNA funkcija, uloga miRNA u signalnim putanjama i mrežama i uloga miRNA u bolestima [14]. Neki od alata imaju više razvijenih mogućnosti za analizu, pa bi se stoga mogli svrstati u nekoliko kategorija. Radi preglednosti, za potrebe ovog poglavlja je urađen pregled bioinformatičkih alati prema gore navedenim grupama.

S obzirom na veliki broj i raznovrsnost postojećih bioinformatičkih alata za analizu miRNA, grupa istraživača iz Poljske je dizajnirala platformu pod nazivom Tools4miRs, dostupnoj na web strani <https://tools4mirs.org/> u okviru koje se može naći preko stotinu alati svrstanih u odgovarajuće kategorije [15]. Ova platforma je otvorena za istraživače koji se bave razvojem novih alata da na Tools4miRs mogu besplatno da postavljaju softvere koje su razvili. Istraživači imaju mogućnost i da filtriraju opcije na platformi prilikom pretraživanja da bi došli do softvera koji u potpunosti ispunjava njihove potrebe za analizom miRNA. Sveukupno, ovakva platforma predstavlja i značajan vid uštede vremena istraživača prilikom traženja željenog softvera za miRNA analizu kod odgovarajuće vrste.

Pored prethodno navedene platforme, miRTollsGallery, dostupna na: <http://mirtoolsgallery.tech/mirtoolsgallery/>, je još jedna od baza koja sadrži na jednom mestu alate za analizu miRNA i to vršenjem pretraživanja, sa mogućnošću filtriranja i rangiranja alati [16]. Na ovoj platformi takođe postoji mogućnost slanja novorazvijenih softvera od strane istraživača. Navedene dve platforme su posebno pogodne za pretraživanje prilikom pisanja revijskih radova na temu alati za miRNA analizu ili pravljenja komparacija dostupnih softvera koji pružaju iste mogućnosti za analizu.

Na internet strani <https://www.tamirna.com/micrnas-web-based-tools/> je dat kratak pregled samo oko 20 internet miRNA alati, koji nije sistematizovan poput prikaza alata na Tools4miRs i miRTollsGallery.

Za potrebe ovog poglavlja je vršena pretraga dostupnih alata za analizu miRNA u literaturi tj. publikovanim naučnim člancima i revijskim radovima, kao i pretragom Tools4miRs platforme. Pri pretraživanju Tools4miRs baze je vršena filtriranje prema model organizmu, tipu alata i njegovoj dostupnosti. S obzirom na veliki značaj izučavanja miRNA kod čoveka, za pretragu dostupnih alata je kao model organizam navođen čovek, a za dostupnost alata - online (korišćen filter za pretragu: human AND data collection (različit u zavisnosti od kategorije alata, npr. za grupu alata za asocijaciju miRNA sa humanim bolestima je korišćen Disease/Pathways) AND online). Vršen je dalji izbor alati za prikaz u radu u zavisnosti od toga da li alat ispunjava traženi/zadati kriterijum, kao i da li je link za alat funkcionalan, s obzirom da se neretko u literaturi i bazama navode alati za koje web strane nisu više dostupne, tj. ne postoje. Kako je veliki broj besplatno dostupnih softvera, za potrebe ovog poglavlja će biti izdvojene samo neke od njih, čiji će kratak pregled biti dat za svaku od pet grupa alata koje su prethodno navedene.

Alati za identifikaciju miRNA i baze podataka

Prva i istovremeno najveća razvijena javna baza podataka - repozitorijum, koja sadrži sve informacije o do sada identifikovanim miRNA kod različitih vrsta je miRBase [17]. U okviru nje se mogu pronaći sekvence pre-miRNA i zrelih miRNA formi. Dodatno, miRBase je polazna tačka za jasno utvrđen i nedsmismilen sistem imenovanja, tj. nomenklature miRNA. Od uspostavljanja ove baze podataka 2002. godine do danas je deponovano oko 38 589 unosa iz 271 vrste [18].

Iako se čini da je broj do sada identifikovanih miRNA kod različitih vrsta ogroman, smatra se da nisu sve još uvek otkrivene. Metodološki pristupi koji omogućavaju otkrivanje novih miRNA uključuju kloniranje,

Northern blot, mikroereje, *in situ* hibridizaciju i sekvenciranje nove generacije [19, 20]. U potpunoj realizaciji tog dela važno mesto zauzimaju alati za predikciju prekursorskih i/ili zrelih miRNA molekula. Razvijeni su algoritmi koji u obzir uzimaju karakteristike miRNA, kao što su sekvenca, sekundarna struktura tj. struktura ukosnice, evoluciona očuvanost sekvence i dr. Pretraživanjem Tools4miRs platforme je napravljen popis softvera za predikciju i validaciju novih miRNA i prekursora koji su dostupni online, a koji su predstavljeni u Tabeli 1.

Alat	Link	Referenca
BioVLAB-MMIA-NGS	http://epigenomics.snu.ac.kr/biovlab_mmia_ngs/	[21]
CPSS	https://mcg.ustc.edu.cn/bsc/cpss/	[22]
DARIO	http://dario.bioinf.uni-leipzig.de/	[23]
sRNAbench	https://arn.ugr.es/srnatoolbox/newbench/	[24]
miRNA-dis	http://bliulab.net/miRNA-dis/	[25]
miRNAFold	https://evryrna.ibisc.univ-evry.fr/evryrna/mirnafold/	[26]
miRNAMiner	http://groups.csail.mit.edu/pag/mirnaminer/	[27]
miRQuest	http://mirquest.integrativebioinformatics.me/	[29]
novomiRank	https://ccb-compute2.cs.uni-saarland.de/novomirank/	[30]
Oasis 2.0	http://oasis.dzne.de/	[31]
SSCprofiler	http://mirna.imbb.forth.gr/SSCprofiler.html/	[32]
Chimira	http://www.ebi.ac.uk/research/enright/software/chimira/	[33]

Tabela 1. Odabrani alati za identifikaciju prekursora i/ili zrelih miRNA

BioVLAB-MMIA-NGS [21] je online razvijeni sistem za integrisanu analizu ekspresije miRNA i iRNA korišćenjem podataka dobijenih sekvenciranjem nove generacije, analizu putanja i genskih setova, kao i predikciju novih miRNA kandidata. Pored analize podataka dobijenih iz humanih uzoraka, ovaj alat ima mogućnost analize podataka miša, rezus majmuna i pirinča.

CPSS [22] je bioinformatički alat koji omogućava predikciju novih miRNA, kao i njihovih ciljnih gena, funkcionalnu anotaciju miRNA i kvantifikaciju malih RNA na osnovu podataka RNA sekvenciranja.

DARIO [23] pruža mogućnost analize sekvence dobijene RNA sekvenciranjem, što je i mogućnost koju nudi i sRNAbench alat [24]. Korišćenjem miRNA-dis [25] se mogu identifikovati miRNA prekursori na osnovu unosa sekvence u FASTA formatu uz istovremenu vizualizaciju sekundarne strukture miRNA prekursora. miRNAFold [26] je online program koji takođe omogućava identifikaciju miRNA prekursora, kao i strukturu ukosnice miRNA brzo uz visoku senzitivnost. Podatak za unos u miRNAFold je sekvenca celog genoma. Ovaj alat ne daje sekvencu zrele miRNA.

Homologe sekvence miRNA među brojnim životinjskim vrstama, uključujući i čoveka, se mogu pretražiti pomoću softvera miRNAMiner [27]. Ovaj softver je povezan i sa alatom miRNAviewer [28] koji daje globalni vizuelni prikaz homologih sekvenci miRNA različitih vrsta.

U okviru alata miRQuest [29] je moguće integrisati nekoliko softvera za identifikaciju i predikciju miRNA i uporediti predikcione alate, pri čemu se za unos koristi sekvenca u FASTA formatu.

novoMiRank se koristi za rangiranje novo identifikovanih miRNK [30], Oasis 2.0 je razvijen kao alat za brzu i efikasnu analizu RNK-seq podataka kod bilo kog organizma [31], dok SSCprofiler omogućava predikciju novih miRNK prekursora [32]. Chimira [33] alat se koristi za detekciju miRNK, bez mogućnosti detekcije novih miRNK.

Alati za predikciju targeta miRNK - predviđanje miRNK vezujućih mesta

Najvažniji segment u radu sa miRNK predstavlja izučavanje njihove regulatorne uloge, tj. predikcija i validacija gena čija je ekspresija regulisana na posttranskripcionom nivou od strane miRNK. Kritičnu tačku u funkcionalnoj karakterizaciji miRNK predstavlja precizna identifikacija miRNK vezujućih mesta, tj. target gena. U tu svrhu su razvijeni brojni bioinformatički alati koji na osnovu odgovarajućih algoritama vrše predikciju targeta miRNK. Kako je za prepoznavanje i vezivanje iRNK neophodan region semena (2-7 nukleotida na 5' kraju miRNK) koji se vezuje za 3'-UTR region iRNK, najveći broj *in silico* alata zahteva postojanje komplementarnog sparivanja između targeta i miRNK. Činjenica da između miRNK i iRNK target gena, kod životinja, ne mora da postoji savršeno (kompletno) sparivanje čini predviđanje mesta vezivanja komplikovanijim [34]. To predstavlja jedan od osnovnih izazova u predikciji targeta. Dodatno, važno je da algoritmi imaju što manji broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata tj. pogrešnih predviđanja. Stoga se uporedo sa porastom znanja u oblasti regulatorne uloge miRNK razvili algoritmi različitih softvera za predikciju targeta koji mogu koristiti različite kriterijume - pristupe za predviđanja vezujućih mesta i to: stepena komplementarnosti regiona semena miRNK i 3'-UTR iRNK, evoluciona očuvanost sekvence vezujućih regiona među različitim vrstama, slobodne energije tj. termodinamičke stabilnosti dupleksa miRNK-iRNK (obično niža energija odgovara većoj stabilnosti), dostupnost mesta vezivanja, zastupljenost vezujućih mesta koja se odnosi na broj mesta vezivanja miRNK u datoj iRNK. Pored navedenih, postoje i manje zastupljeni pristupi za predviđanje target gena, kao što je lokalni sadržaj AU oko vezujućih mesta i GU „kolebanje” (engl. GU wobble) u vezivanju regiona semena. Različiti algoritmi najčešće koriste kombinacije različitih pristupa za predviđanje vezujućih mesta čime se povećava nivo senzitivnosti i preciznosti predviđanja. U istraživačkoj praksi se često radi kombinovanje rezultata dobijeno korišćenjem većeg broja alata s ciljem smanjenja lažno pozitivnih i negativnih rezultata.

Dokazivanje target gena samo eksperimentalnim pristupom bi zahtevalo dosta novca i vremena. S druge strane *in silico* način predviđanja gena čija je ekspresija regulisana posredstvom miRNK od našeg interesa je relativno brz i jednostavan. Stoga primena alata za predikciju targeta može značajno skratiti taj put i postupak smanjenjem tj. sužavanjem broja potencijalnih ciljnih gena za validaciju. Kako dobijeni rezultati nisu konačni, identifikacija miRNK targeta primenom *in silico* pristupa zahteva eksperimentalnu validaciju *in vitro* i/ili *in vivo*. Na primer, luciferazni reporterski esej predstavlja najčešće korišćen pristup za identifikaciju i validaciju miRNK-targeta, potom CLIP (engl. cross-linking combined with co-immunoprecipitation), mikroereji itd.

