

Broj 1 · septembar 2021. № 1 · September 2021.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**
Trends in **Molecular Biology**



Beograd · Belgrade · 2021.
IMGGI · IMGGE

Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformaticke
Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur

Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa
Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski

CRISPR-Cas9 tehnologija:
od osnovnih istraživanja do kliničke prakse
Marko Panić

Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika
Anita Skakić, Maja Stojiljković

Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti
Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević

Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih *DMPK* ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1
Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević

Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije
Marina Anđelković

Molekularna osnova monogenskog dijabetesa
Jovana Komazec, Milena Ugrin

Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda
Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković

Molekularni markeri u sistemskoj sklerozi: geni kandidati i terapijski modaliteti
Vesna Spasovski, Miša Vreća

Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji
Vladimir Gašić, Nataša Tošić

Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka
Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov

Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi
Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šeletmetjev

Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti
Ljiljana Rakićević

Bioško delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres
Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić

Biogeni utišavači virulencije vrste *Pseudomonas aeruginosa*
Milka Malešević, Branko Jovčić

Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra
Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić

6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

PREDGOVOR

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljuju najmoderne teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u pret-hodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadržani napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni domet u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredelite za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!”

Sonja Pavlović

IZ RECENZIJA TEMATSKOG ZBORNIKA

Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

Prof. Svetlana Radović, redovni profesor

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijski molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju KOVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

KOVID-19

COVID-19



Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike

Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur

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

Kontakt: branka.zukic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Novi koronavirus SARS-CoV-2, uzročnik upale pluća, sposoban je da zarazi ljude i izazove novu bolest COVID-19 koja je preopteretila zdravstvene sisteme širom planete i izazvala globalnu ekonomsku krizu. Klinička slika i tok bolesti kod pacijenata obolelih od COVID-19 varira od asimptomatske do letalnog ishoda. Kako se radi o istom uzročniku bolesti, individualni genomski profil pacijenta krije odgovor na pitanje medicinske nauke o uzroku ovog fenomena. U radu su sumirana dosadašnja znanja o genetičkim markerima koji su odgovorni za široki spektar kliničkih slika, kao i da li se već može primeniti individualizovan pristup lečenju. Prikazane su dosada istraživane varijante u genima (sa osvrtom na populacione specifičnosti) odgovorne za predispoziciju i odgovor na SARS-CoV-2 virusnu infekciju, farmakogenetičke varijante od značaja za lekove koji se koriste u lečenju pacijenata obolelih od COVID-19, kao i nutrigenetički markeri u genima važnim za metabolizam mikronutrijenata, vitamina D, selenia i cinka, koji se takođe koriste u terapiji pacijenata sa COVID-19. Udruženi napor istraživača, multidisciplinarni pristup, dostupnost modernih tehnologija koje imaju kapacitet analize celokupnih genoma, buduće sveobuhvatnije studije sa dobro okarakterisanim grupama pacijenata, kao i razvoj robusnijih bioinformatičkih alata koji koriste mašinsko učenje i napredne statističke metode, omogućiće identifikaciju novih genetičkih markera čoveka povezanih sa COVID-19, bolje razumevanje same patofiziologije bolesti, razvoj prave ciljane terapije kao i istaći značaj nutrigenomike i farmakogenomike za primenu personalizovane medicine u lečenju COVID-19.

Ključne reči: COVID-19, genomika, bioinformatika, nutrigenetika, farmakogenetika

Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics

Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur

Laboratory for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: branka.zukic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

The new cause of pneumonia, coronavirus SARS-CoV-2, capable of infecting people and causing the new disease COVID-19, overloaded health systems around the planet and caused a global economic crisis. The clinical presentation and the course of the disease in COVID-19 patients vary from asymptomatic to lethal. As it is the same cause of the disease, the individual genomic profile of the patient reveals the answer to the question of medical science about the cause of this phenomenon. The paper summarizes the current knowledge about genetic markers responsible for a wide range of clinical pictures, as well as whether an individualized approach to treatment can already be applied. The variants identified so far in genes (with reference to population specifics) responsible for predisposition and response to SARS-CoV-2 viral infection, pharmacogenetic variants of importance for drugs used in the treatment of patients with COVID-19, as well as nutrigenetic markers in genes important for the metabolism of the micronutrients, vitamin D, selenium and zinc, also used in the therapy of patients with COVID-19, are presented. The combined effort of researchers, a multidisciplinary approach, the availability of modern technologies that have the capacity to analyze entire genomes, future more comprehensive studies with well-characterized patient groups, and the development of more robust bioinformatics tools using machine learning and advanced statistical methods will enable the identification of novel human genetic markers associated with COVID-19, better understanding of the pathophysiology of the disease, development of the proper targeted therapy as well as point out the importance of nutrigenomics and pharmacogenomics for the application of personalized medicine in the treatment of COVID-19.

Keywords: COVID-19, genomics, bioinformatics, nutrigenetics, pharmacogenetics

Novi virus, uzročnik upale pluća, se pojavio prvi put u decembru 2019. godine u Vuhanu, Narodna Republika Kina [1]. Kako je ustanovljeno da pripada porodici betakoronavirusa [2] i zbog velike sličnosti sa MERS-CoV (eng. *Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus*, MERS-CoV, 50% identičnosti sekvene genoma) [3] i SARS-CoV (eng. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS-CoV, 79% identičnosti sekvene genoma) [4] koji su u prethodne dve decenije izazvali dve epidemije sa stopama smrtnosti od 9,5% i 34,4% [5], novi virus je nazvan SARS-CoV-2, a bolest koju izaziva - koronavirusna bolest 2019 ili COVID-19 (eng. *CoronaVirus Disease 2019*) [6]. Bolest se veoma brzo, kapljičnim putem, proširila po gradovima i državama sveta, ozbiljno preopteretila zdravstvene sisteme širom planete i izazvala globalnu ekonomsku krizu. Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*, WHO) je već u martu 2020. proglašila pandemiju i pozvala na globalnu akciju pronalaženja načina za sprečavanje širenja i lečenje bolesti COVID-19 [7].

Kliničke manifestacije ove virusne infekcije variraju od asimptomatskih do teških akutnih respiratornih sindroma i letalnih ishoda. U kategoriju osoba sa značajno većim rizikom za razvoj teške kliničke slike i većom stopom smrtnosti spadaju ljudi stariji od 60 godina, gojazni ljudi, muškarci, imunokompromitovani, osobe sa hroničnim bolestima poput kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa i hroničnih bolesti pluća, osobe sa malignitetima, pušači i ljudi lošijeg socioekonomskog statusa [8,9]. Simptomi se javljaju oko 5 dana nakon infekcije i uključuju višednevnu visoku temperaturu, suv kašalj, malaksalost, kratak dah, bol u mišićima. Teške kliničke slučajevе COVID-19 karakterišu upale pluća koje zahvataju preko 50% plućnog tkiva i saturacija krvи kiseonikom ispod 93% [10]. U oko 40% obolelih su prisutni i gastrointestinalni simptomi kao što su dijareja, povraćanje i gubitak na težini [11]. Većina obolelih se oporavi bez potrebe za bolničkim lečenjem sa blagim (40%) ili umereno teškim simptomima (40%) COVID-19. U oko 15% COVID-19 bolesnika neophodna je hospitalizacija, dok 5% obolelih zahteva intenzivno lečenje zbog teškog akutnog respiratornog sindroma, septičkog šoka, teške obostrane upale pluća ili tromboembolijskih komplikacija. Tešku kliničku sliku COVID-19 karakteriše prekomerni imunološki odgovor koji dovodi do nastajanja tzv. citokinske oluje praćene sistemskom inflamacijom, otkazivanjem unutrašnjih organa i često letalnim ishodom [12]. Posledice koje ostaju nakon infekcije virusom još uvek nisu dovoljno istražene, iako je sve veći broj slučajeva pacijenata sa takozvanim post-COVID stanjem. Post-COVID odlikuju simptomi poput vrtoglavice, bola u zglobovima i grudima i nedostatka dah, ili disfunkcija organa tokom više od 28 dana od infekcije virusom SARS-CoV-2 [10].

Poznato je da težini COVID-19 bolesti mogu da doprinesu određene karakteristike čoveka kao što su gojaznost ili starost preko 60 godina kao i ekološki i socijalni faktori koji imaju ulogu u izloženosti SARS-CoV-2 virusu, ali oni ne mogu u potpunosti da objasne različit odgovor na infekciju istim virusom kod različitih osoba. Kako klinička slika i tok bolesti obolelih od COVID-19 variraju od asimptomatske do letalnog ishoda, postalo je jasno da individualni genomski profil pacijenta krije odgovor na pitanje medicinske nauke o uzroku ovog fenomena. Tehnologije sekvenciranja nove generacije koje omogućavaju sveobuhvatnu analizu pojedinačnih genoma zajedno sa GWAS (eng. *genome wide association studies*) studijama (utvrđivanje povezanosti genetičkih markera sa patološkim fenotipom) i meta-analizama, donele su veliki napredak na polju biomedicinskih nauka. Omogućena je identifikacija specifičnih gena ili genetskih varijanti čoveka koje mogu da se dovedu u vezu sa predispozicijom za razvoj teške kliničke slike COVID-19 ili odgovorom na infekciju SARS-CoV-2 virusom i otkrića novih bioloških mehanizama u patogenezi bolesti. Imajući u vidu populacione specifičnosti, značajno je utvrditi kako se učestalosti ovih varijacija razlikuju među različitim svetskim populacijama. Kako ciljana terapija za efikasno lečenje pacijenata sa COVID-19 još uvek nije razvijena i dostupna, iako su nedavno razvijene vakcine, prenamena postojećih antivirusnih lekova za lečenje srodnih virusnih infekcija može biti racionalan pristup upravljanju pandemijom COVID-19. Od izuzetnog značaja za efikasnost terapije je prepoznati i sprečiti neželjena dejstva lekova. Identifikacija genetičkih varijanti i molekula važnih u patogenezi bolesti bi mogla da pomogne u razvoju ciljane terapije. Takođe, od početka pandemije je postalo jasno da je primena određenih mikronutrijenata u ishrani važna kod COVID-19 pacijenata, kako zbog jačanja imunološkog odgovora za odbranu od virusa, tako i zbog ublažavanja po život opasnih komplikacija SARS-CoV-2 infekcije.

PREDISPOZICIJA I ODOGOVOR NA SARS-CoV-2 VIRUSNU INFEKCIJU

Studija koja je analizirala simptome COVID-19 kod monozigotnih i dizigotnih blizanaca, pokazala je da se u 50% slučajeva razlikuje „predviđeni COVID-19“ fenotip od stvarnog i da je to posledica genetskih faktora [13].

Geni čoveka povezani sa osetljivošću i otpornošću na virusnu infekciju su obično oni koji kodiraju proteine uključene u proces ulaska virusa u ćelije čoveka, poput gena koji kodiraju receptore, ko-receptore i enzime koji modifikuju receptore [14]. Za infekciju ćelija domaćina od velikog značaja je S protein SARS-CoV-2 virusa, karakterističnog šiljastog oblika. S1 subjedinica S proteina sadrži receptor-vezujući domen (eng. *receptor-binding domain*, RBD) koji se vezuje za angiotenzin-konvertujući enzim 2 (eng. *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) dok je S2 fragment S proteina uključen u ulazak virusa u ćelije. RBD u takozvanoj „uspravnoj“ poziciji omogućava prepoznavanje ACE2 receptora, dok „spuštena“ pozicija omogućava izbegavanje odgovora imunskog sistema domaćina. RBD SARS-CoV-2 se najčešće nalazi u „spušte-

nom” položaju koji i pored toga zadržava visok afinitet prema ACE2 receptoru [15]. ACE2 receptori se nalaze na površini alveolarnih epitelnih ćelija tipa 2 u plućnom tkivu kao i na površini ćelija disajnih puteva, srca, krvnih sudova, jetre, bubrege i digestivnog trakta [16]. Upravo zbog toga COVID-19 ima raznovrsne simptome i razlikuje se od drugih respiratornih infekcija [17]. Po vezivanju za ACE2 receptor, SARS-CoV-2 endocitozom ulazi u ćeliju. Virusna RNK regрутује ribozome domaćina kako bi sintetisala proteine neophodne za svoju replikaciju, replikuje se u citoplazmi ćelija domaćina, sintetisani novi virioni se oslobađaju putem endoplazmatičnog retikuluma i Goldžijevog aparata, dok ćelije domaćina podležu apoptozi. Ulaganje koronavirusa u ćeliju omogućen je transmembranskom proteazom TMPRSS2 (engl. *transmembrane protease, serine 2*) koja ima dvostruku ulogu: aktivira ACE2 receptor i aktivira S protein virusa tako što ga seče omogućavajući fuziju virusnog omotača i ćelijske membrane. Lizozomalni enzimi katepsini takođe sekaju i tako aktiviraju S protein SARS-CoV-2 virusa [18,19]. Pokazano je da preaktivacija virusa enzymom furinom doprinosi infekciji ćelija u kojima je ekspresija proteaza i katepsina smanjena [20–22]. Preaktivacija furinom predstavlja kompenzaciju za konformaciju „spuštenog“ RBD-a, omogućavajući koronavirusu kako uspešnu infekciju ćelija, tako i izbegavanje imunskog odgovora.