Predikcija i funkcionalna analiza miRNK targeta se može raditi pomoću DIANA-microT-CDS softvera [35, 36]. Od inicijalne verzije alata prvi put objavljene 2009. godine, algoritam za predikciju targeta je značajno poboljšan prevashodno u pogledu senzitivnosti predikcije targeta. Pored čoveka predikcija se može vršiti i za miRNK drugih vrsta i to: *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*. Za pretraživanje je dovoljno uneti naziv miRNK ili gena od interesa. Sveobuhvatnost predikcije ciljnih gena korišćenjem ovog alata se ogleda u kombinovanju svih iznad navedenih pristupa za predviđanje vezujućih mesta miRNK.

miRDB [37, 38] je softver za predikciju i funkcionalnu anotaciju miRNK target gena koji pored čoveka omogućava pretragu miRNK targeta kod još četiri životinjske vrste: miša, pacova, kokoške i psa.

mirDIP [39] je jedan od integrativnih alata koji uključuje preko 30 resursa i kojim se mogu pronaći ciljni geni miRNK. Ovaj alat ima mogućnost tzv. jednosmernog predviđanja, u kom se na osnovu unetog naziva miRNK ili gena od interesa mogu pretražiti interakcije između miRNK i gena. U slučaju dvosmernog testiranja, korisnik mora da unese i miRNK i gen, pri čemu će softver pretražiti sve moguće asocijacije bilo koje unete miRNK sa bilo kojim navedenim genom. I jednosmerna i dvosmerna pretraga se mogu vršiti prema stepenu pouzdanosti rezultata (veoma visoko -1%, visoka -5%, srednja - prva 1/3 i niska pouzdanost - donje 2/3). Program nudi i mogućnost pretrage grupe miRNK koje imaju istu grupu ciljnih gena i obrnuto, drugim rečima moguće je napraviti matriks interakcija humanih miRNK-iRNK. Pored navedenog postoji i mogućnost pretrage miRNK u različitim humanim tkivima.

miRGate [40] je takođe integrativni alat koji uključuje nekoliko kompjuterskih (RNAhybrid, Miranda, PITA, TargetScan, MicroTar) i validiranih pojedinačnih softvera (miRTarBase, mirecords, TarBase, OncomiRDB) za predviđanje vezujućih mesta miRNK kod čoveka, miša i pacova. Interesantno je napomenuti da mirDIP ima oko 60 miliona više predikcija u poređenju sa miRGate [39].

Algoritam TargetScan Human alata vrši predikciju targeta na osnovu komplementarnosti i evolucione očuvanosti sekvence regiona semena [41], dok PITA softver pored evolucione očuvanosti koristi i podatke o termodinamičkoj stabilnosti tj. računanja slobodne energije miRNK-iRNK dupleksa i dostupnosti mesta vezivanja [42].

RNA22 [43] omogućava predikciju vezujućih mesta miRNK na osnovu slobodne energije. U okviru softvera je moguće raditi interaktivnu predikciju unošenjem sekvenci miRNK i gena u FASTA formatu.

TargetSpy [44] ima mogućnost jednostavne pretrage miRNK vezujućih mesta na osnovu unosa miRNK od interesa. Ukoliko postoji interesovanje za specifični transkript, moguće je uneti ga u pretragu ili u suprotnom pretražiti sve moguće targete miRNK za koju se vrši pretraga. Algoritam se zasniva na mašinskom učenju, bez obzira na prisustvo komplementarnosti regiona semena.

RNAhybrid v.2.2 [45, 46] je softver koji omogućava brzo i efikasno predviđanje većeg broja - višestrukih potencijalnih vezujućih mesta miRNK molekula i RNK. Osnovni pristup na kom se zasniva predikcija je pronalaženje energetski najstabilnijih (sa minimalnom slobodnom energijom) mesta hibridizacije između dve sekvence, miRNK i RNK, pri čemu nisu dozvoljene intramolekularne hibridizacije. Sekvence od interesa moraju biti unete u FASTA formatu. Korisniku softvera je omogućeno da sam bira odlike, tj. poziciju i dužinu regiona semena i GU sparivanje [46]. Pored toga što je program slobodno dostupan na internetu, može se i preuzeti i koristiti na lokalnom računaru.

Korišćenjem GUUGle alata [47] je moguće utvrditi sparivanje sekvenci od interesa na osnovu komplementarnog sparivanja i GU parova. Prema proceni autora ovog revijskog rada, ovaj alat je manje specifičan u poređenju sa RNAhybrid v.2.2 koji je dizajniran prevashodno za miRNK i iRNK.

PicTar [48] pruža predviđanje vezujućih mesta miRNK kod kičmenjaka, sedam vrsta roda *Drosophila*, tri vrste *Nematoda*, i koeksprimiranih miRNK i iRNK u različitim tkivima. Algoritam se zasniva na kombinovanju sledećih pristupa: poravnanju sekvenci i komplementarnosti regiona semena, evolucionoj očuvanosti i termodinamičkoj stabilnosti.

IntaRNA [49, 50] je razvijen kao program koji predviđa interakcije između dva molekula RNK, pri čemu je predikcija moguća i za iRNK vezujuća mesta od strane nekodirajućih RNK, uključujući miRNK. Za pretraživanje je neophodno uneti sekvence u FASTA formatu, a postoji mogućnost pretrage podešavanjem parametara za region semena (npr. minimalni broj baznih parova, GU parovi, pozicija regiona semena itd.)

miRabel [51] daje mogućnost pretraživanja miRNK targeta bilo unošenjem naziva miRNK, target gena ili putanje. Ovaj softver objedinjuje podatke iz predikcionih algoritama MiRanda, Pita, SVMicro i TargetScan i baze podataka miRwalk. Na taj način se povećava specifičnost identifikacije miRNK targeta u poređenju sa pretraživanjem korišćenjem pojedinačnih navedenih alata.

miRmap [52] pruža mogućnost pretraživanja unosom naziva miRNK ili sekvence kod čoveka, miša, pacova, krave, zebrice itd.

STarMir [53] alat na osnovu podataka dobijenih metodom *cross-linking* precipitacije (CLIP) vrši predikciju miRNK vezujućih mesta.

TargetRank [54] vrši predikciju na osnovu sparivanja u 3'-UTR iRNK i miRNK od interesa. Primećeno je da ovaj alat koristi podatke iz miRBase v10 što ukazuje da nije ažuriran. Ovaj podatak svakako treba uzeti u obzir prilikom izbora bioinformatičkog alata za predikciju ciljnih gena.

U ovu grupu alata bi se mogli svrstati i oni koji daju i pregled validiranih vezujućih mesta, tj. ciljnih gena čija je ekspresija regulisana od strane miRNK. Pod validacijom ciljnih gena se podrazumeva sprovođenje funkcionalnih studija koje podrazumevaju upotrebu barem jedne od navedenih metoda: reporterski esej, Western blot, qRT-PCR, mikroerej i sekvenciranje nove generacije.

miRWalk [55, 56] je integrativni softver koji sadrži informacije predviđenih i eksperimentalno validiranih interakcija miRNK i targeta kod čoveka i drugih vrsta i to: miš, pacov, krava, pas, riba. U osnovi predikcije se nalazi algoritam mašinskog učenja. Pretraživanje se može vršiti unosom pojedinačnih miRNK ili gena, pri čemu je za unos miRNK neophodan tačan naziv ili broj iz miRBase, a za gene zvanični naziv gena, RefSeqID, EntrezID ili EnsemblID. U okviru softvera postoji i napredna opcija pretraživanje liste miRNK ili gena.

miRTarBase [57, 58] funkcioniše kao svojevrsna baza koja sadrži podatke o eksperimentalno validiranim interakcijama miRNK i target genima. Podaci se prikupljaju iz publikovanih studija i pretraga je moguća za čoveka, miša, pacova, ali i brojne druge vrste kako životinja tako i biljaka. Za pretragu je dovoljno uneti naziv miRNK od interesa, ali se pretraživanje može vršiti i prema target genima, signalnim putevima, metodom validacije, nazivu bolesti i publikovanim radovima. Za validirane ciljne gene su navedene tehnike koje su korišćene za validaciju. Npr. upotreba metoda reporterskog esej, western blot i qRT-PCR predstavljaju jak dokaz validiranog target gena u poređenju sa onim koji su validirani metodama kao što su majkroerej, CLIP-seq, pa se za takve validacije smatra da su slabijeg dokaza. Baza se redovno ažurira i poslednja verzija, miRTarBase 9.0 je dostupna od septembra 2021. godine [58].

DIANA-TarBase v.8 [59] takođe sadrži podatke o eksperimentalno validiranim miRNK-iRNK parovima. Poslednja verzija sadrži oko 670 000 jedinstvenih miRNK-iRNK parova. Pretraga se vrši unošenjem naziva miRNK i/ili gena. Podaci su dostupni za čoveka, kao i niz drugih vrsta, npr. šimpanzu, makaki majmuna, miš, pacov, zebrica, *Caenorhabditis elegans*, ali i različitih vrsta biljaka, virusa itd. Filtriranje podataka se može vršiti prema nekoliko kriterijuma, npr. tipu validacije (direktna ili indirektna), tipu ćelija, tkiva, korišćene metode za validaciju (nisko i visokopropusna – engl. low and high-throughput), metodi (qPCR, HITS-CLIP, LAMP, PAR-CLIP itd.)

Pri korišćenju *in silico* alata od velikog značaja je ažuriranje softvera. Neki se regularno usavršavaju, dok to nije slučaj sa drugim alatima. Taj podatak svakako treba uzeti u obzir prilikom izbora alata za predviđanje targeta. Na primer, DIANA-microT-CDS, TargetScan, miRDB spadaju u regularno ažurirane alatke. Za neke programe koji spadaju u ovu grupu alata, nisu bile aktivne internet strane, kao za npr. EIMMo3 [60].

Navedeni predikcioni alati se mogu koristiti nezavisno. U današnje vreme su se pojavile internet platforme koje omogućavaju integraciju više različitih algoritama.

ComiR [61] se može koristiti za utvrđivanje targetovanja jedne iRNK od strane više miRNK. U osnovi se nalazi korišćenje četiri predikciona algoritma miRanda, PITA, TargetScan, mirSVR, čijim kombinovanjem se dobija rezultata iRNK-miRNK interakcija kod čoveka, *Drosophila melanogaster*, miša i *Caenorhabditis elegans*.

miRecords [62] je integrativna internet platforma za predikciju interakcija miRNK i ciljnih gena kod nekoliko životinjskih vrsta. Pri pretraživanju postoje dve opcije: eksperimentalno validiranih ciljnih gena, ali i kompjuterska predikcija na osnovu integracije podataka dostupnih u 11 programa za predviđanje vezujućih mesta miRNK (DIANA-microT, MicroInspector, MirTarget2, miTarget, NBmiRTar, PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid i TargetScan/TargetScanS).

Odabrani alati za predikciju ciljnih gena regulisanih od strane miRNK su prikazani u Tabeli 2.

Alat	Link	Referenca
DIANA-microT-CDS	http://www.microrna.gr/webServer/	[35]
miRDB	http://mirdb.org/	[37, 38]
mirDIP	https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/	[39]
miRGate	http://mirgate.bioinfo.cnio.es/	[40]
TargetScan Human	https://www.targetscan.org/	[41]
PITA	https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/index.html/	[42]
RNA22	https://cm.jefferson.edu/rna22/	[43]
TargetSpy	http://www.targetspy.org/	[44]
RNAhybrid v.2.2	https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/	[45, 46]
GUUGle	https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/google/	[47]
PicTar	https://pictar.mdc-berlin.de/	[48]
IntaRNA	http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp/	[49, 50]
miRabel	http://bioinfo.univ-rouen.fr/mirabel/	[51]
miRmap	https://mirmap.ezlab.org/	[52]
STarMir	https://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmirtest2.pl/	[53]
TargetRank	http://hollywood.mit.edu/targetrank/	[54]
miRWalk	http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/	[55, 56]
miRTarBase	https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php/	[57, 58]
DIANA-TarBase v.8	http://www.microrna.gr/tarbase/	[59]
ComiR	http://www.benoslab.pitt.edu/comir/	[61]
miRecords	http://c1.accurascience.com/miRecords/download.php/	[62]

Tabela 2. Odabrani alati za predikciju ciljnih gena regulisanih od strane miRNK

Alati za anotaciju i funkcionalnu karakterizaciju miRNK

Jedan od koraka u analizi miRNK je funkcionalna karakterizacija miRNK lista tj. miRNK od interesa. Važno je staviti identifikovane miRNK u odgovarajući kontekst, koji najčešće podrazumeva nalaženje signalnih puteva ili bioloških procesa u kojima su miRNK obogaćene. Ukoliko su izvesne miRNK značajno obogaćene u nekom signalnom putu, to može ukazivati da je taj signalni put značajan za fenotip/patološko stanje koje se ispituje. Uobičajeni način sprovođenja analiza obogaćivanja podrazumeva da se najpre identifikuju/prikupe svi target geni koji su regulisani od strane miRNK, a potom se na osnovu liste gena utvrđuju procesi u koje su uključene miRNK i sprovodi statističko testiranje za utvrđivanje nivoa značajnosti njihovog obogaćenja [12]. Ovaj način predstavlja indirektan vid anotacije miRNK. S druge strane, postoji mogućnost sprovođenja direktnih anotacija miRNK lista koje počivaju na eksperimentalnim podacima direktnih asocijacija miRNK i bioloških procesa u koje su uključene. U Tabeli 3 je dat popis nekoliko alata koji pripadaju ovoj kategoriji.

Alat	Link	Referenca
GeneCodis	https://genecodis.genyo.es/	[63-65]
DIANA-miRPath v.3	https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/mirpathv3/index.php?r=mirpath/	[66]
MIENTURNET	http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/	[67]
miRNet	https://www.mirnet.ca/	[68]
miEAA	https://ccb-compute2.cs.uni-saarland.de/mieaa2/	[69, 70]
MiRSystem	http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/	[71]

Tabela 3. Odabrani alati za funkcionalnu karakterizaciju miRNK

GeneCodis [63-65] je softver razvojen za analizu liste gena, proteina, miRNK, CpG ostrvaca i transkripcionih faktora kod različitih vrsta životinja, biljaka, bakterije *Escherichia coli* i pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Za anotaciju liste gena i/ili miRNK se može koristiti genska ontologija (engl. Gene Ontology – GO) ili Kjoto enciklopedija gena i genoma (engl. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG).

DIANA-miRPath .3 [66] omogućava vršenje analize obogaćenja liste miRNK indirektnim pristupom. Ovaj pristup podrazumeva da se lista miRNK prevodi u ciljne gene koji se mogu predvideti bilo TargetScan, ili DIANA-microT-CDS predikcionim algoritmima ili eksperimentalno validiranim ciljnim genima koji su dostupni iz DIANA-TarBase. Analiza obogaćenja se može vršiti prema KEGG ili GO. Softver nudi mogućnost prikaza obogaćenja u formi mape intenziteta boja (engl. heatmap).

MIENTURNET [67] je alat koji za unos koristi listu gena ili miRNK za koje se radi analiza obogaćivanja. Ovaj program koristi za utvrđivanje interakcija miRNK-irNK podatke iz TargetScan i miRTarBase koja sadrži eksperimentalno validirane podatke. Na osnovu prikupljenih podataka se sprovodi analiza obogaćivanja target gena. Rezultati se mogu prikazati u vidu mreže interakcija miRNK-ciljnih gena.

miRNet [68] je platforma koja pored predviđanja interakcije miRNK i ciljnih gena se koristi i za sprovođenje funkcionalnih analiza obogaćenja. Ovaj softver integriše 14 različitih miRNK baza koje se koriste za funkcionalnu anotaciju (TarBase, miRTarBase, miRecords, miRanda, miR2Disease, HMDD, PhenomiR, SM2miR, PharmacomiR, EpimiR, starBase, TransmiR, ADmiRE, TAM 2.0.). Pored toga ovaj alat

omogućava analizu mreža interakcija između miRNA i gena, miRNA i drugih nekodirajućih RNK (lncRNA, circRNA i dr.)

miEAA [69, 70] je alat koji ima mogućnost vizuelnog prikaza interakcije između miRNA i ciljnih gena uz sprovođenja analize obogaćivanja. Za unos se koristi lista gena ili miRNA. Pretraživanje može da bude jednosmerno ili dvosmerno što zahteva istovremeni unos miRNA i naziva gena.

MiRSystem [71] nudi mogućnost predikcije target gena za miRNA od interesa, a pored toga je moguće uraditi karakterizaciju bioloških procesa i putanja koje su obogaćene genima koje su regulisane od strane miRNA. Stoga ovaj softver predstavlja indirektni alat za funkcionalnu anotaciju. Alat podržava pretrage samo za čoveka i miša. Podaci se prikupljaju iz nekoliko baza radi funkcionalne anotacije i to: KEGG; Biocarta, GO molekularne funkcije, Reactome, Pathway Interaction Database.

Alati za utvrđivanje interakcija miRNA-miRNA, miRNA i drugih nekodirajućih RNK molekula

Regulacija ekspresije gena na postranskripcionom nivou je veoma kompleksna i pored miRNA uključuje i druge klase nekodirajućih RNK, među kojima se u ovom trenutku posebno izdvajaju duge nekodirajuće RNK. Utvrđivanje postojanja interakcije između miRNA i lncRNA i katalogizacija interakcija je važna u sagledavanju kompleksnosti genske regulacije i funkcionalnih posledica tih interakcija u fiziološkim i patološkim stanjima. Od bioinformatičkih alata za utvrđivanje interakcija između miRNA i nekodirajućih RNK molekula se izdvajaju softveri za utvrđivanje interakcija između miRNA i dugih nekodirajućih RNK. Duge nekodirajuće RNK mogu imati ulogu suđera za miRNA na taj način smanjujući efekat koje miRNA imaju na ekspresiju ciljnih gena. U Tabeli 4 su dati podaci za dva odabrana alata kojima se može utvrditi postojanje interakcije između miRNA i nekodirajućih RNK molekula.

Alat / Softver	Link	Referenca
DIANA-lncBase v3	https://diana.e-ce.uth.gr/lncbasev3/	[72]
starBase v.2.0	https://starbase.sysu.edu.cn/	[73]

Tabela 4. Odabrani alati za utvrđivanje interakcija miRNA i nekodirajućih RNK

DIANA-lncBase v3 sadrži podatke o eksperimentalno potvrđenim interakcijama miRNA i nekodirajućih targeta tj. dugih nekodirajućih RNK [72]. Prethodna verzija ovog alata, DIANA-lncBase v2 nije više dostupna na internetu. Pored miRNA-lncRNA interakcija, u bazi se mogu pronaći podaci o ekspresiji lncRNA, pri čemu je pretragu moguće vršiti prema tkivu, ćelijskim linijama, kako kod čoveka tako i miša.

StarBase v2.0 je sveobuhvatna baza u okviru koje se mogu naći informacije o interakciji miRNA sa drugim nekodirajućim RNK molekulima [73]. U okviru baze su dostupni eksperimentalno potvrđeni rezultati o interakciji miRNA i lncRNA.

Alati za asocijaciju miRNA sa humanim bolestima

U prethodnom periodu intenzivnog proučavanja miRNA u oblasti biomedicine višestruko je potvrđena uloga miRNA u razvoju, toku, prognozi i tretmanu različitih humanih bolesti. Takvi podaci su uslovili veliko interesovanje za razvoj alati kojima se mogu detektovati asocijacije miRNA sa patološkim stanjima, prevažodno kompleksnim bolestima, kao što su kancer, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i drugo. U osnovi tih alati se nalaze različiti načini razvoja, tj. algoritmi – kompjuterske metode koji se koriste, npr. mašinsko učenje i slično. Popis odabranih alata za asocijaciju miRNA sa humanim bolestima je dat u Tabeli 5.

Alat / Softver	Link	Referenca
miRCancer	http://mircancer.ecu.edu/	[74]
miRiaD	https://www.miriad-database.org/search/	[75]
miR2Disease	http://www.mir2disease.org/	[76]
OncomiR	http://oncomir.org/	[77]
RWRMTN	https://apps.cytoscape.org/apps/rwrmtn/	[78]
emiRIT	https://research.bioinformatics.udel.edu/emirit/	[79]
HMDD	https://www.cuilab.cn/hmdd/	[80]
CCDB	https://webs.iitd.edu.in/raghava/ccdb/index.php/	[81]
dbDEMC	https://www.biosino.org/dbDEMC/index/	[82]
EpimiRBase	https://www.epimirbase.eu/	[83]
MNDR	http://www.rna-society.org/mndr/	[84-86]

Tabela 5. Odabrani alati za analizu asocijacije miRNA sa humanim bolestima

miRCancer [74] baza podataka je kreirana s ciljem da se putem pretraživanja ključnih reči dođe do podataka o ekspresiji miRNA u određenom tipu kancera. Za pretraživanje baze je dovoljno uneti miRNA od interesa i/ili tip kancera. Ova baza je povezana sa PubMed bazom, što omogućava direktan uvid u publikacije u kojima se pominje asocijacija između miRNA i kancera. Povezanost miRNA sa različitim tipovima kancera se ekstrahuje i pohranjuje u miRCancer bazi podataka. Ovo je posebno pogodno za istraživače miRNA biomarkera u različitim kancerima.

miRiaD (engl. microRNAs in association with disease) [75] je baza koja funkcioniše po istom principu kao prethodno pomenuta, uz razliku što se upotrebom ove baze dobijaju podaci o asocijaciji miRNA sa različitim bolestima.

miR2Disease [76] je baza koja omogućava pretragu povezanosti miRNA sa različitim bolestima. Dodatno, u okviru miR2Disease postoji mogućnost da istraživači podnesu rezultate svojih nalaza ili radove koji se pretraživanjem baze ne pojavljuju.

Za detaljno ispitivanje dereguliranih miRNA u kanceru se može koristiti web alatka OncomiR [77]. Pretraga se može vršiti prema nazivu miRNA u 30 različitih tipova kancera, a podaci koje ovaj softver sadrži su dobijeni iz TCGA baze. Stoga je moguće pretražiti miRNA koje su značajno asociirane sa razvojem, stadijumom, gradusom i ukupnim preživljavanjem pacijenata. Pored identifikacije miRNA koje su važne za različite kancere, ovaj program daje mogućnost tzv. *de novo* analiza na osnovu podataka o ekspresiji miRNA. U okviru programa je moguće raditi i predikciju targeta odgovarajuće miRNA u konkretnom tumorskom tkivu.

RWRMTN [78] je alatka koja omogućava predikciju miRNA asociiranih sa bolestima na osnovu mreža miRNA i ciljnog gena. Ovaj softver zahteva preuzimanje aplikacije sa interneta i njegovu instalaciju. Za instalaciju je neophodna Java i program Cytoscape najmanje verzija 3 ili više.

Prikupljanje informacija o miRNA iz literature je moguće uraditi korišćenjem alata za pretraživanje teksta (engl. text mining) emiRIT [79]. Reč je o softveru koji sadrži podatke o interakciji miRNA i gena, miRNA i kancera, miRNA i bioloških procesa i putanja, kao i miRNA u vanćelijskim lokacijama.

HMDD (engl. Human miRNADisease Database) [80] sadrži eksperimentalno potvrđene miRNA asociirane sa različitim humanim bolestima koje su dostupne u literaturi.

CCDB (engl. Cervical Cancer Database) [81] je baza podataka koja sadrži informacije o eksperimentalno validiranim genima, uključujući miRNA, koje su asocirane sa karcinomom cerviksa.

dbDEM (engl. database of Differentially Expresses MiRNAs in human Cancers) [82] je baza podataka u kojoj se mogu naći sačuvani podaci o diferencijalnoj ekspresiji miRNA u 40 različitih kancera. Podaci su prikupljeni iz javnih repozitorijuma: GEO (engl. Gene Expression Omnibus), TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas) i SRA (engl. Sequence Read Archive). U okviru baze se nalaze i druge vrlo korisne alatke, kao što je ID konvertor koji omogućava da se ranije korišćeni nazivi miRNA daju prema poslednjoj verziji miRBase v22.0. Dodatno, u ovoj bazi je moguće uraditi miRNA meta-profilisanje u kanceru, unošenjem liste miRNA od interesa i tipa kancera, a pretraživanje je moguće u različitim eksperimentalnim dizajnima i kriterijumima, npr. u kanceru *versus* normalnom tkivu, metastazama, dobrom i lošem preživljavanju i dr. Podaci o meta-profilisanju se daju u vidu mape intenziteta obojenosti, tj. heatmap-e.

EpimiRBase [83] je prevashodno posvećena istraživačima koji se bave izučavanjem povezanosti miRNA i epilepsije, te se pretraživanjem ove baze mogu pronaći informacije dostupne iz literature o dereguliranim miRNA potvrđenih kod pacijenata sa epilepsijom, ali baza pokriva i podatke iz glodarskih modela (miš i pacov) za izučavanje epilepsije.

MNDR [84-86] je repozitorijum različitih klasa nekodirajućih RNA (miRNA, lncRNA, circRNA, piRNA, snoRNA) koje su asocirane sa bolestima. Pretraga je jednostavna i vrši se prema nazivu nekodirajuće RNA, životinjskoj ili biljnoj vrsti, eksperimentalnoj validaciji ili kompjuterskoj predikciji, kao i jačini eksperimentalnih dokaza.