Nedavne studije bavile su se varijantama gena ACE2 koje bi mogle direktno uticati na vezivanje za S protein SARS-CoV-2 i populaciono specifične razlike češćih varijanti gena ACE2 [23]. Identifikovane su 32 varijante u genu za ACE2 koje potencijalno utiču na sam ACE2 protein odnosno na njegovu aminokiselinsku sekvencu [24]. Takođe, varijante u ACE2 genu koje utiču na vezivanje S proteina SARS-CoV-2 virusa za ACE2 receptor moguće su biti od značaja (lizin 31 i tirozini 41, 82–84 i 353–357) [25]. Zanimljivo je da su ove varijante identifikovane u kineskoj populaciji a u drugima ne, što bi moglo da ukazuje da nema varijanti koje prirodno doprinose rezistenciji za vezivanje S proteina koronavirusa u drugim populacijama. Sedam hotspot varijanti je izdvojeno koje se javljaju u različitim populacijama (Lys26Arg, Ile468Val, Ala627Val, Asn638Ser, Ser692Pro, Asn720Asp i Leu731Ile/Leu731Phe). Analiza ekspresije ACE2 je pokazala 15 eQTL (engl. *expression quantitative trait loci*) varijanti sa većom učestalošću u kineskoj populaciji i populaciji istočne Azije u poređenju sa evropskom populacijom [24]. Nedavna studija identifikovala je i okarakterisala 33 varijante ACE2 na uzorku od oko 7000 italijanskih ispitanika [26]. Za varijantu N720D blizu mesta sečenja sa TMPRSS2, i tri varijante (V69C, L351V, P389H) je predviđeno da izazivaju konformacione promene ACE2 receptora koje menjaju interakcije sa RBD S proteina virusa. Strukturno modeliranje identifikovalo je varijante u ACE2 genu koje povećavaju (S19P, I21V, E23K, K26R, T27A, N64K, T92I, K102P, H378R) ili smanjuju (K31R, N33I, H34R, E35K, E37K, D38V, I50F, N51S, M62V, K68E, F72V, I83H, G326E, G352V, D355N, K388L, D509I) osetljivost na SARS-CoV-2 na osnovu interakcija sa S proteinom virusa [27]. Nedavno istraživanje na uzorku evropskih i istočnoazijskih COVID-19 pacijenata je identifikovalo dve varijante ACE2 (K26R i I468V) koje imaju potencijalno niže afinitete vezivanja za protein S [28]. Analiza transkriptoma pluća pacijenata sa dijabetesom, hipertenzijom i hroničnom opstruktivnom bolesti pluća otkrila da je ekspresija ACE2 kod ovih pacijenata znatno veća nego u plućima zdravih osoba [29]. Ova činjenica može objasniti zašto su ove osobe predisponirane za razvoj teže kliničke slike COVID-19. Međutim, druge studije sugerisu da veća ekspresija ACE2 može biti protektivni faktor za oštećenje pluća, jer ekspresija ACE2, bar u model sistemima životinja, opada sa godinama [30].

Za varijante u genu TMPRSS2 je takođe pokazano da bi mogle da utiču na težinu kliničke slike COVID-19 pacijenata [31]. Pokazano je da u populaciji Italije prisutno manje patogenih varijanti u TMPRSS2 genu u poređenju sa Evropljanima. Četiri egzonske varijante (3 sinonimne varijante i jedna missense p.Val160Met, rs12329760) identifikovane su sa značajno različitim učestalostima kada poređimo italijansko stanovništvo sa istočnim Azijatima i Evropljanima. Ranije je utvrđeno da je rs12329760 varijanta asocijirana sa genomskim rearanžmanima koji uključuju TMPRSS2 i koji povećavaju rizik od nastanka raka prostate [32]. Španska studija je pokazala vezu varijante TMPRSS2 rs75603675 sa SARS-CoV-2 infekcijom [33]. Analiza ekspresije TMPRSS2 gena pokazala je da postoje velike razlike u ekspresiji ovog gena između svetskih populacija [31].

Dve retke varijante, p.Thr33Ala i p.Gly146Ser, otkrivene su u genu za furin [34]. Varijanta p.Gly146Ser utiče na stabilnost furina i može promeniti njegovu sposobnost da seče mesta slična furinu u S proteinu SARS-CoV-2. Identifikovana je rs35074065 varijanta koja je istovremeno povezana sa povećanjem ekspresije TMPRSS2 i smanjenjem ekspresije interferonom-inducibilnog MX1 gena u plućnom tkivu, koji kodira protein koji učestvuje u ćelijskom antivirusnom odgovoru [35]. Nosioci ove varijante mogu biti osetljiviji na SARS-CoV-2 infekciju zbog povećane ekspresije TMPRSS2 na površini ćelija i istovremenog prigušivanja ćelijskog antivirusnog odgovora. Istraživanje varijanti u TMPRSS2 genu kod italijanskih COVID-19 pacijenata otkrilo je česti „evropski“ haplotip (rs463727, rs34624090, rs55964536, rs734056, rs4290734, rs34783969, rs11702475, rs35899679, rs35041537), potpuno odsutan u azijskoj populaciji. Ovaj haplotip je funkcionalno asociran sa drugom varijantom (rs8134378) lociranom na enhenseru TMPRSS2 gena koji reaguje na androgene [36]. Pretpostavlja se da ovaj haplotip utiče na povećanu ekspresiju TMPRSS2 gena na androgen-specifican način, što sugerise na mogući mehanizam povećanog rizika za razvoj teže kliničke slike COVID-19 kod muškaraca [31]. Varijante gena za androgene receptore koreliraju sa osetljivošću na androgene i uključene su u bolesti poput androgene alopecije i raka prostate, stanja koja su povezana sa lošijim ishodima COVID-19 i hospitalizacijom [37]. Brojni drugi geni vezani za X hromozom (poput IL13, IL4, IL10, XIST, TLR7, FOXP3) i geni vezani za Y hromozom (SRY, SOX9) mogu biti u osnovi seksualno-dimorfnih imunoloških odgovora [38].

Još neke proteze pored TMPRSS2 i furina, kao što su plazminogen, tripsin i transmembranska serinska proteaza 11A (TMPRSS11a), mogu da učestvuju u procesu ulaska SARS-CoV-2 virus u ćelije čoveka. Identifikovane su varijante u genima za plazminogen (p.Arg261His i p.Ala494Val u *PLG* genu) i tripsin (p.Asn54Lys u *PRSS1* genu) koje mogu da se dovedu u vezu sa različitim odgovorom na SARS-CoV-2 infekciju. Plazminogen je prisutan u plućnom tkivu, tačnije u disajnim putevima, alveolarnim epitelnim ćelijama tipa I i II kao i u endotelnim ćelijama [39]. Tripsin-1 kodira gen *PRSS1* i u svom aktivnom obliku eksprimira se u tankom crevu i u epitelnim ćelijama disajnih puteva i alveola tipa I i II [39]. Otkrivene su dve retke varijante u genu za *PRSS1*, c.592-8C>T i p.Asn54Lys. Varijanta c.592-8C>T može uticati na proces RNK iskrajanja, i tako na nivo proteina tripsin-1, a varijanta p.Asn54Lys bi mogla da izmeni njegovo katalitičko mesto. Transmembranska serinska proteaza 11A, kodirana *TMPRSS11a* genom, takođe je prisutna u gornjim disajnim putevima i u digestivnom traktu [40]. U genu *TMPRSS11A* otkrivene su dve retke varijante: p.Lys48Arg i p.Arg328Gln čiji efekat tek treba da se utvrdi.

Težina kliničke slike COVID-19 varira između zaraženih osoba, ali i između različitih populacija. Populacione studije su pokazale da bi varijante u genima koji kodiraju proteaze (furin, *PLG* i *PRSS1*) mogle biti dobri kandidati u predočnim studijama čiji bi cilj bio objasniti razlike u kliničkim manifestacijama, stopi oporavka i stopi mortaliteta od COVID-19 koje se razlikuju među različitim populacijama [35,41].

Geni koji učestvuju u urođenom imunom odgovoru čoveka na virusne infekcije mogu biti od velikog značaja za odgovor na samu SARS-CoV-2 infekciju [42]. Geni HLA lokusa (engl. *human leukocyte antigen*, HLA) predstavljaju važan faktor u odgovoru na prisustvo patogena u organizmu domaćina. U grupi pacijenata sa težim kliničkim simptomima COVID-19 učestalost alela *HLA-DRB1**04:01 bila je značajno niža u odnosu na učestalost u grupi asimptomatskih pacijenata, što ukazuje na protektivno svojstvo ovog alela. Alel *HLA-DRB1**04:01, asociiran sa asimptomatskim prenošenjem, relativno je čest u populacijama evropskog porekla koje naseljavaju severnije predele Evrope [43]. Pokazane su takođe i značajno različite učestalosti alela gena HLA između pacijenata sa težim oblicima COVID-19 i asimptomatskih pacijenata [43]. Jedna studija je otkrila da je *HLA-A**24:02 povezan sa osetljivošću na COVID-19 kod četiri od pet pacijenata iz Vuhana [44]. Nekoliko studija je koristilo prediktivne algoritme za identifikovanje koji HLA aleli igraju važnu ulogu u posredovanju zaštite od SARS-CoV-2 otkrivajući HLA alele povezane sa prepoznavanjem virusnog peptida epitopa [45,46]. *HLA-B**15:03 alel je identifikovan sa visokim kapacitetom za prezentaciju peptida poreklom od SARS-CoV-2 i drugih patogenih koronavirusa, što ukazuje na njegovu zaštitnu ulogu [45]. Suprotno tome, nosioci *HLA-B**46:01 mogu imati slabiji imunološki odgovor i razviti ozbiljnije simptome.

Studija koja je obuhvatila 1980 COVID-19 pacijenata u Španiji i Italiji, identifikovala je dva regionala povezana sa respiratornom insuficijencijom izazvanom SARS-CoV-2 [47]. Jedan region se nalazio unutar lokusa ABO krvnih grupa, pa su osobe sa A krvnom grupom imale veći rizik za razvoj teže kliničke slike, dok je O krvna grupa pokazala zaštitni efekat [48]. Drugi lokus na 3p21.31 uključuje šest gena (*SLC6A20*, *LZTFL1*, *FICO1*, *CKSCR6*, *KSCR1* i *CCR9*), među kojima su i receptori za hemokine i gen *SLC6A20* koji kodira za transporter za koji interaguje sa ACE2 receptorom.

Prethodno znanje o epidemiji SARS-CoV ukazuje da bi geni *MBL2* i *OAS1*, uključeni u urođeni imunološki odgovor čoveka na SARS-CoV infekciju, mogli da moduliraju osetljivost na infekciju betakoronavirusima [49,50]. Tri *MBL2* varijante, p.Arg52Cis, p.Gli54Asp i p.Gli57Glu u *MBL2*, koje su pokazale zнатне razlike u učestalostima među analiziranim populacijama sveta, imale su štetan efekat na *MBL2* protein [41]. Ove varijante u kodirajućem regionu utiču na stabilnost i koncentraciju *MBL2* proteina u serumu, pa su niski nivoi *MBL2* povezani sa povećanom osetljivošću na virusnu infekciju [51]. Interferoni tipa I (IFN) mogu da inhibiraju replikaciju virusa i dalje da indukuju ekspresiju različitih proteina sa antivirusnom aktivnošću [52]. Jedan od njih kodira gen *OAS1* koji sintetiše 2',5'-oligoadenilate, nakon čega se aktivira RnazaL, seče jednolančane RNK, što dovodi do degradacije virusne RNK i inhibicije replikacije virusa [53]. U genu *OAS1* otkrivene su tri retke varijante: p.Arg47Gln, p.Ile99Val i p.Arg130His. Varijanta p.Gly162Ser u *OAS1* genu je pokazala potencijalno patogeni efekat na funkciju *OAS1* proteina, smanjujući mu stabilnost. Najveća učestalost ove varijante zabeležena je u Afričkoj populaciji [41].

Retke varijante u genima koji su uključeni u odgovor IFN kao što su poznate varijante u genima za *IRF7*, *IFNAR1*, *TLR3*, *TICAM1*, *TBK1* i *IRF3* ili novootkrivene varijante u genima za *UNC93B1*, *IRF7*, *IFNAR1* i *IFNAR2*, mogu biti uključene u teške oblike COVID-19 [54].

COVID-19 Host Genetics inicijativa, konzorcijum istraživača iz 19 zemalja i 46 studija, meta-analizama i GWAS studijama na skoro 50000 COVID-19 pacijenata [55] otkrila je 15 značajnih lokusa širom genoma koji su povezani sa infekcijom SARS-CoV-2 ili teškim manifestacijama COVID-19. Varijante *DPP9* gena potvrđuju prethodne dokaze o uvećanom riziku od intersticijske bolesti pluća kod njegovih nosilaca. Različite varijante unutar *TYK2* pokazuju zaštitni efekat na nekoliko autoimunih bolesti. Varijante u lokusu 17q21.31 ranije su bile povezane sa plućnom funkcijom. Za nekoliko lokusa za koje je prethodno pokazano da imaju značajan uticaj na funkciju pluća nije potvrđeno da imaju značaj (*CKSCR6*, *LZTFL1*, *IFNAR2* i *OAS1*/2/3 lokusi). Dva lokusa koja utiču na težinu COVID-19 bolesti otkrivena su u studijama osoba sa istočnoazijskim poreklom. Jedan od ovih lokusa, blizu *FOXP4*, čest u istočnoj Aziji (40%), i u popula-

ciji bliskog istoka i Americi, ali ima malu učestalost u većini evropskih populacija (2-3%). Prethodne studije su potvrdile povezanost ovog lokusa sa nastankom raka pluća [56] ili intersticijalne bolesti pluća [57].

Analizirana je uloga prenaglašenog inflamatornog odgovora koji dovode do patologije povezane sa infekcijom SARS-CoV-2 [58]. Otpuštanje proinflamatornih citokina (IL-6, IL-1b, TNFa) tokom infekcije, citokinska oluja, povezano je sa razvojem ozbiljnog oštećenja alveola i upale pluća karakterističnih za sindrom akutnog respiratornog distresa. Pored toga, hronična upala je jedna od ključnih karakteristika starenja, gojaznosti i nekih komorbiditeta (hipertenzija, dijabetes) koji takođe utiču na klinički tok i ishod COVID-19. IL-6 je centralni proinflamatori citokin sa pleiotropnim funkcijama i specifičnim efektima u mikrookolini pluća tokom virusnih infekcija. Pokazano je da upalu pluća COVID-19 karakteriše poremećaj regulacije imunog sistema sa prekomernom proizvodnjom IL-6 što može predvideti respiratornu insuficijenciju i smrt kod pacijenata sa COVID-19 [59,60]. Meta-analiza 671 teških slučajeva bakterijske i virusne ne-COVID-19 upale pluća i 2910 lakših slučajeva bakterijske i virusne upale pluća utvrdila je značajnu povezanost alela IL-6-174C (povezan sa višim nivoom IL-6) sa težinom upale pluća [61].

Nedavni izveštaji opisuju COVID-19 pacijente sa kardiovaskularnim faktorima rizika koji razviju sistemsko otkazivanje organa i trombozu, uključujući infarkt miokarda i ishemijski moždani udar [62]. Pokazano je da je izmenjen profil ekspresije trombocitnih gena i funkcionalni odgovor trombocita kod COVID-19 pacijenata. Nalazi studije ukazuju da trombociti mogu preuzeti SARS-CoV-2 RNK nezavisno od ACE2 receptora. Povećanje aktivacije i agregacije trombocita kod COVID-19 pacijenata moglo bi se delimično pripisati aktivaciji MAP kinaznog puta i stvaranju tromboksana [63].

FARMAKOGENOMIKA LEKOVA KOJI SE KORISTE U TERAPIJI COVID-19

Iako su nedavno razvijene vakcine koje bi mogle pomoći u suzbijanju pandemije [64], lečenje COVID-19 pacijenata je i dalje izuzetno važno. Pošto ne postoje odobreni terapeutici za lečenje COVID-19 pacijenata, mogućnost prenamene postojećih (anivirusnih) lekova je, bar za početak, način da se pacijentima pomogne dok se ne razvije odgovarajuća ciljana terapija. Prepoznavanje povećanog rizika za pojavu neželjenih reakcija i neuspeha lečenja kod pacijenata sa COVID-19 je važno da se lečenje ne bi dodatno ugrozilo. Farmakogenomika proučava odgovor čoveka na lekove uslovljen DNK zapisom u genima odgovornim za metabolizam određenog leka. Ona je osnov za primenu personalizovane medicine. Cilj farmakogenomike i personalizovane medicine je da identifikuju genomske i kliničke promene da bi se predvideo individualni rizik za razvoj i tok bolesti, kao i pojedinačni odgovor na terapiju [65,66]. U nedostatku vremena za testiranje farmakogenomskih markera kod pojedinaca, populaciona farmakogenomika bi mogla biti od koristi u proceni povećanog rizika za pojavu neželjenih reakcija i neuspeha lečenja kod pacijenata sa COVID-19.

Među prvim lekovima koji su korišćeni za lečenje COVID-19 pacijenta su dve grupe lekova, antimalarici hlorokin/hidroksihlorokin i kombinacija antivirusnih lekova lopinavir/ritonavir, kao i antibiotik azitromicin [67]. Nešto kasnije u kliničke protokole za lečenje COVID-19 su uvršćeni i danuravir, takođe antivirusni lek, inhibitori RNK polimeraze ribavirin, remdesivir i favipiravir, zatim interferon, antagonist IL-6 odnosno tocilizumab, JAK2 inhibitori i kortikosteroidni lekovi [68].

Hlorokin ometa terminalnu glikozilaciju čelijskog receptora ACE2 i tako sprečava ulazak virusa u ćelije. Takođe inhibira replikaciju, transport i oslobađanje virusa. Hlorokin ima imuno-modulirajuću aktivnost, koja može sinergistički pojačati njegov antivirusni efekat *in vivo* [69,70]. Hidroksihlorokin je analog hlorohina, rastvorljiviji od hlorohina, i ima isti mehanizam delovanja kao i hlorokin [71]. Hlorokin se metaboliše pomoću enzima CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6 i CYP1A1. Metabolit hlorokina posle enzimske reakcije sa CYP2C8 je efikasniji od samog leka [72]. Hlorokin napušta ćeliju aktivnim transportom preko ABCB1 transporteru i supstrat je transporteru kodiranih *SLCO* genima [73]. Svi pomenuti proteini mogli bi imati uticaj na metabolizam hlorokina ako su u odgovarajućim genima prisutne farmakogenetičke varijacije. Geni uključeni u farmakokinetiku hidroksihlorohina i hlorohina su prepoznati farmakogeni [74]. Preporuka za korišćenje hlorokina i hidroksihlorokina u lečenju COVID-19 pacijenta je opozvana u junu 2020. na osnovu novih podataka koji sugerisu da potencijalna korist ovih lekova možda neće nadmašiti njihove poznate i potencijalne rizike. Naime, poznati su neželjeni efekti terapije hlorokinom i hidroksihlorokinom. Derivati hlorohina mogu izazvati ireverzibilnu toksičnu retinopatiju jer se vezuju za melanin u pigmentiranim ćelijama oka [75], poremećaje srčanog ritma (produženje QC intervala, Torsade de Pointes, ventrikularnu aritmiju i srčani zastoj) posebno kada se pacijenti leče kombinovano sa ritonavirom i lopinavirom [76], gastrointestinalne (mučnina, grčevi) i kožne (osip, svrab) manifestacije za koje se smatra da nisu ozbiljne, zatim hipoglikemiju i supresiju koštane srži pri dugotrajnoj, ali ne i pri kratkotrajnoj upotrebi [77]. Pacijenti sa nedostatkom glukoze-6 fosfat dehidrogenaze (G6PD) imaju veliki rizik od razvoja teške hemolize nakon uzimanja hlorokina [78]. Preporučuje se ispitivanje G6PD pre uvođenja hlorokina. Iako je profil toksičnosti hlorokina i hidroksihlorokina sličan, hidroksihlorokin se bolje podnosi i ima manju učestalost toksičnosti od hlorokina [76]. Studija na 194 pacijenata sa sistemskim eritematoznim lupusom pokazala je da je odnos aktivnog metabolita hidroksihlorokina u odnosu na njegov osnovni lek povećan za ~20% kod nosilaca varijante CYP2D6 rs1135840 [79]. U

grupi od 164 pacijenata zaraženih malarijom, kod nosilaca alela sa niskom aktivnošću *CYP2C8*2, *3 i *4* pokazano je nakon tretmana hlorokinom da su asociirani sa manjim smanjenjem gametocita *Plasmodium vivax* i *Plasmodium ovale* od nosilaca alela bez tih varijanti [80]. Naknadna analiza je pokazala da su varijantni aleli *SLCO1A2* i *SLCO1B1* uticali na niži klirens gametocita *Plasmodium vivax* i *Plasmodium ovale* od alela bez varijanti nakon prilagođavanja doze hlorokina na osnovu varijanti u *CYP2C8* genu [73]. Retinopatija se ređe javljala kod osoba sa varijantnim alelom *ABCA4 c.5814A>G* [81]. Četiri varijante u farmakogenima *G6PD* i *CYP2C8* verovatno su povezane sa odgovorom na hlorokin i hidroksihlorokin. Učestalost varijante *G6PD rs2230037*, povezane sa nedostatkom *G6PD* i hemolitičkom anemijom, iznosi oko 10% za srpsku populaciju, što je više nego u finskoj populaciji (5,6%), ali niža u poređenju sa južnoazijskim (27,8%) i Afrikancima (26,7%) [82]. Tri varijante *CYP2C8* gena, rs10509681, rs11572103, rs1058930, povezuju se sa smanjenom aktivnošću enzima *CYP2C8* [82].

Azitromicin je makrolidni antibiotik. Pacijenti sa oslabljenim imunološkim sistemom nakon infekcije SARS-CoV-2 su podložni bakterijskoj superinfekciji, pa bi azitromicin mogao biti koristan u lečenju COVID-19. Osim toga, azitromicin se pokazao efikasnim u sprečavanju teških respiratornih komplikacija kod pacijenata sa virusnim infekcijama [83]. Metabolije ga enzim *CYP3A4*. Ovaj antibiotik se izbacuje iz ćelije transporterima *ABCB1* i *ABCC2*. Varijante u genu *ABCB1 rs2032582* i *rs1045642* mogu biti uzrok smanjenih koncentracija azitromicina u plazmi pa samim tim i umanjenog terapijskog odgovora na azitromicin [84]. Iste varijante dovode se u vezu i sa odgovorom na lekove lopinavir i ritonavir.

Efikasnost samog hidroksihlorokina i u kombinaciji sa antibiotikom azitromicinom u suzbijanju infekcije SARS-CoV-2 u gornjim disajnim putevima COVID-19 pacijenata potvrđena je u dve francuske studije [85,86]. Novija studija pokazala je da ne postoji poboljšanje kod pacijenata sa COVID-19 lečenih kombinovanom terapijom hidroksihlorokina i azitromicina [87].

Terapija koja je obećavala uspeh u lečenju COVID-19 je antiretrovirusna kombinacija lekova lopinavir/ritonavir koja inhibira proteazu sličnu 3-himotripsinu [88]. U ovoj kombinaciji glavni agens je lopinavir, za koji se ranije pokazalo da deluje protiv MERS-CoV *in vitro* [89]. Ritonavir se koristi za inhibiranje izoforme *CYP3A4* [90], kako bi se povećala koncentracija antiretrovirusnih lekova u plazmi poput lopinavira [91]. Geni *ABCB1, ABCC1* i *ABCC2* koji kodiraju membranske transportere koji vezuju ATP igraju ključnu ulogu u rezistenciji na veliki broj lekova jer mogu doprineti povećanom izbacivanju lekova iz ćelija [92]. Još jedan membranski transporter kodiran *SLCO1B1* genom doprinosi transportu ovih lekova [93]. Ovi transporteri su važni jer utiču na nivo lopinavira i ritonavira u plazmi, što implicira moguće toksične epizode. Neželjena dejstva su takođe česta kada se koristi kombinacija lopinavir/ritonavir [94]. Kod pacijenata koji primaju ovu terapiju zabeležen je značajan porast transaminaza [95]. Među ostalim mogućim neželjenim efektima ovih antiretrovirusnih lekova su dislipidemija, gastrointestinalni poremećaji, hiperbilirubinemija, nefrolitijaza [96,97]. I lopinavir i ritonavir metabolišu se pomoću glukuronosiltransferaza i enzima kodiranih *CYP1A1, CYP2C8, CYP2D6, CYP3A4* i *CYP3A5* genima [98,99]. Kako su ovi geni važni za nivo antiretrovirusnih lekova u plazmi, njihova smanjena aktivnost kao posledica prisustva određenih varijanti u genima, dovodi do mogućeg neuspeha u zaustavljanju replikacije virusa. Apolipoproteini kodirani farmakogenima *APOE* i *APOC3* su esencijalni u metabolizmu masti [100,101]. Varijante u ovim genima utiču na nivo triglicerida i holesterola, i samim tim verovatno doprinose dislipidemiji, uobičajenom neželjenom dejству antiretrovirusnih lekova [96]. Dve česte varijante gena *ABCB1, rs1045642* i *rs2032582*, mogle bi dovesti do smanjenog klirensa lekova azitromicina, lopinavira i ritonavira [82]. Takođe, varijanta *SLCO1B1 rs4149056* je potencijalno povezana sa smanjenim klirensom lopinavira [82]. Osim toga, pacijenti lečeni ritonavirom mogli bi iskusiti hiperbilirubinemiju ukoliko su i nosioci alela *UGT1A7 rs17868323*, čija je učestalost u srpskoj populaciji 62,9% [82]. Studija koja je proučavala asocijaciju 290 varijanti sa toksičnošću povezana sa lopinavicom/ritonavicom među 104 belaca sa HIV infekcijom pokazala je da varijante u genima *CETP, MCP-1, ABCC2, LEP* i *SLCO1B3* mogu uticati na pojavu dislipidemije i hiperbilirubinemije, a varijanta u *IL-6* na dijareju [102].

Darunavir, inhibitor proteaze koji se takođe koristi u lečenju HIV-a, supstrat je *CYP3A4* enzima i koristi se istovremeno sa inhibitorom *CYP3A4*, kobicistatom, u kliničkom ispitivanju za lečenje COVID-19 [103]. Otkriveno je nekoliko haplotipova u *CYP3A4* koji utiču na aktivnost i/ili ekspresiju *CYP3A4*. Oni bi mogli uticati na koncentracije lekova darunavira i kobicistata, ali ih tek treba proučiti. Iako nema direktnih dokaza da je darunavir supstrat za *SLCO3A1*, zapažen je 12% značajno manji klirens darunavira kod nosilaca varijante *SLCO3A1* [104].

Interferoni, posebno IFN- β 1b, su pokazali efikasnost protiv SARS- i/ili MERS-koronavirusa i trenutno se ispituju na COVID-19 bilo samostalno ili u kombinaciji sa drugom terapijom – kombinacijom lopinavir/ritonavir. Farmakogenetički markeri za biološku terapiju nisu dobro definisani. Nasuprot tome, smanjena efikasnost i povećani štetni efekti usled povećavanja imunogenosti predstavljaju posebnu brigu među biološkim lekovima. U grupi pacijenata sa multiplom sklerozom u Švedskoj koji su primali IFN- β 1b, rizik od biološki relevantnog razvoja neutralizujućih antitela bio je veći kod pacijenata sa alelom *HLA-DRB1*04* i manji kod pacijenata nosilaca *HLA-DRB1*15* alela [105]. U GWAS studiji sa 56 pacijenata obolela od multiple skleroze lečenih IFN- β 1b i 126 kontrolnih ispitnika, identifikovan je veći rizik od hepatotoksičnosti izazvane IFN kod pacijenata nosilaca varijanti *IRF6* gena, koji kodira regulatorni faktor interferona i uključen je u nastanak oštećenja jetre [106].