Pored navedenih alatki i baza, pretraživanjem literature, revijskih radova i platformi na kojima se nalaze alatke za miRNA analizu, primećeno je da brojni softveri i/ili baze nisu update-ovane duže vreme, čak su neki linkovi i nedostupni. Na primer, baza PhenomiR [87] je nedostupna, dok npr. OncomiRdb baza ne funkcioniše kada se unese miRNA od interesa za pretragu. U okviru ovog rada je vođeno računa da su sve navedene alatke dostupne, posebno u periodu pisanja ovog rada.

ZAKLJUČAK

Iako je u prethodnom periodu dosta toga saznato u oblasti miRNA molekula i njihove regulatorne uloge, uzimajući u obzir kompleksnost regulacije genske ekspresije, može se reći da su naša znanja i dalje donekle ograničena. Zahvaljujući razvoju visoko-propusnih tehnika omogućena je intenzivna akumulacija velike količine podataka o miRNA, a paralelni razvoj bioinformatičkih alata omogućava da se bez poznavanja programiranja prikupljeni podaci mogu analizirati iz različitih istraživačkih perspektiva i interesa. Raznovrsnost dostupnih alata za analizu miRNA je velika i polje njihovog razvoja je veoma dinamično. Dok ranije razvijeni softveri neretko više nisu dostupni ili su nefunkcionalni, može se reći da se svakodnevno publikuju radovi u kojima se predstavljaju novi alati za analizu miRNA ili se stari alati dalje unapređuju. Saradnja između stručnjaka koji oblikuju alate i krajnjih korisnika – istraživača je od velike važnosti za dalji razvoj alata nove generacije. U današnje vreme je gotovo nezamislivo da nove generacije istraživača ne koriste bioinformatičke alate i uopšte *in silico* pristupe u osmišljavanju i realizaciji eksperimenata. Navedene informacije u ovom kratkom pregledu mogu biti polazna osnova i predstavljati pomoć pri izboru bioinformatičkih alata potrebnih za sprovođenje dubljih i detaljnijih analiza miRNA. Pored navedenih odabranih alata u predstavljenih pet kategorija, postoje i brojni drugi alati za analizu miRNA koji ne spadaju ni u jednu od navedenih grupa. Na primer, alati koji omogućavaju pretragu efekta polimorfizama pojedinačnih nukleotida u miRNA

genima na strukturu i funkciju miRNK, interakciju miRNK sa transkripcionim faktorima, povezanost nivoa miRNK sa preživljavanjem pacijenata itd. Prikaz takvih tipova alata je izlazio iz okvira ovog preglednog rada i stoga nisu razmatrani.

Razvoj novih softvera i njihova intenziviranja upotreba se tek očekuje u periodu koji predstoji u istraživanjima miRNK molekula.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora: 451-03-68/2022-14/200178.

NAPOMENA

Svim linkovima koji su navedeni u radu je poslednji put pristupljeno 31.05.2022. godine.

U radu nisu navođeni bioinformatički alati čija internet strana nije bila dostupna, nije funkcionisala ili je bila *under construction* zaključno sa 31.05.2022. godine.

LITERATURA

1. Zeljic K, Supic G, Magic Z. New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. *Molecular genetics and genomics* 2017; 292(3): 511-24.
2. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
3. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology* 2014; 51(4): 759-74.
4. Ni WJ, Leng XM. miRNA-Dependent Activation of mRNA Translation. *MicroRNA* 2016; 5(2): 83-6.
5. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318(5858): 1931-4.
6. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 2009; 19(1): 92-105.
7. Stojkovic G, Jovanovic I, Dimitrijevic M, Jovanovic J, Tomanovic N, Stankovic A, et al. The meta-signature guided investigation of miRNA candidates as potential biomarkers of oral cancer. *Oral diseases* 2022; doi: 10.1111/odi.14185.
8. Supic G, Stefik D, Ivkovic N, Sami A, Zeljic K, Jovic S, et al. Prognostic impact of miR-34b/c DNA methylation, gene expression, and promoter polymorphism in HPV-negative oral squamous cell carcinomas. *Scientific reports* 2022; 12(1): 1296.
9. Supic G, Zeljic K, Rankov AD, Kozomara R, Nikolic A, Radojkovic D, et al. miR-183 and miR-21 expression as biomarkers of progression and survival in tongue carcinoma patients. *Clinical oral investigations* 2018; 22(1): 401-9.
10. Wang H, Peng R, Wang J, Qin Z, Xue L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clinical epigenetics* 2018; 10: 59.
11. Vlachos IS, Hatzigeorgiou AG. Online resources for miRNA analysis. *Clinical biochemistry* 2013; 46(10-11): 879-900.
12. Garcia-Moreno A, Carmona-Saez P. Computational Methods and Software Tools for Functional Analysis of miRNA Data. 2020; 10(9): 1252.
13. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Briefings in bioinformatics* 2019; 20(5): 1836-52.
14. Shaker F, Nikraves A, Arezumand R, Aghaee-Bakhtiari SH. Web-based tools for miRNA studies analysis. *Computers in biology and medicine* 2020; 127: 104060.
15. Lukasik A, Wójcikowski M, Zielenkiewicz P. Tools4miRs - one place to gather all the tools for miRNA analysis. *Bioinformatics* 2016; 32(17): 2722-4.
16. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Knott KE, Wong G. miRToolsGallery: a tag-based and rankable microRNA bioinformatics resources database portal. *Database: the journal of biological databases and curation* 2018; 2018.
17. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* 2006; 34(Database issue): D140-4.
18. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research* 2019; 47(D1): D155-d62.
19. Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS, Olivieri F, Procopio AD. Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic acids research* 2016; 44(1): 24-44.
20. Siddika T, Heinemann IU. Bringing MicroRNAs to Light: Methods for MicroRNA Quantification and Visualization in Live Cells. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2020; 8: 619583.
21. Chae H, Rhee S, Nephew KP, Kim S. BioVLAB-MMIA-NGS: microRNA-mRNA integrated analysis using high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015; 31(2): 265-7.
22. Zhang Y, Xu B, Yang Y, Ban R, Zhang H, Jiang X, et al. CPSS: a computational platform for the analysis of small RNA deep sequencing data. *Bioinformatics* 2012; 28(14): 1925-7.
23. Fasold M, Langenberger D, Binder H, Stadler PF, Hoffmann S. DARIO: a ncRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic acids research* 2011; 39(Web Server issue): W112-7.
24. Aparicio-Puerta E, Lebrón R, Rueda A, Gómez-Martín C, Giannoukakos S, Jaspeš D, et al. sRNAbench and sRNA-

toolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. *Nucleic acids research* 2019; 47(W1): W530-w5.

25. Liu B, Fang L, Chen J, Liu F, Wang X. miRNA-dis: microRNA precursor identification based on distance structure status pairs. *Molecular bioSystems* 2015; 11(4): 1194-204.
26. Tav C, Tempel S, Poligny L, Tahi F. miRNAFold: a web server for fast miRNA precursor prediction in genomes. *Nucleic acids research* 2016; 44(W1): W181-4.
27. Artzi S, Kiezun A, Shomron N. miRNAMiner: a tool for homologous microRNA gene search. *BMC bioinformatics* 2008; 9: 39.
28. Kiezun A, Artzi S, Modai S, Volk N, Isakov O, Shomron N. miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer. *BMC research notes* 2012; 5: 92.
29. Aguiar RR, Ambrosio LA, Sepúlveda-Hermosilla G, Maracaja-Coutinho V, Paschoal AR. miRQuest: integration of tools on a Web server for microRNA research. *Genetics and molecular research* 2016; 15(1), doi: 10.4238/gmr.15016861.
30. Backes C, Meder B, Hart M, Ludwig N, Leidinger P, Vogel B, et al. Prioritizing and selecting likely novel miRNAs from NGS data. *Nucleic acids research* 2016; 44(6): e53.
31. Rahman RU, Gautam A, Bethune J, Sattar A, Fiosins M, Magruder DS, et al. Oasis 2: improved online analysis of small RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 2018; 19(1): 54.
32. Oulas A, Boutla A, Gkirtzou K, Reczko M, Kalantidis K, Poirazi P. Prediction of novel microRNA genes in cancer-associated genomic regions - a combined computational and experimental approach. *Nucleic acids research* 2009; 37(10): 3276-87.
33. Vitsios DM, Enright AJ. Chimira: analysis of small RNA sequencing data and microRNA modifications. *Bioinformatics* 2015; 31(20): 3365-7.
34. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
35. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, et al. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research* 2013; 41(Web Server issue): W169-73.
36. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012; 28(6): 771-6.
37. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research* 2020; 48(D1): D127-d31.
38. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research* 2015; 43(Database issue): D146-52.
39. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild AC, Tsay M, et al. mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic acids research* 2018; 46(D1): D360-d70.
40. Andrés-León E, González Peña D, Gómez-López G, Pisano DG. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets. *Database : the journal of biological databases and curation* 2015; 2015: bav035.
41. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 2015; 4.
42. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature genetics* 2007; 39(10): 1278-84.
43. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; 126(6): 1203-17.
44. Sturm M, Hackenberg M, Langenberger D, Frishman D. TargetSpy: a supervised machine learning approach for microRNA target prediction. *BMC bioinformatics* 2010; 11: 292.
45. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 2004; 10(10): 1507-17.
46. Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic acids research* 2006; 34(Web Server issue): W451-4.
47. Gerlach W, Giegerich R. GUUGle: a utility for fast exact matching under RNA complementary rules including G-U base pairing. *Bioinformatics* 2006; 22(6): 762-4.

48. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics* 2005; 37(5): 495-500.
49. Mann M, Wright PR, Backofen R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic acids research* 2017; 45(W1): W435-w9.
50. Wright PR, Georg J, Mann M, Sorescu DA, Richter AS, Lott S, et al. CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic acids research* 2014; 42(Web Server issue): W119-23.
51. Quillet A, Saad C, Ferry G, Anouar Y, Vergne N, Lecroq T, et al. Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation. *Frontiers in genetics* 2019; 10: 1330.
52. Vejnar CE, Zdobnov EM. MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength. *Nucleic acids research* 2012; 40(22): 11673-83.
53. Rennie W, Liu C, Carmack CS, Wolenc A, Kanoria S, Lu J, et al. STarMir: a web server for prediction of microRNA binding sites. *Nucleic acids research* 2014; 42(Web Server issue): W114-8.
54. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* 2007; 13(11): 1894-910.
55. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS one* 2018; 13(10): e0206239.
56. Dweep H, Gretz N, Sticht C. miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in molecular biology* 2014; 1182: 289-305.
57. Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, et al. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic acids research* 2011; 39(Database issue): D163-9.
58. Huang HY, Lin YC, Li J, Huang KY, Shrestha S, Hong HC, et al. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic acids research* 2020; 48(D1): D148-d54.
59. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic acids research* 2018; 46(D1): D239-d45.
60. Gaidatzis D, van Nimwegen E, Hausser J, Zavolan M. Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC bioinformatics* 2007; 8: 69.
61. Coronello C, Benos PV. ComiR: Combinatorial microRNA target prediction tool. *Nucleic acids research* 2013; 41(Web Server issue): W159-64.
62. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic acids research* 2009; 37(Database issue): D105-10.
63. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology* 2007; 8(1): R3.
64. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, et al. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic acids research* 2009; 37(Web Server issue): W317-22.
65. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research* 2012; 40(Web Server issue): W478-83.
66. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research* 2015; 43(W1): W460-6.
67. Licursi V, Conte F. MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis 2019; 20(1): 545.
68. Chang L, Zhou G, Soufan O, Xia J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic acids research* 2020; 48(W1): W244-w51.
69. Kern F, Fehlmann T, Solomon J, Schwed L, Grammes N, Backes C, et al. miEAA 2.0: integrating multi-species microRNA enrichment analysis and workflow management systems. *Nucleic acids research* 2020; 48(W1): W521-w8.
70. Backes C, Khaleeq QT, Meese E, Keller A. miEAA: microRNA enrichment analysis and annotation. *Nucleic acids research* 2016; 44(W1): W110-6.
71. Lu TP, Lee CY, Tsai MH, Chiu YC, Hsiao CK, Lai LC, et al. miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PLoS one* 2012; 7(8): e42390.

72. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Tastsoglou S, Skoufos G, Karavangeli A, Pierros V, et al. DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic acids research* 2020; 48(D1): D101-d10.
73. Li JH, Liu S, Zhou H, Qu LH, Yang JH. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic acids research* 2014; 42(Database issue): D92-7.
74. Xie B, Ding Q, Han H, Wu D. miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. *Bioinformatics* 2013; 29(5): 638-44.
75. Gupta S, Ross KE, Tudor CO, Wu CH, Schmidt CJ, Vijay-Shanker K. miRiaD: A Text Mining Tool for Detecting Associations of microRNAs with Diseases. *Journal of biomedical semantics* 2016; 7(1): 9.
76. Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, et al. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic acids research* 2009; 37(Database issue): D98-104.
77. Wong NW, Chen Y, Chen S, Wang X. OncomiR: an online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation. *Bioinformatics* 2018; 34(4): 713-5.
78. Le DH, Tran TTH. RWRMTN: a tool for predicting disease-associated microRNAs based on a microRNA-target gene network. *BMC bioinformatics* 2020; 21(1): 244.
79. Roychowdhury D, Gupta S. emiRIT: a text-mining-based resource for microRNA information. 2021; 2021: baab031.
80. Huang Z, Shi J, Gao Y, Cui C, Zhang S, Li J, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic acids research* 2019; 47(D1): D1013-d7.
81. Agarwal SM, Raghav D, Singh H, Raghava GP. CCDB: a curated database of genes involved in cervix cancer. *Nucleic acids research* 2011; 39(Database issue): D975-9.
82. Yang Z, Wu L, Wang A, Tang W, Zhao Y, Zhao H, et al. dbDEMC 2.0: updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers. *Nucleic acids research* 2017; 45(D1): D812-d8.
83. Mooney C, Becker BA, Raoof R, Henshall DC. EpimiRBase: a comprehensive database of microRNA-epilepsy associations. *Bioinformatics* 2016; 32(9): 1436-8.
84. Ning L, Cui T, Zheng B, Wang N, Luo J, Yang B, et al. MNDR v3.0: mammal ncRNA-disease repository with increased coverage and annotation. *Nucleic acids research* 2021; 49(D1): D160-d4.
85. Wang Y, Chen L, Chen B, Li X, Kang J, Fan K, et al. Mammalian ncRNA-disease repository: a global view of ncRNA-mediated disease network. *Cell death & disease* 2013; 4(8): e765.
86. Cui T, Zhang L, Huang Y, Yi Y, Tan P, Zhao Y, et al. MNDR v2.0: an updated resource of ncRNA-disease associations in mammals. *Nucleic acids research* 2018; 46(D1): D371-d4.
87. Ruepp A, Kowarsch A, Schmidl D, Buggenthin F, Brauner B, Dunger I, et al. PhenomiR: a knowledgebase for microRNA expression in diseases and biological processes. *Genome biology* 2010; 11(1): R6.

Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma

Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju,

Centar za forenzičku i primenjenu molekularnu genetiku

Kontakt: miljana@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Kako se Y hromozom kroz generacije ne menja rekombinacijama, prenosi se uglavnom nepromenjen sa oca na sina. Haplotipovi dobijeni kombinovanom analizom kratkih tandemskih ponovaka na Y hromozomu imaju široku primenu u forenzičkim analizama za definisanje paternalne linije muškog donora biološkog traga, posebno u slučajevima gde standardna analiza autozomnih markera nije dovoljno informativna. Y vezani haplotipovi se koriste i u evolucionim i genealoškim studijama, ali se za rekonstrukciju filogenije Y hromozoma koristi analiza polimorfizama pojedinačnih nukleotida. Promene na Y hromozomu se ipak dešavaju usled mutacija što može da dovede do diferencijacije Y vezanih haplotipova između oca i sinova. Tako mutacije u lokusima sa kratkim tandemskim ponovcima mogu da omoguće identifikaciju muškarca u okviru jedne paternalne linije, ali mogu i da dovedu do progrešnog isključenja biološkog srodstva. Usled toga je za tačnu interpretaciju genetičkih profila neophodna precizna procena stope mutacije pojedinačnih lokusa, za šta se koriste studije parova otac-sin ili velikih porodični stabala.

Ključne reči: Y hromozom; poreklo; stopa mutacije; forenzičke analize DNK

Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome

Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević

University of Belgrade – Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Forensic and Applied Molecular Genetics

Correspondence: miljana@bio.bg.ac.rs

Abstract

Y chromosome is transmitted mostly unchanged from father to son due to the absence of recombination events. Haplotypes composed of Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms are widely used to define paternal line of unknown male perpetrator in forensic analysis, especially when standard analysis of autosomal markers is not informative enough. Y-chromosomal haplotypes are also used in evolutionary and genealogical studies, but single nucleotide polymorphisms are more suitable for the reconstruction of the Y chromosome phylogeny. However, Y chromosome changes due to mutations, which could lead to differentiation of Y haplotypes between father and sons. Thus, mutations in short tandem repeats loci can enable the identification of a man within a single paternal line, but they could also lead to an erroneous exclusion of biological paternity. Reliable mutation rates, for the proper use and accurate interpretation of genetic profiles, could be estimated from multi-generation pedigrees or father-son pairs.

Keywords: Y chromosome; ancestry; mutation rates; forensic DNA analysis

Svaki čovek, bez obzira na pol, u nukleusima svojih somatskih ćelija ima 22 para autozomnih hromozoma. Hromozomi jednog para su homologni, od kojih jedan potiče od oca, a drugi od majke. Između homolognih hromozoma dolazi do razmene genetičkog materijala tokom mejoze, čime se obezbeđuje genetički diverzitet. Dvadeset treći par hromozoma u nukleusima somatskih ćelija čini par polnih hromozoma, koji mogu biti homologni (X i X) kod žena ili nehomologni (X i Y) kod muškaraca [1]. Kako Y hromozom nema svog homolognog para praktično se nepromenjen prenosi sa oca na sina, te su informacije koje nosi isključivo potpis paternalne linije.

Struktura Y hromozoma i obrazac nasleđivanja

Y hromozom čoveka dugačak je 60 miliona baznih parova (bp) i jedan je od najmanjih hromozoma humanog genoma. Terminalni regioni njegovog dugog i kratkog kraka, označeni kao pseudoautozomni regioni (eng. *Pseudoautosomal Regions*, **PAR**), čine oko 5% sekvence Y hromozoma. Pseudoautozomni regioni sadrže 10 - 12 gena od kojih svi imaju pandane na X hromozomu. Usled toga, ovi regioni na hromozomima X i Y mogu da se rekombinuju tokom mejoze, slično kao homologni autozomni hromozomi [2, 3]. Pseudoautozomni regioni ograničavaju nerekombinujući region Y hromozoma (eng. *Non-recombining Portion of the Y Chromosome*, **NR**) koji čini oko 95% njegove sekvence. Ovaj region predstavlja "nerekombinujuću pustinju" jer ne podleže rekombinaciji tokom mejoze usled odsustva homologije sa X hromozomom. Međutim, kako je ustanovljeno da između sekvenci NRY može doći do nerekipročne rekombinacije (genska konverzija između ponovljenih sekvenci istog hromozoma), ovaj region se označava kao region specifičan za muškarce (eng. *Male-Specific Y Region*, **MSY**) [4].

U okviru MSY razlikuju se euhromatinski i heterohromatinski regioni. Više od polovine heterohromatina čine različite ponovljene sekvence bez kodirajuće funkcije, čije delecije nemaju nikakav vidljiv fenotipski efekat [1]. Sa sekvenci iz euhromatinskog regiona MSY prepisuje se 156 transkripcionih jedinica, od kojih bar polovina kodira proteine. Od ukupnog broja od 78 protein - kodirajućih jedinica, oko 60 se može svrstati u neku od 9 genskih familija specifičnih za MSY, čiji članovi poseduju preko 98% identičnu sekvencu. Preostalih 18 gena prisutno je u jednoj kopiji, te se može reći da MSY kodira 27 različitih proteina ili familija proteina [4]. Katalog sekvenci euhromatina obuhvata tri klase: sekvence transponovane sa X hromozoma, X - degenerisane sekvence, i klasu amplikona, sastavljenu uglavnom od sekvenci koje pokazuju čak 99,9% identičnosti sa drugim sekvencama u MSY, a koje se održavaju čestim Y - Y genskim konverzijama. Amplikoni i palindromske sekvence čine Y hromozom podložnim samorekombinaciji tokom spermatogeneze što za posledicu ima intrahromozomske delecije. Takve delecije uzrok su varijacija u broju kopija gena Y hromozoma, a mogu uzrokovati i neplodnost muškarca [5].

Y hromozom je haploidan i prenosi se isključivo po muškoj liniji iz generacije u generaciju praktično nepromenjen, usled odsustva homologne rekombinacije. Jedini faktor koji uzrokuje varijacije između generacija su (retke) mutacije. Tako Y hromozom nosi zapis svih mutacionih događaja oslikavajući istoriju paternalne linije [6]. Navedeno čini analizu Y hromozoma nezaobilaznim alatom kada su u pitanju rekonstrukcije puteva migracije muškaraca u prošlosti, analiza drevne DNK, genetička genealogija, slučajevi spornog očinstva gde se koristi kao pomoćna alatka, utvrđivanje srodstva u masovnim nesrećama, i naravno, forenzičke DNK analize [7].

AMEL lokus i pol

Od posebnog značaja za forenzičke analize DNK bilo je otkriće amelogenin genskog markera (*AMEL*) za utvrđivanje pola. Amelogenin genski lokus podrazumeva dva homologna gena prisutna na X i Y hromo-

zomima: *AMELY* kodira protein uključen u demineralizaciju zubne gledi i ima paralog na X hromozomu (*AMELX*). Prvi intron *AMELX* je šest bp kraći, te je dizajniran poseban set prajmera za umnožavanje *AMEL* lokusa u ovom regionu oba hromozoma, dajući amplikone od 106 bp i 112 bp sa X i Y hromozoma, redom [8]. Prajmeri za umnožavanje *AMEL* standardni su deo svakog kompleta hemikalija koji se koristi za utvrđivanje DNK profila analizom autozomnih lokusa, s obzirom da može da pruži informaciju o polu donora biološkog traga. Međutim, kako retka delecija gena za amelogenin na Y hromozomu dovodi do odsustva amplikona Y hromozoma [9], danas je uglavnom još jedan lokus sa Y hromozoma deo standardnog kompleta za DNK tipizaciju, kako se, u slučaju odsustva amplikona od 112 bp, ne bi izveo pogrešan zaključak da se radi o ženskom donoru biološkog traga [10].

Polimorfizmi Y hromozoma

Potraga za polimorfizmima specifičnim za Y hromozom bila je usmerena prvobitno na polimorfizme u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLPs). Detektovana su samo dva Y RFLP [11], a daljim analizama je pokazano da Y hromozom ima mali broj ovakvih polimorfizama u poređenju sa drugim hromozomima [12]. Zahvaljući napretku tehnologije i razvoju novih metoda, otkriveni su novi polimorfizmi Y hromozoma. Danas se u analizi Y hromozoma koriste dva tipa polimorfizama u okviru MSY: sporomutirajući polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) i brže mutirajući kratki tandemske ponovci (eng. *Short Tandem Repeats*, STRs). Kako se Y-STR i Y-SNP odlikuju različitim stopama mutacije koriste se i za izučavanje evolucionih događaja na različitim vremenskim skalama [13]. Poseban napredak u otkriću novih polimorfizama Y hromozoma donelo je masivno paralelno sekveniranje (eng. *Massive Parallel Sequencing*, MPS). Takođe, lako dostupni servisi koji vrše sekvenciranje Y hromozoma MPS-om na lični zahtev, značajno su proširili baze podataka i pružili nove informacije o Y-SNP i Y-STR lokusima [14].

Detekcija Y-SNP-ova uglavnom se obavlja metodom minisekvenciranja koja podrazumeva elongaciju specifičnog prajmera za jedan nukleotid, upravo na mestu gde se nalazi SNP od interesa. Poseban vid ove reakcije koji je široko u upotrebi, *SNaPshot* (*ThermoFisher Scientific*, SAD), podrazumeva korišćenje obeleženih dideoksi nukleotida i detekciju alela na osnovu emitovane fluorescencije, dok se analiza dobijenih fragmenata vrši kapilarnom elektroforezom [6].