Teški oblik COVID-19 povezan je sa oslobađanjem IL-6 citokina sa povišenim nivoom samog IL-6 [107]. Tocilizumab, inhibitor receptora za IL-6, obično se koristi u lečenju reumatoidnog artritisa (RA) i sindroma oslobađanja citokina izazvanog terapijom T-ćelijama receptora himernog antiga, a sada i za lečenje COVID-19. Iako je poznato nekoliko genetskih varijanti koje mogu da se dovedu u vezu sa efikasnošću tocilizumaba u RA, uključujući *FCGR3A*, *IL6R*, *CD69*, *GALNT18* [108,109], primena ovih markera u COVID-19 individualizaciji doze tocilizumaba bez prethodne validacije je spekulativna. Nijedna studija se nije bavila farmakogenomikom tocilizumaba kod pacijenata sa citokinskom olujom, koja je po fiziologiji slična onoj koja se razvija kod COVID-19 pacijenata. Jedine genetske varijante koje potencijalno uključuju farmakokineticu tocilizumaba otkrivenе су u genu *FCGR3A*. Kod 87 pacijenata sa RA lečenih tocilizumabom, genotip *FCGR3A* rs396991 TT pokazao je bolji odgovor na lek nakon 12 meseci terapije. Ova varijanta može uticati na afinitet Fc fragmenta IgG receptora prema tocilizumabu i promeniti njegov sistemski klirens [108]. Smatra se da polimorfizmi *IL6R* utiču na intracelularni signalni put receptora IL-6 vezan za tocilizumab, što takođe može biti primenljivo na druga stanja u čiji nastanak je uključen put IL-6 [109]. Nasuprot tome, smatra se da varijante u *CD69* i *GALNT18* imaju ograničene direktnе efekte na tocilizumab. Varijante u tim genima će verovatnije uticati na nizvodne signalne puteve imunološkog sistema kod pacijenata sa RA, što može ograničiti generalizaciju na pacijente koji nisu RA [110]. U ovom trenutku postoje ograničeni dokazi da bi farmakogenomske markeri bili od pomoći u određivanju odgovora na terapiju tocilizumabom kod COVID-19. Nisu zabeleženi relevantni farmakogenomske podaci kod drugih antagonista IL-6 ili IL-1 (sarilumaba, siltuksimaba i anakinre).

Lekovi koji čiji je mehanizam delovanja inhibicija RNK polimeraze, kao što su ribavirin, remdesivir i favipiravir, pokazali su veoma veliki potencijal za lečenje COVID-19 pacijenata.

Ribavirin je još jedan prenamenjen lek koji se koristi u lečenju infekcije virusom hepatitisa C a sada i za lečenje COVID-19 [111]. Neželjeni efekti ribavirina uključuju hemolitičku anemiju i hepatotoksičnost. Varijante u genima koji kodiraju celijske transportere ribavirina doprinose do 30% varijabilnosti koncentracije samog leka, dok je značajno veća varijabilnost zabeležena kod nosilaca varijanti u genu za *SLC29A1*, a značajno niža kod nosilaca varijanti u genu za *SLC28A2* i genu za *SLC28A3* [112]. Dobro je poznato da različite varijante *ITPA* gena (inozin trifosfataze) imaju zaštitne efekte protiv hemolitičke anemije, uzrokovane primenom ribavirina [113]. Smanjena aktivnost *ITPA* u eritrocitima dovodi do nakupljanja inozin trifosfata i štiti od hemolize izazvane ribavirinom. U studiji koja je koristila meta-analizu potvrđeno je da je pad hemoglobina bio povezan sa aleloma *ITPA* gena rs1127354 CC, rs7270101 AA i rs6051702 AA [114]. Treba napomenuti da je hemolitička anemija takođe prijavljena pri kratkotrajnoj upotrebi ribavirina za lečenje respiratorne virusne infekcije [115]. Nasuprot tome, varijanta *ITPA* rs6139030 je identifikovana kao ona koja nosi povećan rizik od trombocitopenije među 303 pacijenata sa hepatitism C koji su primali ribavirin i peg-interferon [116]. Farmakogenomska varijanta *IL28B* (*IFNL3*) rs12979860 bi mogla biti važna za terapijski odgovor na ribavirin. Ribavirin se koristi u kombinaciji sa polietilen-glikol-(PEG)-ilovanim interferonom-a (PEG-IFNa/RBV) kao standardna terapija za lečenje hroničnog hepatitisa C (HCV) [117], i pokazano da bi ova kombinacija mogla biti potencijalno korisna terapija za COVID-19 [118]. Za pacijente lečene samo PEG-IFN-a i samo ribavirinom, varijanta *IL28B* rs12979860, najbolji je prediktor odgovora na lečenje. Genotip rs12979860 CC bio je povezan sa 2,5 ili većom stopom u proseku stabilnog virusološkog odgovora u poređenju sa TT genotipom. TT i CT genotipovi varijante rs12979860 povezani su sa lošim odgovorom na terapiju ribavirinom. Pokazano je da se učestalosti alela rs12979860 razlikuju širom sveta [119].

Remdesivir je postao dostupan za teške slučajeve COVID-19 u Sjedinjenim Državama tako što je Američka agencija za hranu i lekove (*US Food and Drug Administration*, FDA) izdala ovlašćenje za hitnu upotrebu 1. maja 2020, nakon dve randomizovane, dvostruko slepe, placebom kontrolisane studije koje sugerisu da potencijalne koristi nadmašuju poznate i potencijalne rizike [120,121]. Analize *in vitro* ukazuju da bi remdesivir mogao biti supstrat za enzime CYP2C8, CYP2D6 i CYP3A4, i supstrat za transportere OATP1B1 i P-glikoprotein. Tako bi poznate farmakovarijante ovih gena teoretski mogle uticati na farmakokineticu remdesivira.

Favipiravir je razvijen i odobren u Japanu 2014. godine isključivo za rezistentnu, novu pandemiju gripe i sada je korišćen za lečenje COVID-19. Iako nema podataka o njegovoj farmakogenomici, zna se da se metaboliše aldehid oksidazom i delimično putem ksantin oksidaze [122]. Varijante u genu za aldehid oksidazu asocijirane su sa lošim odgovorom na druge lekove koji su takođe supstrati aldehid oksidaze, kao što su azatioprin ili alopurinol [123].

Grupa lekova inhibitora JAK2 su potencijalno efikasni imunomodulatori za lečenje COVID-19. FDA je odobrila ruksolitinib za lečenje mijeloproliferativne bolesti i protiv odbacivanja transplantata, a baricitinib za lečenje RA. Nijedna objavljena studija nije govorila o efektima genetskih varijanti na bilo koji od ova dva leka u bilo kojoj populaciji pacijenata. Međutim, njihovi farmakokinetički putevi uključuju nekoliko potencijalno važnih farmakogena. Ruksolitinib je glavni, a baricitinib sporedni supstrat CYP3A4. Ruksolitinib se takođe delimično metaboliše pomoću CYP2C9. Oba ova gena su prepoznati farmakogeni za značajnim genetskim varijantama [124]. Iako *SLC22A8* koji kodira OAT3 transporter, potencijalno značajan farmakogen za baricitinib, nije dosad prepoznat kao farmakogen, uticaj varijanti na njegovu aktivnost je prethodno priavljen u drugom leku [125].

Primena kortikosteroida u lečenju pacijenata zaraženih SARS-CoV-2 virusom uglavnom je ograničena na one sa akutnim respiratornim distres sindromom (ARDS). Mnoge varijante su povezane sa odgovorom kortikosteroida i toksičnošću u više bolesti, uključujući gene koji kodiraju proteine uključene u vezivanje receptora (CRHR1, NR3C1), proteine šaperone/kohaperone (ST13, STIP1, FKBP5), metabolišuće enzime (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, GSTT1) i transportere (ABCB1 ili P-glikoprotein) [126]. Mehanički i metabolički putevi steroida su složeni, a genomske determinante sa dovoljno dokaza za kliničku primenu na COVID-19 nisu identifikovane. Farmakovarijante su dosada procenjivane samo u kombinovanoj terapiji (npr. sa hemoterapijom) ili inhalacionim kortikosteroidima. Nisu pronađene nikakve farmakogenetske informacije o efikasnosti kortikosteroida za ARDS.

Etničke razlike u učestalostima farmakogenomske markera je važno znati, jer klinička upotreba svakog od markera treba da bude validirana za datu populaciju [82]. Utvrđeno je da bi lopinavir i ritonavir trebalo pažljivo koristiti u populaciji istočne Azije, jer je prijavljeno da su varijante *CYP3A4* rs28371759 i *ABCB1* rs2032582 prisutne u ovoj superpopulaciji sa visokim učestalom. Testiranje gena *ABCB1* moglo bi biti od značaja za evropsku (rs9282564) i afričku populaciju (rs2032582). Osim toga, na lečenje ACE inhibitorima moglo bi uticati prisustvo ACE2 varijanti (rs1799752, rs558593002, rs13306087, rs3730025, rs35141294 i rs4314), što se posebno odnosi na populaciju istočne Azije [127]. Hlorokin bi mogao biti terapija izbora za lečenje COVID-19 u evropskoj populaciji jer su aleli koji su povezani sa nižim rizikom za loš odgovor na terapiju prisutni sa nižom učestalošću [128]. Utvrđeno da je učestalost varijantnih alela veoma visoka za varijante *G6PD* rs2230037 i *ABCB1* rs2032582 u afričkoj populaciji.

NUTRIGENETIKA COVID-19

Nutrigenetika proučava efekat genetičke varijabilnosti na unos i metabolizam nutrijenata, dok nutrigenomika ispituje kako nutrijenti i bioaktivne komponente u hrani utiču na ekspresiju gena [129]. Pored toga što su povezane sa dijetarnim navikama, razlike u genetičkom profilu ljudi uslovjavaju interindividualnu varijabilnost u bioraspoloživosti unetih makro i mikro-nutrijenata. Osobe sa genetičkom predispozicijom za nisku bioraspoloživost određenog nutrijenta imaju veći rizik za neoptimalan status tog nutrijenta [130]. Ove nasledne razlike, koje su ujedno i populacione specifične, utiču na aktivnost proteina za transport nutrijenata, zatim enzima koji učestvuju u njihovom metabolizmu i enzima koji koriste nutrijente kao kofaktore [129]. Nutrigenetika može doprineti boljem razumevanju genetičkih faktora koji utiču na unos i metabolizam nutrijenata važnih za održavanje optimalnog zdravlja zbog čega se ova naučna oblast često smatra ogrankom personalizovane medicine. Sa pojavom novih visokopravosudnih tehnologija i projekata koji su imali za cilj definisanje referentnog humanog genoma i analizu populacione varijabilnosti kao što su Projekat 1000 genoma i gnomAD, genomika dobija istaknut značaj za opšte javno zdravlje. Svakako, treba imati u vidu da ni jedan genetički faktor ne može biti analiziran van konteksta sredine kojom je okružen, kao i da sredinski faktori ne utiču na zdravlje nezavisno od genomske osnove.

Mikronutrijenti kao što su vitamin D, cink i seleni su za brojne funkcije u organizmu ljudi, između ostalog za imunsku odbranu od raznih infektivnih agenasa, naročito virusnih respiratornih infekcija kakav je SARS-CoV-2 [131]. Optimalni status ovih mikronutrijenata, pored jačanja imunskog odgovora i virusnog klirensa, može doprineti ublažavanju komplikacija COVID-19 koji su posledica nekontrolisane inflamacije. Brojne su imunomodulatorne funkcije vitamina D koje ovaj steroidni prohormon izvršava vezivanjem za receptor za vitamin D (VDR), koji je ujedno i transkripcioni faktor. Na taj način vitamin D reguliše aktivnost preko 200 gena čiji su efekti razni: od sprečavanja makrofaga da otpuste prekomernu dozu proinflamatornih citokina i hemokina, smanjenja proliferacije limfocita i povećanja sinteze antinfiamatornih citokina [132], ojačavanja epitelijalne barijere [133], smanjenja proizvodnje slobodnih radikala [134], do regulacije ekspresije ACE2 receptora, glavnog targeta SARS-CoV-2 za ulazak u ćeliju [135]. Cink ispoljava svoje direktnе anti-viralne efekte tako što inhibira unos virusa u ćeliju domaćina, njegovu replikaciju i procesovanje virusnih poliproteina [136]. Hlorokin, jedan od lekova koji se preporučiva za lečenje COVID-19, vezuje cink i olakšava njegov transport u ćeliju, a povećana dostupnost cinka može doprineti terapijskom efektu ovog leka [137]. Takođe, važno je istaći da oko 10% proteina u našem organizmu koristi cink kao kofaktor u barem 200 imunomodulatornih i antioksidativnih reakcija [138]. Selen preko selenoproteina podstiče imunski odgovor организма tako što aktivira proliferaciju i aktivaciju T limfocita i ćelija prirodnih ubica, sprečava progresiju i pozitivno utiče na ishod infektivnih bolesti [139]. Sve je više podataka da status vitamina D, cinka i seleni, može značajno uticati na kliničku manifestaciju COVID-19, što ih kandiduje za bezbedne, dostupne i neinvazivne tretmane u prevenciji i lečenju COVID-19 [136,137,140].

Nekoliko studija je ukazalo na potencijalni uticaj vitamina D na težinu kliničke slike COVID-19 [141,142]. Metastudija koja je ispitivala vezu između nivoa vitamina D i incidence COVID-19 kao i stopu smrtnosti uzrokovane ovom bolešću, pokazala je korelaciju između deficijencije vitamina D i broja obolelih i umrlih od COVID-19 u evropskim zemljama [143]. Takođe, pokazano je da su regioni do kojih dopire manje ultraljubičastog B spektra i čiji stanovnici imaju niži nivo vitamina D skloniji infekcijama SARS-CoV-2 [144]. Zaključci o pozitivnom uticaju vitamina D na težinu klini-

čke slike COVID-19 bazirani su na opservacionim studijama, dok randomizirane kontrolisane kliničke studije nisu pokazale vezu između tretmana vitaminom D i težine kliničke slike COVID-19 [145]. U slučaju cinka, rezultati studija koji su uključivali pacijente sa COVID-19 kvalifikovali su deficijenciju cinka kao biomarker za progresiju bolesti. Pacijenti sa nižim nivoom ovog mikronutrijenta su imali višu stopu komplikacija, teškog akutnog respiratornog sindroma, uključivanja kortikosteroidne terapije, duže bolničko lečenje i povećanu smrtnost [146]. Od mikronutrijenata povezanih sa imunološkim odgovorom, kod pacijenata sa COVID-19 je pored vitamina D najčešće bio zabeležen i nizak nivo selena [147]. U longitudinalnoj, opservacionoj studiji sprovedenoj u Nemačkoj koja je uključila 33 pacijenta sa COVID-19, utvrđen je izrazito nizak nivo selena kod skoro polovine pacijenta. Status selena je bio značajno viši kod kontrola u odnosu na pacijente sa COVID-19, kao i kod pacijenata koji su se oporavili u odnosu na one sa smrtnim ishodom [148]. Pored navedenih kliničkih opservacija, od posebnog interesa je uočena veza između glavne proteaze virusa SARS-CoV-2 odgovorne za njegovu replikaciju i seleno-enzima glutation peroksidaze 1 (GPX1). Značajan je i podatak da ebselen, sintetičko jedinjenje selena koje oponaša GPX1, predstavlja snažni inhibitor glavne proteaze virusa SARS-CoV-2 [131].

Nedostatak vitamina D, cinka i selena je rasprostranjen u svetu, sa većom ili manjom zastupljenosti u zavisnosti od regionalnih, starosnih i etničkih grupa. Različite studije pokazale su da je nedostatak vitamina D izražen u evropskim i severnoameričkim populacijama u razmerama koje se mogu smatrati pandemijom [149]. U severnoj Evropi nedostatak vitamina D je uočen kod manje od 20% ljudi, u južnoj, istočnoj i zapadnoj Evropi je zastupljen kod 30-60% ljudi, dok procenat u zemljama Bliskog Istoka ide i do 80% [150]. Oko 20% svetske populacije ima deficijenciju cinka [151], dok skorašnji podaci za Srbiju pokazuju da stanovništvo u proseku ima niže nivoje ovog mikronutrijenta u poređenju sa Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadom, kao i drugim zemljama u Evropi [152]. Neadekvatan status selena uslovljen je osiromašenim sadržajem ovog mikronutrijenta u zemljишtu, pa deficijencija selena zavisi od geografskog regiona i izraženja je u istočnoj u poređenju sa zapadnom Evropom [153]. Nedavna studija na ispitanicima iz Srbije pokazala je da 46% populacije ima vrednosti selena u plazmi niže od preporučenih [154]. Nedostatak vitamina D, cinka i selena mogao bi značajno da utiče na slabiju imunokompetentnost populacija sa izraženim deficitom. Prilikom razmatranja preventivnih i terapeutskih strategija tokom pandemije COVID-19, treba imati na umu da status mikronutrijenata ne zavisi samo od ishrane, starosti, pola, sredinskih faktora, već na bioraspoloživost utiče i genetički profil pojedinca [130]. S tim u vezi, analiza genetičke predispozicije za suboptimalne stase mikronutrijenata može biti značajna za identifikaciju pojedinaca ili populacija pod rizikom za teže oblike infekcije COVID-19.

GWAS studije izvedene na velikim kohortama ispitanika iz Evrope, identifikovale su gene povezane sa izmenjenim nivoom i različitom bioraspoloživošću vitamina D, cinka i selena [155-158]. Najviše podataka je dostupno za genetičke varijante povezane sa nivoom cirkulišućeg 25(OH)D koji je marker statusa vitamina D. Genetičke varijante asocijirane sa nivoom 25(OH)D lokalizovane su u blizini ili u genima koji kodiraju proteine uključene u sintezu (*DHCR7*), transport (GC) i metabolizam vitamina D (*CYP2R1*, *CYP24A1*) [155,157,159]. U GWAS koja je uključila preko 400,000 učesnika evropskog porekla i preko 20 miliona varijanti [160], identifikovano je 69 nezavisnih lokusa asocijiranih sa nivoom 25(OH)D, od toga 63 lokusa nisu ranije dovođena u vezu sa nivoom vitamina D. Ova studija je potvrdila prethodno identifikovane asocijacije nivoa 25(OH)D sa genima GC, *DHCR7*, *CYP2R1*, *CYP24A1*, *AMDHD1* i *SEC23A*.

Sve je veći broj studija čiji je cilj analiza asocijacija nutrigenetičkih markera statusa vitamina D sa kliničkom manifestacijom COVID-19. Skorašnja studija sporovedena na adultnim pacijentima sa COVID-19 iz Srbije pokazala je asocijaciju teže kliničke slike sa varijantama u genima *DHCR7* i *CYP2R1* [161]. Gen *DHCR7* kodira enzim 7-dehidrocolesterol reduktazu koji preusmerava prekursor holekalciferola iz puta sinteze vitamina D pod dejstvom sunčevog ultraljubičastog (UV-B) zračenja u koži ka sintezi holesterola. Suprotno postavljenoj hipotezi, studija je pokazala je da su nosioci varijante *DHCR7 rs12785828*, povezane sa nižim nivoom 25(OH)D, manje podložni težim oblicima COVID-19. U slučaju varijante *CYP2R1 rs10741657*, nosioci alela koji je povezan sa sniženim nivoom 25(OH)D imali su veću verovatnoću za teži oblik COVID-19 [161]. Gen *CYP2R1* kodira enzim 25-hidroksilazu, koji transformiše holekalciferol u 25-hidroksivitamin D. Asocijacija varijante *CYP2R1 rs10741657* sa nivoom 25(OH)D je demonstrirana u brojnim studijama, pri čemu su nosioci genotipa GG imali najniže nivo 25(OH)D [157,159]. Ispitanici iz srpske populacije oboleli su od COVID-19 za vreme prvog talasa pandemije, u toku koje su na snazi bile mere delimične zabrane kretanja. U takvim uslovima, nivo cirkulišućeg 25(OH)D je najviše zavisio od ishrane i suplementacije a manje od sinteze u koži pod dejstvom UV-B zračenja. U tom slučaju bi uticaj varijanti u genu *DHCR7* na status vitamina D bio mali, a varijanti u *CYP2R1* dominantniji, čime se mogu objasniti uočene asocijacije.

U studiji koja je obuhvatala ispitanike iz Portugalije obolele od COVID-19, pokazano je da je varijanta *GC rs2282679* asocijirana sa težinom kliničke slike COVID-19 [162]. Gen *GC* kodira vitamin D-vezujući protein, glikoprotein koji se sintetiše u jetri, vezuje metabolite vitamina D i prenosi ih cirkulacijom do ciljnih organa. Druga studija je pokazala asocijaciju varijante *GC rs7041* sa prevalencom COVID-19 i stopom smrtnosti usled COVID-19 [163]. Nasuprot ovim rezultatima, studije bazirane na mendeljejevskom principu randomizacije koje su u obzir uzimale genetičke determinante statusa vitamina D za podelu u eksperimentalne grupe, nisu pokazale asocijaciju između nivoa vitamina D i po-

dložnosti ni težine bolesti kod obolelih od COVID-19 [145,164]. Važno je istaći da studije sa pristupom mendeljejevske randomizacije nisu uzele u obzir stvaran status vitamina D kod ispitanika, pa se ne može isključiti da bi suplementacija imala efekta kod deficijentnih/insuficijentnih osoba u ublažavanju simptoma COVID-19.

U poređenju sa vitaminom D, nutrigenetika cinka i selena u kontekstu COVID-19 je slabije istražena. Studija na srpskim pacijentima sa COVID-19 koja je ispitivala varijante u genima *DMGDH* i *PPCDC* nije pokazala asocijaciju ovih varijanti sa težim oblicima bolesti [161]. Nutrigenetika cinka je manje ispitana, a jedna velika GWAS identifikovala je nekoliko potencijalnih asocijacija, od kojih je varijanta u blizini *PPCDC* gena pokazala najjaču asocijaciju [158]. Pretходne velike GWAS asocijale su nivoe selena u krvi i noktima sa lokusom u blizini gena *DMGDH* [158,165,166]. U ovom lokusu se nalaze geni za enzime koji učestvuju u metabolizmu aminokiselina koje sadrže sumpor, između ostalog metionin i njemu analogni selenometionin, glavni oblik selena koji se unosi hranom. Pored varijanti identifikovanih u GWAS, brojne studije su pokazale asocijaciju između gena koji kodiraju selenoproteine, kao što su GPX1, GPX4 i SELENOP, i odgovora na suplementaciju selenom [167–169]. Varijante u ovim genima mogu biti kandidati za buduće studije vezane za odgovor na infekciju SARS-CoV-2 virusom.

Migracije i sredinski faktori su oblikovali genetičku arhitekturu bolesti u različitim populacijama, tako da se podložnost riziku za infektivne i hronične bolesti ne može generalizovati na sve populacije. Učestalosti nutrigenetičkih varijanti koje nose rizik od suboptimalnog nutritivnog statusa variraju u svetskim populacijama. Za varijantu *CYP2R1* rs10741657, potencijalno povezanu sa težim oblikom COVID-19, najniže frekvencije su zabeležene u srpskoj i finskoj populaciji (0,58), a najveća u afričkoj (0,73) [161]. Među evropskim subpopulacijama, rizična varijanta *CYP2R1* rs10741657 je najučestalija u italijanskoj i španskoj (0,66 i 0,69), populacijama koje su bile među najjače pogodjenim u prvom talasu pandemije COVID-19 [130,161]. Zanimljiva je izražena variabilnost *DHCR7* rs12785878 između svetskih populacija; najveća učestalost alela povezanog sa sniženim 25(OH)D uočena je u populaciji južne Azije (0,79), a najmanja u italijanskoj populaciji (0,22). Velika razlika u učestalosti ove varijante može biti znak skorašnjeg delovanja prirodne selekcije na datim lokusima u određenoj geografskoj oblasti. Pre migracije sa afričkog kontinenta, ljudi su bili izloženi UV-B zračenju svakodnevno, te su bili adaptirani na konstantno visok nivo vitamina D [170]. Kuan i saradnici sugerisu da variabilnost lokusa *DHCR7* predstavlja adaptaciju u metabolizmu vitamina D, zahvaljujući kojoj su rani savremeni ljudi uspeli da nasele severne predele sa malo UV-B sunčevog zračenja, a da ne razviju težak nedostatak vitamina D [171]. Smatra se da je alternativni alel doveo do smanjene aktivnosti enzima *DHCR7*, te je veća koncentracija 7-dehidrocolesterola ostala dostupna za konverziju u holekalciferol (vitamin D3). Tako je uprkos manjoj količini UV-B zračenja izbegnut nedostatak vitamina D na severnim geografskim širinama.

Da bi bilo izvodljivo praviti predikcije rizika za podložnost ka infektivnim bolestima, potrebne su opširnije studije koje bi uključile analizu većeg broja nutrigenetičkih varijanti u populacijama od interesa, ali i podatke o biohemiskim markerima statusa mikronutrijenata, zatim navikama u ishrani, kao i sredinskim i socioekonomskim faktorima kojima su te populacije izložene. Pored vitamina D, cinka i selena postoje i drugi mikronutrijenti čiji je status od izuzetne važnosti za imunokompetenciju, kao što su vitamin C, A, B6 i B12, zatim bakar i gvožđe, a čiji je nutritivni status u određenoj meri genetički uslovљen [130]. S obzirom na dostupnost modernih tehnologija koje imaju kapacitet analize celokupnih genoma, buduće sveobuhvatnije studije će svakako pokazati značaj nutrigenetike i personalizovane preventivne medicine u borbi protiv trenutne a i budućih pandemija.

ZAKLJUČAK

Multidisciplinarni pristup koji uključuje istraživače različitih (bio)medicinskih profila ujedinjenih oko rešavanja globalnog izazova, kako sprijeći pandemiju COVID-19 i omogućiti adekvatno lečenje pacijenta sa COVID-19, može, uz primenu modernih tehnologija koje omogućavaju sveobuhvatnu analizu genoma, transkriptoma, epigenoma, metaboloma i drugih "omika", da omogući sticanje novih saznanja o mehanizmu razvoja COVID-19 i o specifičnim genetičkim markerima čoveka odgovornim za različit spektar kliničke slike i tok same bolesti. Jedan od ključnih alata koji će omogućiti da se ova znanja bolje razumeju i implementiraju u kliničku praksu je razvoj bioinformaticke i dobra analiza samih podataka odnosno primena metoda mašinskog i dubokog učenja i napredne statistike. Tako bi mogao da se dizajnira populaciono specifični panel ili paneli gena, test koji bi se preventivno koristio a koji bi mogao da značajno pomogne u identifikaciji osoba osjetljivih na SARS-CoV-2 infekciju ili onih koje potencijano loše odgovaraju na terapiju ili imaju ozbiljne neželjene efekte zbog primene lekova. Tako bi se osobe izložene SARS-CoV-2 virusu zbog prirode posla ili osobe koje spadaju u osjetljivu kategoriju mogle preraspodeliti na poslove koji nose manji rizik od zaraze i tako zaštiti. Takođe bi identifikacija pacijenata sa potencijalno neželjenim reakcijama na lekove i one kojima bi suplementacija mikronutrijentima bila od koristi olakšala i ubrzala lečenje COVID-19 pacijenata. Time bi medicinska nauka bila korak bliže istinskom personalizovanom pristupu lečenja COVID-19 pacijenata.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020;580 (7803):E7.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382 (8):727-733.
3. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet* (London, England) 2015;386 (9997):995-1007.
4. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348 (20):1986-1994.
5. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmaeilzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med* 2021;23 (2):e3303.
6. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* (London, England) 2020;395 (10224):565-574.
7. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed* 2020;91 (1):157-160.
8. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* 2020;584 (7821):430-436.
9. Reddy RK, Charles WN, Sklavounos A, Dutt A, Seed PT, Khajuria A. The effect of smoking on COVID-19 severity: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* 2021;93 (2):1045-1056.
10. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines [Internet]. Published online 2021. Accessed August 1, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34003615/>
11. PLR A, W C, JA R, GJ S. COVID-19, nausea, and vomiting. *J Gastroenterol Hepatol* 2021;36 (3):646-656.
12. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol* 2021;93 (1):250-256.
13. Williams FMK, Freidin MB, Mangino M, Couvreur S, Visconti A, Bowyer RCE, et al. Self-Reported Symptoms of COVID-19, Including Symptoms Most Predictive of SARS-CoV-2 Infection, Are Heritable. *Twin Res Hum Genet* 2020;23 (6):316-321.
14. Kenney AD, Dowdle JA, Bozzacco L, McMichael TM, St Gelais C, Panfil AR, et al. Human Genetic Determinants of Viral Diseases. *Annu Rev Genet* 2017;51 :241-263.
15. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117 (21):11727-11734.
16. Kakodkar P, Kaka N, Baig MN. A Comprehensive Literature Review on the Clinical Presentation, and Management of the Pandemic Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Cureus* 2020;12 (4):e7560.
17. Umakanthan S, Sahu P, Ranade A V, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J* 2020;96 (1142):753-758.
18. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 2020;11 (1):1620.
19. Gomes CP, Fernandes DE, Casimiro F, da Mata GF, Passos MT, Varela P, et al. Cathepsin L in COVID-19: From Pharmacological Evidences to Genetics. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10 :589505.
20. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181 (2):271-280.e8.
21. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Van Lam van T, Pilgram O, Moulton H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci alliance* 2020;3 (9).
22. Yuan M, Wu NC, Zhu X, Lee C-CD, So RTY, Lv H, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 2020;368 (6491):630-633.
23. Hussain M, Jabeen N, Raza F, Shabbir S, Baig AA, Amanullah A, et al. Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. *J Med Virol* 2020;92 (9):1580-1586.
24. Cao Y, Li L, Feng Z, Wan S, Huang P, Sun X, et al. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Discov* 2020;6 (1):11.
25. Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* 2005;24 (8):1634-1643.
26. Benetti E, Tita R, Spiga O, Ciolfi A, Birolo G, Bruselles A, et al. ACE2 gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population. *Eur J Hum Genet* 2020;28 (11):1602-1614.
27. Suryamohan K, Diwanji D, Stawiski EW, Gupta R, Miersch S, Liu J, et al. Human ACE2 receptor polymorphisms and altered susceptibility to SARS-CoV-2. *Commun Biol* 2021;4 (1):475.
28. Pinto BGG, Oliveira AER, Singh Y, Jimenez L, Gonçalves ANA, Ogava RLT, et al. ACE2 Expression Is Increased in the Lungs of Patients With Comorbidities Associated With Severe COVID-19. *J Infect Dis* 2020;222 (4):556-563.
29. Pinto BGG, Oliveira AER, Singh Y, Jimenez L, Gonçalves ANA, Ogava RLT, et al. ACE2 Expression Is Increased in the Lungs of Patients With Comorbidities Associated With Severe COVID-19. *J Infect Dis* 2020;222 (4):556-563.
30. Xie X, Xudong X, Chen J, Junzhu C, Wang X, Xingxiang W, et al. Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung. *Life Sci* 2006;78 (19):2166-2171.
31. Asselta R, Paraboschi EM, Mantovani A, Duga S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. *Aging (Albany NY)* 2020;12 (11):10087-10098.