Detekcija alela za svaki Y-STR lokus vrši se određivanjem dužine fragmenata dobijenih lančanom reakcijom polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) kapilarnom elektroforezom. Danas su dostupni kompleti hemikalija kojima je moguće istovremeno umnožiti veći broj Y-STR lokusa u jednoj reakciji. Takođe, nova tehnologija sekvenciranja, osim otkrića novih polimorfizama, našla je primenu i u analizi Y hromozoma. Primenom MPS-a moguće je dobiti podatke o dužini fragmenata kao i standardno kapilarnom elektroforezom, ali je pored toga moguće utvrditi promene sekvence samih ponovaka i okolnih regiona. MPS je veoma privlačna metoda s obzirom da pruža više informacija i omogućava rezoluciju alela koji se kapilarnom elektroforezom detektuju kao aleli iste dužine. Uprkos tome, kapilarna elektroforeza je i dalje zlatni standard kada je u pitanju detekcija minimalne količine muške komponenete u muško-ženskim mešavinama jer MPS za sada zahteva veće količine DNK materijala za analizu [15].

Y hromozom u forenzici i tumačenju prošlosti

Ključni zahtev forenzičkih analiza DNK je da se dobije visokodiskriminativan DNK profil koji je pogodan za identifikaciju osobe. Analiza autozomnih STR lokusa je sama po sebi dovoljna za identifikaciju, jer je DNK

profil svake osobe jedinstven. Nasuprot tome, analizom Y vezanih STR lokusa, posebno onih koji se odlikuju relativno niskom stopom mutacija ($\sim 10^{-3}$ po markeru po generaciji) [16, 17] dobija se haplotip koji definiše samo paternalnu liniju, ali nema moć identifikacije osobe. Stoga je Y hromozom u forenzičkim istragama dugo bio ignorisan. Naime, ukoliko se Y haplotip osumnjičene osobe poklopi sa Y haplotipom traga, ne može se reći da je ta osoba donor biološkog materijala. Kako svi njegovi srodnici po muškoj liniji imaju isti Y haplotip, ni oni se ne mogu isključiti kao potencijalni donori. S druge strane, nepodudaranje Y haplotipova biološkog traga i osumnjičene osobe omogućava da se osoba isključi kao donor biološkog traga. I u slučajevima utvrđivanja spornog očinstva mora se uzeti u obzir da rezultat zasnovan isključivo na Y-STR haplotipovima ne isključuje kao mogućeg oca nijednog muškog srodnika u istoj paternalnoj liniji. Međutim, značaj analize Y-STR lokusa kod utvrđivanja spornog očinstva, odnosi se pre svega na situacije kada potencijalni otac nije dostupan za analizu, ali jesu njegovi srodnici po muškoj liniji. Kao i u krivičnim istragama, nepodudaranje Y haplotipova podrazumeva isključenje očinstva, dok uslovno istovetni Y haplotipovi mogu da ukažu da je reč o istoj muškoj liniji i da upotpune informaciju dobijenu analizom autozomnih STR lokusa ukoliko postoji.

Binarne markere, poput SNP, karakteriše niska stopa mutacija (reda veličine 10^{-8} po bazi po generaciji) [18], zbog čega se obično smatraju jedinstvenim događajima u evoluciji čoveka. Za razliku od tačkastih polimorfizama u drugim delovima genoma, Y-SNP se akumuliraju u MSY značajno brže, što može da se objasni velikim brojem ćelijskih deoba prilikom spermatogeneze i odsustvom rekombinacije u ovom regionu. U Projektu 1000 genoma sekvencirano je 1244 humanih Y hromozoma i ustanovljeno preko 65000 SNP-ova [19]. Osim otkrića novih polimorfizama Y hromozoma, Projekat 1000 genoma pružio je i preciznije procene mutacionih stopa za Y-SNP lokuse. Zavisno od primenjenog pristupa, one se kreću u rasponu od $8,71 \times 10^{-10}$ [20] do $7,6 \times 10^{-10}$ [21] po bazi po generaciji. Zahvaljujući niskoj stopi mutacije, kombinacije Y-SNP markera definišu linije porekla – *haplogrupe*. Muškarci koji imaju istu kombinaciju SNP-ova na Y hromozomu pripadaju istoj *haplogrupi*. Haplogrupe se koriste za konstruisanje filogenetskog stabla Y hromozoma i tumačenje prošlosti ljudi. Precizna procena mutacionih stopa Y-SNP-ova potrebna je za finu kalibraciju Y filogenetskog stabla i određivanje starosti poslednjeg zajedničkog pretka u okviru svake haplogrupe [22].

Arhitektura filogenetskog stabla Y hromozoma obuhvata 20 osnovnih *haplogrupa* ili grana, koje se označavaju slovima od A-T. Duboke grane filogenetskog stabla definišu Y SNP-ovi koji su nastali toliko davno da su zajednički za Y hromosome velikog broja muškaraca. U okviru svake grane vremenom su se javljali novi SNP-ovi koji su doveli do daljeg grananja, definišući nove, mlađe grane, koje su rasprostranjene samo u određenim geografskim regionima. Neki SNP-ovi su nastali toliko skoro da su prisutni samo u nekim porodicama ili čak samo kod određene osobe (privatne mutacije), određujući tako potencijalno najmlađe grane Y filogenetskog stabla. Određivanje geografskog regiona odakle potiču preci neke osobe, tj. njegovog biogeografskog porekla, od značaja je u forenzičkim analizama jer mogu da pruže istražne smernice ka pronalaženju nepoznatog počinioca [23, 24].

Y-SNP haplogrupe i njihova globalna distribucija

Populacione studije su pokazale filogeografsku struktuiranost Y hromozoma, odnosno omogućile su praćenje biogeografske rasprostranjenosti njegovih pojedinih grana [25]. Tačnije, analiza rasprostranjenosti osnovnih i mlađih grana, koje su se formirale tokom istorije i migracija ljudi, pokazala je da su pojedinci koji žive na istom kontinentu sličniji među sobom u poređenju sa onima nastanjenim na drugim kontinentima. Ustanovljeno je, na primer, da su najdublje grane filogenetskog stabla Y hromozoma, haplogrupe A i B, ograničene na Afriku [26, 27]. Haplogrupa B je naročito zastupljena u Etiopiji i Sudanu [27]. Grane haplogrupe

C i D zastupljene su u različitim delovima Azije [28-31]. Haplogrupa E je veoma razgranata, sa granama E1 i E2 prisutnim u Severoistočnoj Africi i granom E3 koja pokazuju široku geografsku rasprostranjenost. Naime, grana E3a je zastupljena u Africi i među afro-amerikancima, dok je E3b zastupljena u Severnoj Africi, Zapadnoj Evropi i na Bliskom istoku [27, 32]. Haplogrupa I je ekskluzivno evropska. Smatra se da je nastala na tlu Evrope, sa granom I1 koja je naročito zastupljena na severu Evrope i granom I2 koja je zastupljena sa visokom učestalošću na teritorijama koje naseljavaju slovenski narodi [33]. Takođe, haplogrupa R je sa svoje dve osnovne grane, R1a i R1b, posebno zastupljena na teritoriji Evrope. Procenjuje se da preko 100 miliona zapadnih Evropljana pripada R1b grani [34], dok je R1a prisutna u istočnoj Evropi među slovenskim narodima, ali i u Aziji [35].

Y-STR haplotipovi

Drugi tip polimorfizama koji se koristi u analizi Y hromozoma su Y-STR-ovi, zastupljeni u manjem broju u poređenju sa Y-SNP-ovima. Sekvenciranjem čitavog Y hromozoma primenom MPS utvrđeno je da katalog sekvenci Y hromozoma sadrži oko 4500 Y-STR-ova [36]. Kombinovanom analizom Y-STR lokusa dobija se Y vezani *haplotip* koji definiše određenu paternalnu liniju i ima široku primenu u forenzici, složenim slučajevima spornog očinstva i utvrđivanju srodstva. Svi haplotipovi koji imaju iste Y-SNP-ove pripadaju istoj *haplogrupi*. Kako se svaka mutacija u okviru Y-STR lokusa dešava na nekom Y hromozomu sa određenom Y-SNP haplogrupom, varijacije Y-STR alela su duboko podeljene po haplogrupama [37], zbog čega se Y-STR haplotipovi mogu koristiti sa različitom preciznošću za predviđanje Y haplogrupa i u odsustvu Y-SNP genotipova [38-40]. S druge strane, varijacije Y-STR alela u okviru haplogrupe mogu da pruže informaciju o starosti haplogrupe, s obzirom da će se starije haplogrupe odlikovati većim diverziteom Y-STR haplotipova [14].

Primenu u forenzici Y-STR lokusi našli su odmah nakon što je okarakterisan prvi Y-STR, *DYS19* [41, 42], a vremenom su pažljivo selektovani novi iz skupa sekvenci kandidata iz MSY regiona i dodavani komercijalno dostupnim kompletima hemikalija za utvrđivanje Y haplotipova. Prvi slučaj u kome je korišćena analiza Y-STR lokusa podrazumevao je uzorak vaginalnog brisa silovane i ubijene žene koji je metodom diferencijalne ekstrakcije [43] razdvojen na frakcije spermatozoidnih i nespermatozoidnih (epitelnih) ćelija. U frakciji nespermatozoidnih ćelija nije bilo moguće umnožiti analizirani Y-STR lokus PCR-om, dok je analiza istog lokusa u spermatozoidnoj frakciji vaginalnog brisa dala rezultat. Dobijeni alel razlikovao se od alela dobijenog analizom nespornog uzorka osumnjičene osobe, te je prva primena analize Y-STR lokusa podrazumevala isključenje osumnjičene osobe kao potencijalnog donora biološkog traga. Takođe, tom prilikom je pokazano da je moguće detektovati samo DNK poreklom od muške osobe u nebalansiranoj muško-ženskoj mešavini, kada je praktično nemoguće identifikovati muškog doprinosioca analizom autozomnih STR lokusa. Nedvosmislena detekcija muške komponente u tragovima u kojima se očekuju muško-ženske mešavine sa predominantnim sadržajem biološkog materijala poreklom od ženske osobe i minimalnom količinom materijala poreklom od muške osobe, poput uzoraka iz seksualnih napada ili podnokatnog sadržaja, i dalje je glavno polje primene Y-STR haplotipizacije. Tako je studija na uzorku od preko 2000 bioloških tragova iz skoro 300 slučajeva seksualnih napada pokazala da bi jedna desetina ostala nerešena da pored standardnog utvrđivanja DNK profila analizom autozomnih STR lokusa, nije primenjena i analiza Y vezanih haplotipova [44].

Forenzička zajednica je 1997. godine definisala minimalni set Y-STR markera koji obuhvata devet lokusa [45]. Kako bi se postigla bolja rezolucija paternalne linije povećan je broj Y-STR markera u kompletima hemikalija, te su tako danas dostupni i oni sa 27 Y-STR markera. Povećanje broja Y-STR markera ima tehnička ograničenja jer se ne mogu neograničeno dodavati markeri kompletima koji se analiziraju kapilanom elek-

torforezom, što je metoda izbora u rutinskom radu u forenzici [46]. Međutim, bolja rezolucija paternalne linije može se postići i upotrebom markera koji se odlikuju višom stopom mutacije. Tako, osim većeg broja markera, komercijalni kompleti koji su danas u upotrebi imaju i nekoliko markera koji se odlikuju višom stopom mutacije. Stopa mutacije Y-STR lokusa odnosi se na promenu broja ponovaka, posebno ponovaka u neprekinutim nizovima, u kojima veći broj ponovaka dovodi do češćeg proklizavanja DNK polimeraze tokom replikacije [47, 48]. Lokusi koji se odlikuju višom stopom mutacija pogodniji su za identifikaciju paternalne linije donora biološkog traga i diferencijaciju srodnika iste paternalne linije dok su lokusi koji se odlikuju niskom ili umerenom stopom mutacija pogodniji za asocijaciju muškarca sa paternalnom linijom pri utvrđivanju očinstva/srodstva [49].

Značaj utvrđivanja stopa mutacija Y-STR lokusa

Konvencionalno korišćeni kompleti hemikalija za utvrđivanje Y haplotipova imaju dva ograničenja zbog relativno niske stope mutacija korišćenih Y-STR lokusa: nemogućnost rezolucije paternalne linije u situacijama kada se utvrde identični haplotipovi kod nesrodnih muškaraca kao posledica povratnih mutacija ("slučajno identični haplotipovi") i nemogućnost da se napravi razlika među haplotipovima srodnika iz iste paternalne linije ("haplotipovi identični po poreklu"). [50]. Napredak u diferencijaciji paternalnih linija postignut je identifikacijom 13 brzo mutirajućih (eng. *Rapidly Mutating*, RM) Y-STR markera [50]. Ovi markeri odlikuju se stopom mutacija većom od 10^{-2} po markeru po mezozi [48, 50], a njihov značaj u diferencijaciji muških srodnika, ali i nesrodnih muškaraca čiji su "haplotipovi slučajno identični", pokazan je u brojnim studijama koje su usledile [7, 51–56]. Nekoliko od 13 prvobitno opisanih RM markera postao je deo komercijalnih kitova [57, 58], međutim njihov relativno mali broj u komercijalnim kitovima predstavlja ograničenje za diferencijaciju bliskih srodnika po muškoj liniji. Kako je upotrebom 13 RM Y-STR markera utvrđena stopa diskriminacije muških srodnika, udaljenih jednu do četiri mezoze, koja je iznosila od 20% do 60% [51, 56, 60], pažnja je usmerena ka selekciji novih kako bi se mogućnost diskriminacije povećala. Identifikovano je potom 12 dodatnih brzo mutirajućih Y-STR markera, a kombinacijom opisanih 25 RM Y-STR-ova kapacitet diskriminacije srodnika iste paternalne linije udaljenih do četiri mezoze povećan je na 90% [61]. Nedavno je razvijen i validiran RMplex komplet kojim je omogućena analiza 30 RM Y-STR-ova [62].

S druge strane, ono što je nedostatak Y-STR lokusa kod identifikacije, predstavlja prednost kada je u pitanju utvrđivanje očinstva/srodstva i identifikacija žrtava masovnih nesreća [46]. U ovom slučaju prednost imaju Y-STR lokusi koji se odlikuju niskom ili umerenom stopom mutacija. Međutim, kako je povećan broj lokusa koji su deo standardnih kompleta povećana je i mogućnost da se dobiju haplotipovi koji će se razlikovati na određenim lokusima [46]. Kada se Y haplotipovi potencijalnog oca i sina (ili pripadnika iste paternalne linije kod uvrđivanja srodstva) razlikuju na nekom od analiziranih lokusa, postavlja se pitanje da li je ta razlika posledica mutacija ili se zapravo ne radi o ocu i sinu. Ranije je predloženo pravilo da se isključivanje očinstva vrši ukoliko se haplotipovi razlikuju na minimum 3 Y-STR lokusa. Međutim, ovakav model morao je da pretrpi promenu nakon rezultata više studija. Tako je u studiji u kojoj je korišćen komplet za analizu 17 Y-STR lokusa na 1730 parova otac-sin zabeleženo da je jedan par imao mutaciju na 3, dok su dva para imala mutaciju na 2 od 17 lokusa [16]. Analizom dodatnih 169 lokusa kod istih parova, 123 parova otac-sin je imalo mutacije na 3 lokusa, 42 para na 4 lokusa, a po 3 para na čak 5, 6, 7 ili 8 lokusa [17]. Ovakvi rezultati pokazuju da korišćenje fleksibilnog modela za isključenje očinstva ima više smisla. Takav model podrazumeva da se uzme u obzir ukupan broj lokusa koji se analiziraju, njihove stope mutacija, kao i razlike u broju ponovaka na alelima koji se ne podudaraju s obzirom da većina mutacija STR lokusa podrazumeva promenu u jednom ponovku [46].

Za ispravnu i tačnu interpretaciju dobijenih profila neophodne su pouzdane procene stopa mutacija [63]. Poznavanje mutacionih stopa potrebno je i za procenu vremenske udaljenosti do najskorijeg zajedničkog pretka u genealoškim studijama. Za procenu stopa mutacija koriste se različiti pristupi. Jedan pristup podrazumeva utvrđivanje broja mutacija u parovima otac-sin [16, 17, 64, 65]. Kako bi se postigla što preciznija procena, potrebno je analizirati veliki broj parova otac-sin. Drugi pristup podrazumeva analizu velikih porodičnih stabala koje omogućavaju utvrđivanje stopa mutacija Y-STR lokusa korišćenjem ograničenog seta uzoraka koji su razdvojeni velikim brojem mejoza [7, 56, 66]. Međutim, oba pristupa imaju svoja ograničenja. Analiza parova otac/sin ne uzima u obzir mogući uticaj različitih faktora na vremenskoj skali na stope mutacije, dok se za velika i duboka porodična stabla ancestralni haplotip rekonstruiše na osnovu haplotipova savremenika dostupnih za analizu, te su moguće greške u proceni mutacionih stopa zbog postojanja skrivenih mutacija u oba smera (povećanje i smanjenje broja ponovaka) i paralelnih mutacija u različitim granama stabla, koje nije moguće detektovati [60]. Stoga, posebno za RM Y-STR, direktno praćenje transmisija kod dovoljno velikog broja parova otac-sin, predstavlja bolji pristup za utvrđivanje stopa mutacija. Štaviše, samo ovaj pristup omogućava da se nedvosmisleno odredi za koliko se povećao odnosno smanjio broj ponovaka, kao i da se okarakterise smer mutacija (smanjenje ili povećanje broja ponovaka) [61].

Poklapanje Y-STR haplotipova – značaj velike baze podataka

U istrazi jednog krivičnog dela utvrđeno je da se Y haplotip biološkog traga poklapa sa Y haplotipom osumnjičene osobe na 23 Y-STR lokusa [67]. Kako su i sedmorica njegovih bliskih rođaka po muškoj liniji imali identične haplotipove, kombinacijom dostupnih kompleta hemikalija i 13 RM Y-STR utvrđeni su haplotipovi na 47 Y-STR markera, ali ponovo i njihovo međusobno poklapanje [67]. Međutim, na osnovu učestalosti haplotipa u populaciji i primenom odgovarajućeg matematičkog modelovanja [68] utvrđeno je da je šansa da se slučajnim mutacijama generišu identični haplotipovi tako visoke rezolucije van šire porodice veoma mala [67]. Tome u prilog dalje govore i rezultati studije u kojoj je analizirano 128 potomaka jednog muškarca, u kojoj je pokazano da 12 savremenika, razdvojenih od 9 do 18 mejoza, ima identičan haplotip na 36 Y-STR markera [56]. S druge strane, pripadnici iste muške linije mogu se razlikovati na čak 18 od ukupno 36 analiziranih Y-STR markera, uključujući i 13 RM [56], što sve treba uzeti u obzir prilikom forenzičkih istraga i utvrđivanja srodstva.

Kako bi se ispravno tumačili rezultati i procenila težina dokaza u slučajevima kada se utvrdi poklapanje Y haplotipova pri ispitivanju srodstva ili Y haplotipa osumnjičene osobe sa Y haplotipom biološkog traga, potrebno je poznavanje učestalosti Y haplotipova u opštoj populaciji. Saradnjom preko trideset forenzičkih i antropoloških institucija iz Evrope, iniciranom naučnicima sa Univerziteta Šarite (Charité University) iz Berlina, napravljena je kolekcija od preko 5000 minimalnih haplotipova. Na taj način je 2000. godine formirana, sada najveća, baza podataka koja sadrži Y-STR haplotipe anonimnih osoba iz svih delova sveta (*Y chromosome haplotype reference database*, YHRD) [69]. Višegodišnjim dopunjavanjem i proširivanjem podataka, pre svega kada je u pitanju broj Y-STR lokusa koji su deo haplotipa, poslednji put je dopunjena u februaru 2022. godine, što je bilo njeno 67. izdanje. (www.yhrd.org).

Biogeografsko poreklo mnogo bolje oslikavaju Y-SNP markeri u poređenju sa Y-STR markerima zbog niže stope mutacija. Međutim, sa porastom broja haplotipova u YHRD, postajala je jasno uočljiva biogeografska struktuiranost i Y-STR haplotipova širom sveta [68]. Skup Y-STR profila rasprostranjenih na nekoj teritoriji, a koji su deo jedne ili nekoliko zajedničkih linija porekla čiji su nosioci tu teritoriju nastanili u dalekoj prošlosti, označava se kao "metapopulacija" [70, 71]. Metapopulacije su vremenom stabilizovane kultur-

ološkim i sociološkim faktorima uključujući zajednički jezik [72, 73], patrilokalnošću društvenih zajednica [74] i/ili geografskim barijerama [75]. Kako bi bolje oslikavala Y-specifične strukture metapopulacija, reorganizovana je i YHRD baza, te je danas pretragom iste moguće utvrditi učestalost određenog haplotipa u okviru metapopulacije. Ovo je od posebnog značaja u istragama krivičnih dela i tumačenju dobijenog Y-STR haplotipa, s obzirom da je prava slika njegove učestalosti u okviru konkretne metapopulacije, a ne svih svetskih metapopulacija, gde se taj haplotip možda uopšte ne javlja. Da li će se pretragom baze utvrditi poklapanje, kao i da li su u pitanju "slučajno identični haplotipovi" ili "haplotipovi identični po poreklu" zavisi od broja lokusa obuhvaćenih haplotipom, njihove stope mutacija, veličine baze i struktuiranosti same populacije [67]. Veći broj markera po haplotipu i više stope mutacija povećavaju verovatnoću da su "haplotipovi identični po poreklu", a ne "slučajno identični". Ovo je takođe od značaja za forenzičke istrage jer se u slučaju poklapanja Y haplotipova visoke rezolucije između srodnika jedne muške linije istraga može suziti samo na tu liniju [67].

Literatura:

1. Bradbury N. *All Cells Have a Sex: Studies of Sex Chromosome Function at the Cellular Level*. Academic Press, 2017.
2. Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 1993; 92:315–324.
3. Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* 1992; 258:1784–1787.
4. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423:825–837.
5. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16(1):14.
6. L. Gusmao, M. Brion, I. Gomes, Chapter 30: the human Y chromosome malespecific polymorphisms and forensic genetics, in: M.J. Bogusz (Ed.), *Handbook of Analytical Separations*, Elsevier Science BV, 2008; p. 969–1000.
7. Boattini A, Sarno S, Mazzarisi AM, Viroli C, De Fanti S, Bini C, et al. Estimating Y-Str Mutation Rates and Tmrca Through Deep-Rooting Italian Pedigrees. *Sci Rep* 2019; 9(1):9032.
8. Sullivan K, Mannucci A, Kimpton C.P, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of an X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993; 15:636–638. 640–641.
9. Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C. Reliability of DNA-based sex tests. *Nat Genet* 1998; 18(2):103.
10. Butler J. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press 2011; ISBN: 9780123878236.
11. Casanova M, Leroy P, Boucekkin C, Weissenbach J, Bishop C, Fellous M, et al. A human Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance. *Science* 1985; 230:1403–1406.
12. Jobling M. A survey of long-range DNA polymorphisms on the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1994; 3:107–114.
13. Jobling M, Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet* 1995; 11:449–456.
14. Jobling M, Tyler-Smith C. Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era. *Nat Rev Genet* 2017; 18(8):485–497.
15. Köcher S, Müller P, Berger B, Bodner M, Parson, W., Roewer, L., et al. DNASEqEx Consortium. Inter-laboratory validation study of the ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit. *Forensic Science International Genetics* 2018; 36:77–85.
16. Goedbloed M, Vermeulen M, Fang RN, Lembring M, Wollstein A, Ballantyne K, et al. Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit. *Int J Legal Med* 2009; 123:471–482.
17. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Ychromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet* 2010; 87:341–353.
18. Poznik GD, Henn BM, Yee MC, Sliwerska E, Euskirchen GM, Lin AA, et al. Sequencing Y chromosomes resolves discrepancy in time to common ancestor of males versus females. *Science* 2013; 341:562–565.
19. Poznik GD, Xue Y, Mendez FL, Willems TF, Massaia A, Wilson Sayres MA, et al. Punctuated bursts in human male demography inferred from 1,244 worldwide Y-chromosome sequences. *Nat Genet* 2016; 48:593–599.
20. Helgason A, Einarsson AW, Guðmundsdóttir VB, Sigurðsson Á, Gunnarsdóttir ED, Jagadeesan A, et al. The Y-chromosome point mutation rate in humans. *Nat Genet* 2015; 47:453–457.
21. Fu Q, Li H, Moorjani P, Jay F, Slepchenko SM, Bondarev AA, et al. Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature* 2014; 514:445–449.
22. Jobling M. Y Chromosomal SNP Haplotype Diversity in Forensic Analysis. *Forensic Sci Int* 2001; 118(2-3):158–62.
23. Wetton JH, Tsang KW, Khan H. Inferring the population of origin of DNA evidence within the UK by allele-specific hybridization of Y-SNPs. *Forensic Sci Int* 2005; 152(1):45–53.
24. Phillips C. Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18:49–65.
25. Jobling M, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 2003; 4:598–612.
26. Underhill PA, Kivisild T. Use of y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. *Annu Rev Genet*. 2007; 41:539–64.