32. FitzGerald LM, Agalliu I, Johnson K, Miller MA, Kwon EM, Hurtado-Coll A, et al. Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. *BMC Cancer* 2008;8 :230.
33. Torre-Fuentes L, Matías-Guij J, Hernández-Lorenzo L, Montero-Escribano P, Pytel V, Porta-Etessam J, et al. ACE2, TMPRSS2, and Furin variants and SARS-CoV-2 infection in Madrid, Spain. *J Med Virol* 2021;93 (2):863-869.
34. Dahms SO, Arciniega M, Steinmetzer T, Huber R, Than ME. Structure of the unliganded form of the proprotein convertase furin suggests activation by a substrate-induced mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113 (40):11196-11201.
35. Russo R, Andolfo I, Lasorsa VA, Iolascon A, Capasso M. Genetic Analysis of the Coronavirus SARS-CoV-2 Host Protease TMPRSS2 in Different Populations. *Front Genet* 2020;11 :872.
36. Clinckemalie L, Spans L, Dubois V, Laurent M, Helsen C, Joniau S, et al. Androgen regulation of the TMPRSS2 gene and the effect of a SNP in an androgen response element. *Mol Endocrinol* 2013;27 (12):2028-2040.
37. Mohamed MS, Moulin TC, Schiöth HB. Sex differences in COVID-19: the role of androgens in disease severity and progression. *Endocrine* 2021;71 (1):3-8.
38. Ghosh S, Klein RS. Sex Drives Dimorphic Immune Responses to Viral Infections. *J Immunol* 2017;198 (5):1782-1790.
39. Ji H-L, Zhao R, Matalon S, Matthay MA. Elevated Plasmin(ogen) as a Common Risk Factor for COVID-19 Susceptibility. *Physiol Rev* 2020;100 (3):1065-1075.
40. Kam Y-W, Okumura Y, Kido H, Ng LFP, Bruzzone R, Altmeyer R. Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells in vitro. *PLoS One* 2009;4 (11):e7870.
41. Klaassen K, Stankovic B, Zukic B, Kotur N, Gasic V, Pavlovic S, et al. Functional prediction and comparative population analysis of variants in genes for proteases and innate immunity related to SARS-CoV-2 infection. *Infect Genet Evol* 2020;84 :104498.
42. Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Crooke SN, Poland GA, Kennedy RB. The role of host genetics in the immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 susceptibility and severity. *Immunol Rev* 2020;296 (1):205-219.
43. Langton DJ, Bourke SC, Lie BA, Reiff G, Natu S, Darlay R, et al. The influence of HLA genotype on the severity of COVID-19 infection. *HLA* 2021;98 (1):14-22.
44. Warren RL, Birol I. HLA predictions from the bronchoalveolar lavage fluid and blood samples of eight COVID-19 patients at the pandemic onset. *Bioinformatics* 2020;36 (21):5271-5273.
45. Nguyen A, David JK, Maden SK, Wood MA, Weeder BR, Nellore A, et al. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Virol* 2020;94 (13).
46. Campbell KM, Steiner G, Wells DK, Ribas A, Kalbasi A. Prediction of SARS-CoV-2 epitopes across 9360 HLA class I alleles. *bioRxiv Prepr Serv Biol* Published online April 1, 2020.
47. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillor A, Invernizzi P, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med* 2020;383 (16):1522-1534.
48. Zhao J, Yang Y, Huang H, Li D, Gu D, Lu X, et al. Relationship Between the ABO Blood Group and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Susceptibility. *Clin Infect Dis* 2021;73 (2):328-331.
49. He J, Feng D, de Vlas SJ, Wang H, Fontanet A, Zhang P, et al. Association of SARS susceptibility with single nucleic acid polymorphisms of OAS1 and MxA genes: a case-control study. *BMC Infect Dis* 2006;6 :106.
50. Tu X, Chong WP, Zhai Y, Zhang H, Zhang F, Wang S, et al. Functional polymorphisms of the CCL2 and MBL genes cumulatively increase susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect* 2015;71 (1):101-109.
51. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006;7 (2):85-94.
52. Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr HW. Treatment of SARS with human interferons. *Lancet (London, England)* 2003;362 (9380):293-294.
53. Rebouillat D, Hovanessian AG. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19 (4):295-308.
54. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020;370 (6515).
55. COVID-19 Host Genetics Initiative. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature* Published online July 8, 2021.
56. Dai J, Lv J, Zhu M, Wang Y, Qin N, Ma H, et al. Identification of risk loci and a polygenic risk score for lung cancer: a large-scale prospective cohort study in Chinese populations. *Lancet Respir Med* 2019;7 (10):881-891.
57. Manichaikul A, Wang X-Q, Sun L, Dupuis J, Borczuk AC, Nguyen JN, et al. Genome-wide association study of subclinical interstitial lung disease in MESA. *Respir Res* 2017;18 (1):97.
58. Gubernatorova EO, Gorshkova EA, Polinova AI, Drutskaya MS. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020;53 :13-24.
59. Ulhaq ZS, Soraya GV. Interleukin-6 as a potential biomarker of COVID-19 progression. *Med Mal Infect* 2020;50 (4):382-383.
60. Ulhaq ZS, Soraya GV. Anti-IL-6 receptor antibody treatment for severe COVID-19 and the potential implication of IL-6 gene polymorphisms in novel coronavirus pneumonia. *Med Clin (English ed)* 2020;155 (12):548-556.
61. Ulhaq ZS, Soraya GV. Anti-IL-6 receptor antibody treatment for severe COVID-19 and the potential implication of IL-6 gene polymorphisms in novel coronavirus pneumonia. *Med Clin (English ed)* 2020;155 (12):548-556.
62. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* 2020;135 (23):2033-2040.
63. Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood* 2020;136 (11):1317-1329.
64. Marian AJ. Current state of vaccine development and targeted therapies for COVID-19: impact of basic science discoveries. *Cardiovasc Pathol* 2021;50 :107278.
65. Mizzi C, Dalabiria E, Kumuthini J, Dzimiri N, Balogh I, Başak N, et al. A European Spectrum of Pharmacogenomic Biomarkers: Implications for Clinical Pharmacogenomics. *PLoS One* 2016;11 (9):e0162866.
66. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Gasic V, Lucafo M, Decorti G, et al. Clinical Application of Thiopurine Pharmacogenomics in Pediatrics. *Curr Drug Metab* 2020;21 (1):53-62.
67. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* 2020;323 (18):1824-1836.
68. Takahashi T, Luzum JA, Nicol MR, Jacobson PA. Pharmacogenomics of COVID-19 therapies. *NPJ genomic Med* 2020;5 (1):35.
69. Colson P, Rolain J-M, Lagier J-C, Brouqui P, Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020;55 (4):105932.

70. Pastick KA, Okafor EC, Wang F, Lofgren SM, Skipper CP, Nicol MR, et al. Review: Hydroxychloroquine and Chloroquine for Treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19). *Open forum Infect Dis* 2020;7 (4):ofaa130.
71. Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov* 2020;6 (1):16.
72. Basco LK, Ringwald P. In vitro activities of piperaquine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47 (4):1391-1394.
73. Sortica VA, Lindenau JD, Cunha MG, O Ohnishi MD, R Ventura AM, Ribeiro-Dos-Santos ÅK, et al. SLCO1A2, SLCO1B1 and SLCO2B1 polymorphisms influences chloroquine and primaquine treatment in *Plasmodium vivax* malaria. *Pharmacogenomics* 2017;18 (15):1393-1400.
74. Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Whaley R, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther* Published online July 3, 2021.
75. Tehrani R, Ostrowski RA, Hariman R, Jay WM. Ocular toxicity of hydroxychloroquine. *Semin Ophthalmol* 2008;23 (3):201-209.
76. Sahraei Z, Shabani M, Shokouhi S, Saffaei A. Aminoquinolines against coronavirus disease 2019 (COVID-19): chloroquine or hydroxychloroquine. *Int J Antimicrob Agents* 2020;55 (4):105945.
77. Kalil AC. Treating COVID-19-Off-Label Drug Use, Compassionate Use, and Randomized Clinical Trials During Pandemics. *JAMA* 2020;323 (19):1897-1898.
78. The haemolytic effect of various regimens of primaquine with chloroquine in American Negroes with G6PD deficiency and the lack of an effect of various antimalarial suppressive agents on erythrocyte metabolism - PubMed. Accessed August 1, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4864652/>
79. Lee JY, Vinayagamoorthy N, Han K, Kwok SK, Ju JH, Park KS, et al. Association of Polymorphisms of Cytochrome P450 2D6 With Blood Hydroxychloroquine Levels in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken, NJ) 2016;68 (1):184-190.
80. Sortica VA, Lindenau JD, Cunha MG, Ohnishi M DO, Ventura AMR, Ribeiro-Dos-Santos ÅK, et al. The effect of SNPs in CYP450 in chloroquine/primaquine *Plasmodium vivax* malaria treatment. *Pharmacogenomics* 2016;17 (17):1903-1911.
81. Grassmann F, Bergholz R, Mändl J, Jägle H, Ruether K, Weber BHF. Common synonymous variants in ABCA4 are protective for chloroquine induced maculopathy (toxic maculopathy). *BMC Ophthalmol* 2015;15 (1):18.
82. Stanković B, Kotur N, Gašić V, Klaassen K, Ristivojević B, Stojiljković M, et al. Pharmacogenomics landscape of COVID-19 therapy response in Serbian population and comparison with worldwide populations. *J Med Biochem* 2020;39 (4):488-499.
83. Bacharier LB, Guilbert TW, Mauger DT, Boehmer S, Beigelman A, Fitzpatrick AM, et al. Early Administration of Azithromycin and Prevention of Severe Lower Respiratory Tract Illnesses in Preschool Children With a History of Such Illnesses: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2015;314 (19):2034-2044.
84. He X-J, Zhao L-M, Qiu F, Sun Y-X, Li-Ling J. Influence of ABCB1 gene polymorphisms on the pharmacokinetics of azithromycin among healthy Chinese Han ethnic subjects. *Pharmacol Rep* 2009;61 (5):843-850.
85. Gautret P, Lagier J-C, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents* 2020;56 (1):105949.
86. Gautret P, Lagier J-C, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Sevestre J, et al. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID-19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study. *Travel Med Infect Dis* 2020;34:101663.
87. Molina JM, Delaugerre C, Le Goff J, Mela-Lima B, Ponscarme D, Goldwirt L, et al. No evidence of rapid antiviral clearance or clinical benefit with the combination of hydroxychloroquine and azithromycin in patients with severe COVID-19 infection. *Med Mal Infect* 2020;50 (4):384.
88. Li G, De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat Rev Drug Discov* 2020;19 (3):149-150.
89. de Wilde AH, Jochmans D, Posthuma CC, Zevenhoven-Dobbe JC, van Nieuwkoop S, Bestebroer TM, et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58 (8):4875-4884.
90. Chan JF-W, Yao Y, Yeung M-L, Deng W, Bao L, Jia L, et al. Treatment With Lopinavir/Ritonavir or Interferon- β 1b Improves Outcome of MERS-CoV Infection in a Nonhuman Primate Model of Common Marmoset. *J Infect Dis* 2015;212 (12):1904-1913.
91. Eagling VA, Back DJ, Barry MG. Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44 (2):190-194.
92. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;72 (2):317-364, table of contents.
93. Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, et al. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 1999;274 (24):17159-17163.
94. Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020;382 (19):1787-1799.
95. Wu J, Li W, Shi X, Chen Z, Jiang B, Liu J, et al. Early antiviral treatment contributes to alleviate the severity and improve the prognosis of patients with novel coronavirus disease (COVID-19). *J Intern Med* 2020;288 (1):128-138.
96. Feeney ER, Mallon PWG. HIV and HAART-Associated Dyslipidemia. *Open Cardiovasc Med J* 2011;5 (1):49-63.
97. Montessori V, Press N, Harris M, Akagi I, Montaner JSG. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ* 2004;170 (2):229-238. Accessed August 2, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14734438/>
98. King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 2000;1 (2):143-161.
99. Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 2002;3 (6):561-597.
100. Khetarpal SA, Zeng X, Millar JS, Vitali C, Somasundara AVH, Zanoni P, et al. A human APOC3 missense variant and monoclonal antibody accelerate apoC-III clearance and lower triglyceride-rich lipoprotein levels. *Nat Med* 2017;23 (9):1086-1094.
101. Phillips MC. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life* 2014;66 (9):616-623.
102. Aspiroz EL, Cabrera Figueroa SE, Cruz R, Porras Hurtado GL, Martín AF, Hurlé AD-G, et al. Toxicogenetics of lopinavir/ritonavir in HIV-infected European patients. *Per Med* 2014;11 (3):263-272.
103. Bhimraj A, Morgan RL, Shumaker AH, Lavergne V, Baden L, Cheng VC-C, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19. *Clin Infect Dis* Published online April 27, 2020.
104. Moltó J, Xinarianos G, Miranda C, Pushpakom S, Cedeño S, Clotet B, et al. Simultaneous pharmacogenetics-based population pharmacokinetic analysis of darunavir and ritonavir in HIV-infected patients. *Clin Pharmacokinet* 2013;52 (7):543-553.
105. Link J, Lundkvist Ryner M, Fink K, Hermanrud C, Lima I, Brynedal B, et al. Human leukocyte antigen genes and interferon beta preparations influence risk of developing neutralizing anti-drug antibodies in multiple sclerosis. *PLoS One* 2014;9 (3):e90479.