27. Cruciani F, Santolamazza P, Shen P, Macaulay V, Moral P, Olckers A, et al. A back migration from Asia to sub-Saharan Africa is supported by high resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1197–1214.
28. Karafet T, Xu L, Du R, Wang W, Feng S, Wells R, et al. Paternal population history of East Asia: sources, patterns, and microevolutionary processes. *Am J Hum Genet* 2001; 69:615–628.
29. Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhoövel W, Underhill P, Shen P, et al. Reduced Y-chromosome, but not mitochondrial DNA, diversity in human populations from West New Guinea. *Am J Hum Genet* 2003; 72:281–302.
30. Wells R, Yuldasheva N, Ruzibakiev R, Underhill P, Evseeva I, Blue-Smith J, et al. The Eurasian heartland: a continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:10244–10249.
31. Zerjal T, Wells R, Yuldasheva N, Ruzibakiev R, Tyler-Smith C. A genetic landscape reshaped by recent events: Y-chromosomal insights into central Asia. *Am J Hum Genet* 2002; 71:466–482.
32. Cruciani F, La Fratta R, Torroni A, Underhill P, Scozzari R. Molecular dissection of the Y chromosome haplogroup E-M78 (E3b1a): a posteriori evaluation of a microsatellite-networkbased approach through six new biallelic markers. *Hum. Mutat* 2006; 27:831–832.
33. Rootsi S, Magri C, Kivisild T, Benuzzi G, Help H, Bermisheva M, et al. Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am J Hum Genet* 2004; 75:128–137.
34. Balaresque P, Bowden GR, Adams SM, Leung HY, King TE, Rosser ZH, et al. A predominantly neolithic origin for European paternal lineages. *PLoS Biol* 2010; 8(1):e1000285.
35. Underhill P, Poznik G., Rootsi, S. et al. The phylogenetic and geographic structure of Y-chromosome haplogroup R1a. *Eur J Hum Genet* 2015; 23:124–131.
36. Willems T, Gymrek M, Poznik GD, Tyler-Smith C; 1000 Genomes Project Chromosome Y Group, Erlich Y. Population-Scale Sequencing Data Enable Precise Estimates of Y-STR Mutation Rates. *Am J Hum Genet* 2016;98(5):919–933.
37. Bosch E, Calafell F, Santos FR, Pérez-Lezaun A, Comas D, Benchemsi N, et al. Variation in short tandem repeats is deeply structured by genetic background on the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 1999; 65:1623–1638.
38. Athey WT. Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele-frequency approach. *J Genet Geneal* 2005; 1:1–7.
39. Athey WT. Haplogroup prediction from Y-STR values using a Bayesian-allele-frequency approach. *J Genet Geneal* 2006; 2:34–39.
40. Schlecht J, Kaplan ME, Barnard K, Karafet T, Hammer MF, Merchant NC. Machine-learning approaches for classifying haplogroup from Y chromosome STR data. *PLoS Comput Biol* 2008; 4:e1000093.
41. Roewer L, Arnemann J, Spurr NK, Grzeschik KH, Epplen JT. Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Genet* 1992; 89:389–94.
42. Roewer L, Epplen J.T. Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Sci Int* 1992; 53:163–171.
43. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*. 1985; 318(6046):577–9.
44. Purps J, Geppert M, Nagy M, Roewer L. Validation of a combined autosomal/Y-chromosomal STR approach for analyzing typical biological stains in sexual-assault cases. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 19:238–242.
45. Kayser M, Caglià A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study, *Int J Legal Med* 1997; 110(3): 125–133.
46. Kayser, M. Forensic use of Y-chromosome DNA: A general overview. *Hum Genet* 2017; 136(5):621–635.
47. Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, et al. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am J Hum Genet* 2004; 74:1183–1197.
48. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet* 2010; 87:341–353.
49. Liu H, Li X, Mulero J, Carbonaro A, Short M, Ge J. A convenient guideline to determine if two Y-STR profiles are from the same lineage, *Electrophoresis* 2016; 37(12), pp. 1659–1668.
50. Ballantyne KN, Keerl V, Wollstein A, Choi Y, Zuniga SB, Ralf A, et al. () 'A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages, *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6(2):208–218.

51. Adnan A, Ralf A, Rakha A, Kousouri N, Kayser M. Improving empirical evidence on differentiating closely related men with RM Y-STRs: a comprehensive pedigree study from Pakistan. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 25:45–51.
52. Alghafri R, Goodwin W, Ralf A, Kayser M, Hadi S. A novel multiplex assay for simultaneously analysing 13 rapidly mutating Y-STRs. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 17:91–98.
53. Boattini A, Sarno S, Bini C, Pesci V, Barbieri C, De Fanti S, et al. Mutation Rates and Discriminating Power for 13 Rapidly-Mutating Y-STRs between Related and Unrelated Individuals. *PLoS One* 2016; 11(11):e0165678.
54. Turrina S, Caratti S, Ferrian M, De Leo D. Are rapidly mutating Y-short tandem repeats useful to resolve a lineage? Expanding mutability data on distant male relationships. *Transfusion* 2016; 56(2):533–8.
55. Robino C, Ralf A, Pasino S, De Marchi MR, Ballantyne KN, Barbaro A, et al. Development of an Italian RM Y-STR haplotype database: Results of the 2013 GEFI collaborative exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2015; 15:56–63.
56. Kecmanović M, Čokić VP, Zgonjanin Bosić D, Jakovski Z, Veljković A, et al. A comprehensive mutation study in wide deep-rooted R1b Serbian pedigree: mutation rates and male relative differentiation capacity of 36 Y-STR markers. *Forensic Sci Int Genet* 2019; 41:137–144.
57. Thompson J, Ewing M, Frank W, Pogemiller J, Nolde C. A., Koehler D, et al. Developmental validation of the PowerPlex® Y23 system: A single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7(2):240–250.
58. Gopinath S, Zhong C, Nguyen V, Ge J, Lagacé R, Short M, et al. Developmental validation of the Yfiler® Plus PCR Amplification Kit: An enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Sci Int Genet* 2016; 24: 164–175.
59. Rakha A, Oh Y, Lee H, Hussain S, Waryah A, Adnan A, et al. Discriminating power of rapidly mutating Y-STRs in deep rooted endogamous pedigrees from Sindhi population of Pakistan, *Leg Med Tokyo* 2018; 34:17–20.
60. Claerhout S, Van der Haegen M, Vangeel L, Larmuseau M, Decorte R. A game of hide and seq: identification of parallel Y-STR evolution in deep-rooting pedigrees, *Eur J Hum Genet* 2019; 27:637–646.
61. Ralf A, Lubach D, Kousouri N, Winkler C, Schulz I, Roewer L, et al. Identification and characterization of novel rapidly mutating Y-chromosomal short tandem repeat markers. *Hum Mutat* 2020; 41(9):1680–1696.
62. Ralf A, Zandstra D, Weiler N, van Ijcken WFJ, Sijen T, Kayser M. RMplex: An efficient method for analyzing 30 Y-STRs with high mutation rates. *Forensic Sci Int Genet* 2021; 55:102595.
63. Oh Y, Lee H, Lee E, Kim E, Yang W, Shin K. Haplotype and mutation analysis for newly suggested Y-STRs in Korean father-son pairs, *Forensic Sci Int Genet* 2015; 15:64–68.
64. Da Fré NN, Rodenbusch R, Gastaldo AZ, Hanson E, Ballantyne J, Alho CS. Genetic data and de novo mutation rates in father-son pairs of 23 Y-STR loci in Southern Brazil population. *Int J Legal Med* 2015; 129(6):1221–3.
65. Petrovic V, Kecmanovic M, Keckarevic Markovic M, Keckarevic D, Assessment of mutation rates for PPY23 Y chromosome STR loci in Serbian father-son pairs, *Forensic Sci Int Genet* 2019; 39:e5–e9.
66. Claerhout S, Vandenbosch M, Nivelles K, Gruyters L, Peeters A, Larmuseau M, et al. Determining Y-STR mutation rates in deep-routing genealogies: identification of haplogroup differences, *Forensic Sci Int Genet* 2018; 34:1–10.
67. Roewer L. Y-chromosome short tandem repeats in forensics—Sexing, profiling, and matching male DNA. *WIREs Forensic Sci*. 2019; 1:e1336.
68. Andersen M, Eriksen P, Morling N. The discrete Laplace exponential family and estimation of Y-STR haplotype frequencies. *J Theor Biol* 2013; 329: 39–51.
69. Roewer, L., Krawczak, M., Willuweit, S., Nagy, M., Alves, C., Amorim, A. et al. () Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci Int* 2001; 118:106–113.
70. Millstein R. The concepts of population and metapopulation in evolutionary biology and ecology. In M. A. Bell, D. J. Futuyma, W. F. Eanes, & J. S. Levinton (Eds.), *Evolution since Darwin: The first 150 years*. 2010. Sunderland, MA: Sinauer
71. Willuweit S, Roewer L. The new Y Chromosome Haplotype Reference Database. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 15:43–48.
72. Baker J, Rotimi C, Shriner D. Human ancestry correlates with language and reveals that race is not an objective genomic classifier. *Sci Rep* 2017; 7(1):1572.
73. Quintana-Murci L, Krausz C, Zerjal T, Sayar S, Hammer M, Mehdi S, et al. Y chromosome lineages trace diffusion of people and languages in southwestern Asia. *Am J Hum Genet* 2001; 68(2):537–542.

74. Oota, H., Settheetham-Ishida, W., Tiwawech, D., Ishida, T., & Stoneking, M. (). Human mtDNA and Y-chromosome variation is correlated with matrilineal versus patrilineal residence. *Nat Genet* 2001; 29(1):20–21.
75. Rosser Z, Zerjal T, Hurles M, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, et al. Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am J Hum Genet* 2000; 67(6):1526–1543.



IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2022.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

Urednik

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Uređivački odbor

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

Autori

Aleksandar Cingel.....	238
Ana Branković.....	63
Ana Djordjević.....	63
Branislava Medić Brkić.....	15
Dragana Srebro.....	15
Dunja Drakulić.....	168
Dusan Keckarević.....	51, 275
Goran Brajušković.....	63
Gordana Matić.....	8
Ilona Đorić.....	75
Ivana Guševac Stojanović.....	168
Jelena Martinović.....	186
Jelena Perić.....	143
Jovana Despotović.....	90
Katarina Savić Vujović.....	15
Katarina Zeljić.....	223
Mariana Stanišić.....	255
Marijana B. Živković.....	104
Marina Zarić Kontić.....	186
Milena Trajković.....	238
Milena Ugrin.....	32
Milica Keckarević Marković.....	51, 275
Milica Popović.....	63
Miljana Kecmanović.....	51, 275
Neda Đorđević.....	206
Nevena Banjac.....	223
Nikola Jovanović.....	125
Predrag Vujović.....	155
Sladjana Jevremović.....	238
Slavica Ninković.....	223
Sonja Šelemetjev.....	75
Sonja Vučković.....	15
Suzana Matijašević-Joković.....	63
Tamara Dakić.....	155
Tatjana Mitrović.....	125
Tijana Išić Denčić.....	75
Zorana Dobrijević.....	63

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2022, br. 2 (sep.)- . - Београд :
Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство,
2021- (Београд : Curent Print). - 28 cm

Годишње. - Текст на срп. и енгл. језику.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929