106. Kowalec K, Wright GEB, Drögemöller BI, Aminkeng F, Bhavsar AP, Kingwell E, et al. Common variation near IRF6 is associated with IFN- β -induced liver injury in multiple sclerosis. *Nat Genet* 2018;50 (8):1081-1085.
107. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)* 2020;395 (10223):497-506.
108. Jiménez Morales A, Maldonado-Montoro M, Martínez de la Plata JE, Pérez Ramírez C, Daddaoua A, Alarcón Payer C, et al. FCGR2A/FCGR3A Gene Polymorphisms and Clinical Variables as Predictors of Response to Tocilizumab and Rituximab in Patients With Rheumatoid Arthritis. *J Clin Pharmacol* 2019;59 (4):517-531.
109. Maldonado-Montoro M, Cañadas-Garre M, González-Utrilla A, Ángel Calleja-Hernández M. Influence of IL6R gene polymorphisms in the effectiveness to treatment with tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J* 2018;18 (1):167-172.
110. Maldonado-Montoro M, Cañadas-Garre M, González-Utrilla A, Plaza-Plaza JC, Calleja-Hernández M. Genetic and clinical biomarkers of tocilizumab response in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res* 2016;111:264-271.
111. Elfiky AA. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life Sci* 2020;248:117477.
112. Allegra S, Cusato J, De Nicolò A, Boglione L, Gatto A, Cariti G, et al. Role of pharmacogenetic in ribavirin outcome prediction and pharmacokinetics in an Italian cohort of HCV-1 and 4 patients. *Biomed Pharmacother* 2015;69:47-55.
113. D'Avolio A, Cusato J, De Nicolò A, Allegra S, Di Perri G. Pharmacogenetics of ribavirin-induced anemia in HCV patients. *Pharmacogenomics* 2016;17 (8):925-941.
114. D'P-T, M G-A, MA J-S, SV-M, S R. Relationship between ITPA polymorphisms and hemolytic anemia in HCV-infected patients after ribavirin-based therapy: a meta-analysis. *J Transl Med* 2015;13 (1).
115. Burrows FS, Carlos LM, Benzmira M, Marriott DJE, Havryk AP, Plit ML, et al. Oral ribavirin for respiratory syncytial virus infection after lung transplantation: Efficacy and cost-efficiency. *J Heart Lung Transplant* 2015;34 (7):958-962.
116. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet* 2011;20 (17):3507-3516.
117. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009;41 (10):1100-1104.
118. Omrani AS, Saad MM, Baig K, Bahloul A, Abdul-Matin M, Alaidaroos AY, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2014;14 (11):1090-1095.
119. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461 (7265):798-801.
120. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med* 2020;383 (19):1813-1826.
121. Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, Marks KM, Bruno R, Montejano R, et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020;383 (19):1827-1837.
122. Madelain V, Nguyen THT, Olivo A, de Lamballerie X, Guedj J, Taburet A-M, et al. Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. *Clin Pharmacokinet* 2016;55 (8):907-923.
123. Beedham C. Aldehyde oxidase; new approaches to old problems. *Xenobiotica* 2020;50 (1):34-50.
124. Sangkuhl K, Claudio-Campos K, Cavallari LH, Agundez JAG, Whirl-Carrillo M, Duconge J, et al. PharmVar GeneFocus: CYP2C9. *Clin Pharmacol Ther* Published online June 10, 2021.
125. Yee SW, Nguyen AN, Brown C, Savic RM, Zhang Y, Castro RA, et al. Reduced renal clearance of cefotaxime in asians with a low-frequency polymorphism of OAT3 (SLC22A8). *J Pharm Sci* 2013;102 (9):3451-3457.
126. Song Q-Q, Xie W-Y, Tang Y-J, Zhang J, Liu J. Genetic variation in the glucocorticoid pathway involved in interindividual differences in the glucocorticoid treatment. *Pharmacogenomics* 2017;18 (3):293-316.
127. Wang L-Y, Cui J-J, OuYang Q-Y, Zhan Y, Wang Y-M, Xu X-Y, et al. Genetic Profiles in Pharmacogenes Indicate Personalized Drug Therapy for COVID-19. *medRxiv* Published online March 30, 2020;2020.03.23.20041350.
128. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res* 2020;30 (3):269-271.
129. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French T-A, Tai ES, et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4 (2):69-89.
130. Galmés S, Serra F, Palou A. Current state of evidence: Influence of nutritional and nutrigenetic factors on immunity in the COVID-19 pandemic framework. *Nutrients* 2020;12 (9):1-33.
131. Alexander J, Tinkov A, Strand TA, Alehagen U, Skalny A, Aaseth J. Early nutritional interventions with zinc, selenium and vitamin D for raising anti-viral resistance against progressive COVID-19. *Nutrients* 2020;12 (8):1-12.
132. Helming L, Böse J, Ehrchen J, Schiebe S, Frahm T, Geffers R, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon γ -mediated macrophage activation. *Blood* 2005;106 (13):4351-4358.
133. Martín Giménez VM, Inserra F, Tajar CD, Mariani J, Ferder L, Reiter RJ, et al. Lungs as target of COVID-19 infection: Protective common molecular mechanisms of vitamin D and melatonin as a new potential synergistic treatment. *Life Sci* 2020;254:117808.
134. Sanz R, Mazzei L, Santino N, Ingrasia M, Manucha W. Vitamin D-mitochondria cross-talk could modulate the signaling pathway involved in hypertension development: a translational integrative overview. *Clin Investig Arterioscler* 32 (4):144-155.
135. Xu J, Yang J, Chen J, Luo Q, Zhang Q, Zhang H. Vitamin D alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulation of the renin-angiotensin system. *Mol Med Rep* 2017;16 (5):7432-7438.
136. Rahman MT, Iddi SZ. Can Zn Be a Critical Element in COVID-19 Treatment? *Biol Trace Elem Res* 2021;199 (2):550-558.
137. Brewer J, Gomez Marti JL, Brufsky A. Potential interventions for SARS-CoV-2 infections: Zinc showing promise. *J Med Virol* 2021;93 (3):1201-1203.
138. Iddir M, Brito A, Dingeo G, Fernandez Del Campo SS, Samouda H, La Frano MR, et al. Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. *Nutrients* 2020;12 (6).
139. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet (London, England)* 2012;379 (9822):1256-1268.
140. Zhang L, Liu Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. *J Med Virol* 2020;92 (5):479-490.
141. Panagiotou G, Tee SA, Ihsan Y, Athar W, Marchitelli G, Kelly D, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels in patients hospitalized with COVID-19 are associated with greater disease severity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2020;93 (4):508-511.
142. Grant WB, Cross HS, Garland CF, Gorham ED, Moan J, Peterlik M, et al. Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic

- burden of disease in western Europe. *Prog Biophys Mol Biol* 99 (2-3):104-113.
- 143. Ilie PC, Stefanescu S, Smith L. The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality. *Aging Clin Exp Res* 2020;32 (7):1195-1198.
 - 144. Rhodes JM, Subramanian S, Laird E, Kenny RA. Editorial: low population mortality from COVID-19 in countries south of latitude 35 degrees North supports vitamin D as a factor determining severity. *Aliment Pharmacol Ther* 2020;51 (12):1434-1437.
 - 145. Butler-Laporte G, Nakanishi T, Mooser V, Morrison DR, Abdullah T, Adeleye O, et al. Vitamin D and Covid-19 susceptibility and severity: A Mendelian Randomization study. *medRxiv* Published online December 22, 2020:2020.09.08.20190975.
 - 146. Jothimani D, Kailasam E, Danielraj S, Nallathambi B, Ramachandran H, Sekar P, et al. COVID-19: Poor outcomes in patients with zinc deficiency. *Int J Infect Dis* 2020;100 :343-349.
 - 147. Im JH, Je YS, Baek J, Chung MH, Kwon HY, Lee JS. Nutritional status of patients with COVID-19. *Int J Infect Dis* 2020;100 :390-393.
 - 148. Moghaddam A, Heller RA, Sun Q, Seelig J, Cherkezov A, Seibert L, et al. Selenium deficiency is associated with mortality risk from COVID-19. *Nutrients* 2020;12 (7):1-13.
 - 149. Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, Gonzalez-Gross M, Valtueña J, De Henauw S, et al. Vitamin D deficiency in Europe: Pandemic? *Am J Clin Nutr* 2016;103 (4):1033-1044.
 - 150. Lips P, Cashman KD, Lamberg-Allardt C, Bischoff-Ferrari HA, Obermayer-Pietsch B, Bianchi ML, et al. Current Vitamin D status in European and Middle East countries and strategies to prevent Vitamin D deficiency: A position statement of the European Calcified Tissue Society. *Eur J Endocrinol* 2019;180 (4):P23-P54.
 - 151. Wessells KR, Brown KH. Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. *PLoS One* 2012;7 (11).
 - 152. Jagodić J, Rovčanin B, Borković-Mitić S, Vujotić L, Avdin V, Manojlović D, et al. Possible zinc deficiency in the Serbian population: examination of body fluids, whole blood and solid tissues. *Environ Sci Pollut Res Int* Published online April 24, 2021.
 - 153. Stoffaneller R, Morse NL. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. *Nutrients* 2015;7 (3):1494-1537.
 - 154. Pavlovic Z, Miletic I, Zekovic M, Nikolic M, Glibetic M. Impact of Selenium Addition to Animal Feeds on Human Selenium Status in Serbia. *Nutrients* 2018;10 (2).
 - 155. Jiang X, O'Reilly PF, Aschard H, Hsu Y-H, Richards JB, Dupuis J, et al. Genome-wide association study in 79,366 European-ancestry individuals informs the genetic architecture of 25-hydroxyvitamin D levels. *Nat Commun* 2018;9 (1):260.
 - 156. Moy KA, Mondul AM, Zhang H, Weinstein SJ, Wheeler W, Chung CC, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D-binding protein. *Am J Clin Nutr* 2014;99 (6):1424-1431.
 - 157. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, Van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: A genome-wide association study. *Lancet* 2010;376 (9736):180-188.
 - 158. Evans DM, Zhu G, Dy V, Heath AC, Madden PAF, Kemp JP, et al. Genome-wide association study identifies loci affecting blood copper, selenium and zinc. *Hum Mol Genet* 2013;22 (19):3998-4006.
 - 159. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Claire Simon K, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010;19 (13):2739-2745.
 - 160. Manousaki D, Mitchell R, Dudding T, Haworth S, Harroud A, Forgetta V, et al. Genome-wide Association Study for Vitamin D Levels Reveals 69 Independent Loci. *Am J Hum Genet* 2020;106 (3):327-337.
 - 161. Kotur N, Skakic A, Klaassen K, Gasic V, Zukic B, Skodric-Trifunovic V, et al. Association of Vitamin D, Zinc and Selenium Related Genetic Variants With COVID-19 Disease Severity. *Front Nutr* 2021;8 :689419.
 - 162. Freitas AT, Calhau C, Antunes G, Araújo B, Bandeira M, Barreira S, et al. Vitamin D-related polymorphisms and vitamin D levels as risk biomarkers of COVID-19 infection severity. *medRxiv* Published online 2021.
 - 163. Karcioğlu Batur L, Hekim N. The role of DBP gene polymorphisms in the prevalence of new coronavirus disease 2019 infection and mortality rate. *J Med Virol* 2021;93 (3):1409-1413.
 - 164. Amin HA, Drenos F. No evidence that vitamin D is able to prevent or affect the severity of COVID-19 in individuals with European ancestry: a Mendelian randomisation study of open data. *BMJ Nutr Prev Heal* Published online 2021.
 - 165. Cornelis MC, Fornage M, Foy M, Xun P, Gladyshev VN, Morris S, et al. Genome-wide association study of selenium concentrations. *Hum Mol Genet* 2015;24 (5):1469-1477.
 - 166. Batai K, Trejo MJ, Chen Y, Kohler LN, Lance P, Ellis NA, et al. Genome-Wide Association Study of Response to Selenium Supplementation and Circulating Selenium Concentrations in Adults of European Descent. *J Nutr* 2021;151 (2):293-302.
 - 167. Donadio JLS, Rogero MM, Guerra-Shinohara EM, Barbosa F, Desmarchelier C, Borel P, et al. Genetic variants in selenoprotein genes modulate biomarkers of selenium status in response to Brazil nut supplementation (the SU.BRA.NUT study). *Clin Nutr* 2019;38 (2):539-548.
 - 168. Combs GF, Jackson MI, Watts JC, Johnson LAK, Zeng H, Idso J, et al. Differential responses to selenomethionine supplementation by sex and genotype in healthy adults. *Br J Nutr* 2012;107 (10):1514-1525.
 - 169. Méplan C, Crosley LK, Nicol F, Horgan GW, Mathers JC, Arthur JR, et al. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: Interaction with sex. *Am J Clin Nutr* 2008;87 (4):1019-1027.
 - 170. Luxwolda MF, Kuipers RS, Kema IP, Dijck-Brouwer DAJ, Muskiet FAJ. Traditionally living populations in East Africa have a mean serum 25-hydroxyvitamin D concentration of 115 nmol/l. *Br J Nutr* 2012;108 (9):1557-1561.
 - 171. Kuan V, Martineau AR, Griffiths CJ, Hyppönen E, Walton R. DHCR7 mutations linked to higher vitamin D status allowed early human migration to Northern latitudes. *BMC Evol Biol* 2013;13 (1).

Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa

Mila Djisalov¹, Teodora Knežić¹, Ljiljana Janjušević¹, Željko D. Popović², Petar Kosijer¹, Ivana Gadjanski¹

¹Univerzitet u Novom Sadu, Institut Biosens, Novi Sad, Srbija

²Univerzitet u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija

Kontakt: igadjanski@biosense.rs

Apstrakt

Pravovremeno testiranje većeg broja ljudi na SARS-CoV-2 virus je povezano sa nižim mortalitetom od COVID-19 oboljenja. Međutim, većina zemalja nema mogućnosti za takvo masivno testiranje putem metode "PCR u realnom vremenu", zbog visoke cene neophodne opreme i potrebe za stručnim osobljem. Zbog toga se razvijaju brze i ekonomičnije metode, koje se najčešće zasnivaju na izotermalnim metodama amplifikacije DNK. Za ove metode nije potreban ciklični termostat, zbog čega su primenljivije za terensku upotrebu. Fokus je na **izotermalnoj amplifikaciji posredovanju petljom (LAMP)**, zbog njene visoke specifičnosti, mogućnosti za upotrebu neprečišćenih uzoraka i jednostavnosti merenja signala. Autori predstavljaju pregled najvažnijih radova o LAMP metodi za detekciju SARS-CoV-2 virusa objavljenih tokom 2020. godine, kao i opise nekoliko komercijalnih kompleta na bazi LAMP metode za COVID-19 testiranje.

Ključne reči: izotermalna amplifikacija, LAMP, terenska detekcija, SARS-CoV-2, COVID-19

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method

Mila Djisalov¹, Teodora Knežić¹, Ljiljana Janjusevic¹, Željko D. Popović², Petar Kosijer¹, Ivana Gadjanski¹

¹University of Novi Sad, BioSense Institute, Novi Sad, Serbia

²University of Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Novi Sad, Serbia

Correspondence: igadjanski@biosense.rs

Abstract

Massive testing for SARS-CoV-2 virus is related to lower mortality rates of COVID-19. Most countries face challenges to perform massive testing with the currently available methods (real-time PCR), due to expensive equipment and requirement of highly skilled personnel. To overcome these challenges, faster and cost-effective alternative detection methods are being developed, primarily based on isothermal methods of nucleic acid amplification (isoNAAs). PCR depends on precision instruments, high cleanliness of operating conditions and cannot be easily used on-site, while isoNAAs, which do not require thermal cyclers, are more applicable for point-of-care (PoC) use. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is one of the isoNAA most in focus for COVID-19 tests due to its high specificity and possibility to use unpurified specimens in combination with simplified detection setup. The article gives a review of the most significant publications on use of LAMP for SARS-CoV-2 detection and of the several commercial LAMP-based COVID-19 testing kits.

Keywords: isothermal amplification, LAMP, point-of-care detection, SARS-CoV-2, COVID-19

KRATAK OSVRT NA KLASIČNI PCR

Lančana reakcija polimeraze, poznatija kao PCR (od engl. polymerase chain reaction) je metoda koju je opisao dr Keri B. Malis (Kary B. Mullis) 1985. godine. Zbog njenog ogromnog uticaja na razvoj molekularne biologije, ali i sveukupne nauke, dr Malis je 1993. dobio Nobelovu nagradu za hemiju, upravo za otkriće PCR metode.

Klasični PCR i danas sadrži vrlo slične komponente reakcije, čiji kvalitativni sastav se nije mnogo menjao u proteklih 36 godina, od kada je prvi put opisan i u njih ubrajamo: pufer, $MgCl_2$, dezoksinukleozid-trifosfate (engl. deoxyribose nucleotide triphosphate, dNTP), levu i desnu početnicu (prajmer, od engl. primer), *Taq* polimerazu i matricu koja se umnožava. Biohemijska reakcija umnožavanja matrice se odvija u ponavljajućim ciklusima koji se sastoje od po tri osnovna koraka sa različitim temperaturnima uslovima koji pogoduju: *denaturaciju DNK* (94–95 °C), *vezivanju početnica* (45–65 °C) i *sinthezi novog lanca* (oko 72 °C). S obzirom na to da se uspešnost PCR reakcije proverava tek po njenom završetku, elektroforetskim razdvajanjem i bojenjem gela radi vizualizacije produkata PCR reakcije na gelu, klasični PCR i sve iz njega izvedene PCR metode grupišu se u tzv. *endpoint PCR metode*. Umnožavanje nukleinskih kiselina (NK) klasičnom PCR metodom je vrlo brzo našlo upotrebu u medicinskoj i veterinarskoj dijagnostici, stvarajući izdvojenu granu molekularne biologije – molekularnu dijagnostiku. Međutim, postoji nekoliko mana korišćenja klasičnog PCR, kao endpoint metode, u molekularnoj dijagnostici. Prva je da se njegova osetljivost zasniva na detekciji umnožaka na gelu, druga je da se zbog otvaranja reakcione smeše posle PCR reakcije, kako bi se deo smeše naneo na gel, stvara veliki rizik, kako za zagađenje uzoraka, tako i radne okoline, treća je neophodnost fotografisanja gelova, njihova analiza i čuvanje radi stvaranja foto-archive. Pored toga što je PCR vrlo prihvaćena i danas široko korišćena metoda, u klasičnom PCR-u je dolazilo i do izmena zbog različitih vrsta uzoraka koji se umnožavaju, vrsta bioloških materijala, svrhe korišćenja dobijenog PCR proizvoda, kao i do unapređenja zbog razvoja novih (bio)tehnologija, te zato danas imamo veliki broj sličnih metoda koje se zasnivaju na izmenjenoj klasičnoj PCR reakciji npr. reverzno-transkripcioni PCR (RT-PCR), RACE PCR (engl. rapid amplification of cDNA ends), NESTED PCR, metilaciono specifični PCR, droplet digital PCR (ddPCR), PCR u realnom vremenu/kvantitativni PCR (engl. Real Time PCR, qPCR, quantitative real time – QRT-PCR) i dr.

PCR U REALNOM VREMENU (KVANTITATIVNI PCR, KVANTITATIVNI REVERZNO-TRANSKRIPCIONI PCR)

Jedna od možda najznačajnijih prekretnica u primeni klasičnog PCR-a bilo je uvođenje praćenja umnožavanja DNK u realnom vremenu putem beleženja promene intenziteta fluorescencije, koja je poticala od fluorescentne boje koja se vezivala za umnoške DNK u reakcionaloj smeši [1,2]. Ovaj novi metod koji je nazvan PCR u realnom vremenu (*Real Time PCR*), poznat je i kao kvantitativni PCR (qPCR) i vrlo često je pogrešno označavan u stručnoj literaturi kao RT-PCR, skraćenica koja se odnosi na PCR zasnovan na povratnoj/reverznoj transkripciji. PCR u realnom vremenu je vrlo brzo postao dominantan u molekularnoj dijagnostici, naročito za otkrivanje, kvantifikaciju i tipizaciju različitih mikrobioloških patogena, kako u oblastima kliničke i veterinarske dijagnostike, tako i bezbednosti hrane [3]. Princip PCR metode u realnom vremenu zasniva se na činjenici da se proces umnožavanja NK prati tokom svakog PCR ciklusa, a kako bi se to postiglo koriste se različiti pristupi detekcije umnoška: *nespecifični* – upotrebom fluorescentnih boja npr. SYBR Green, Eva Green i sl, koje se vezuju za dvostruku DNK ili *specifični* – korišćenjem kombinacijama početnica i/ili proba koje su obeležene fluoroforom koja će biti ekscitirana svetlošću posle njenog hibridizovanja po principu komplementarnosti sa cilnjim regionom NK, što ujedno i čini ovaj pristup detekcije signala specifičnim. Zbog toga što je neophodno beleženje svetlosnog signala tokom PCR reakcije, za sprovođenje PCR-a u realnom vremenu su neophodni aparati koji imaju dodatne osobine u odnosu na klasični PCR aparat. Naime, neophodno je postojanje optičkog modula pomoću koga je omogućeno ozračivanje reakcije radi pobuđivanja fluorescencije koja se posle beleži i predstavlja kao grafik zavisnosti promene fluorescencije od broja ciklusa tj. grafik umnožavanja proizvoda u PCR reakciji.

Uzimajući u obzir da svi fluorogeni supstrati odaju svetlost u određenoj meri, čak i kada nisu pobuđeni, tokom PCR-a u realnom vremenu uvek postoji određena količina *pozadinske fluorescencije* (engl. background fluorescence). Pozadinskom fluorescencijom se podrazumeva sva ona fluorescencija koja se beleži u prvih 10-15 ciklusa PCR-a, te se zbog nje određuje nivo *granične fluorescencije* (engl. threshold fluorescence) koji se mora dostići tokom PCR reakcije da bi se smatralo da fluorescencija potiče od umnožaka nastalih tokom PCR reakcije i to u uzlaznom delu njene eksponencijalne faze. Stoga, upravo onaj ciklus u kome se probije vrednost granične fluorescencije naziva se Ct ili Cq vrednost (od engl. cycle threshold, cycle of quantification) i ona predstavlja kvantitativnu vrednost PCR reakcije, ali je ujedno i kvalitativni pokazatelj uspešnosti PCR reakcije u realnom vremenu. Dodatno, kako je Ct/Cq vrednost obrnuto srazmerna početnoj količini genetičkog materijala u PCR reakciji, ona se može koristiti kako za kvantitativnu procenu ili pak određivanje apsolutne količine NK u ispitivanom materijalu. Stoga se PCR u realnom vremenu, zbog svojih prednosti, koristi u naučnim studijama kako za validaciju npr. polukvantitativnih metoda kao što je mikroerej [4,5], tako i u analizi relativne ili apsolutne ekspresije gena različitih model organizama ili model sistema [6–8].

Kvantitativni aspekt PCR-a u realnom vremenu je upravo ono što mu je dalo veliki značaj i u mikrobiološkoj dijagnostici [3], naročito u ranom otkrivanju virusnih patogena (npr. HIV, HCV i dr.) ili drugih obligatornih intracelularnih organizama (npr. *Chlamydia trachomatis* i dr.) u različitim tečnim biološkim materijalima (krv, urin, sperma, pljuvačka, likvor, želudačni sok i dr.) ili brisevima (npr. tipizacija visokorizičnih onkogenih tipova HPV-a, tipizacija HSV i sl.). Osim u mikrobiološkoj dijagnostici, ova metoda ima i široku upotrebu i u molekularnoj genetici i citogenetici, za analizu prisustva tačkastih mutacija, aneuploidija i dr., kao i u biotehnološkim i farmaceutskim studijama koje zahtevaju kvantifikaciju količine genetičkog materijala.

Apsolutna kvantifikacija NK u uzorku je omogućena pomoću kalibracione krive koja se predstavlja kao grafik zavisnosti Ct/Cq vrednosti od serijskih razblaženja standardnih uzoraka (obično decimalnih razblaženja) sa poznatim koncentracijama ili brojevima kopija NK [9].

Iako je upotreba Real Time PCR metode u dijagnostici rutinska i mnogima deluje jednostavno, u praksi postoje specifični problemi koje korisnici ove tehnologije moraju imati na umu. Tu pre svih spadaju razumevanje principa PCR-a, upotreba ispravne terminologije i tačnih definicija, poteškoće sa upotrebotom složene opreme, tumačenjem i predstavljanjem podataka, različita ograničenja qPCR u oblasti mikrobiološke dijagnostike, kao i dobro poznavanje parametara koji su važni za kvalitativni i kvantitativni opis performansi Real Time PCR-a.

UPOTREBA PCR-a U REALNOM VREMENU U DIJAGNOSTICI SARS-CoV-2 (COVID-19)

Koronavirusi pripadaju grupi RNK virusa sa pozitivnim lancima. Virus SARS-CoV-2 (*engl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) pripada familiji *Coronaviridae*, potfamiliji *Coronavirinae* i rodu *Betacoronavirus*. Genom SARS-CoV-2 je veličine oko 29,9 kb i sastoji se od nekoliko gena koji kodiraju nestruktурне, strukturne i pomoćne proteine. Najveći gen je ORF1ab i on sadrži preklapajuće otvorene okvire čitanja koji kodiraju poliproteine PP1ab i PP1a. Poliproteini se isecaju dajući 16 nestrukturnih proteina koji, zasnovani na sličnosti sa drugim koronavirusima, uključuju (između ostalih nestrukturnih proteina) i RNK-zavisnu RNK polimerazu (RdRp) i 2'-O-riboza-metiltransferazu [10].

Molekularna dijagnostika COVID-19 zasniva se na specifičnoj i osetljivoj detekciji ribonukleinske kiseline (RNK) ovog virusa. Smatra se da su metode zasnovane na kombinaciji RT-PCR i qPCR najtačnije za otkrivanje prisustva SARS-CoV-2 virusa i predstavljaju „zlatni standard“ dijagnostike ovog patogena [11,12]. Dijagnostičke reakcije mogu biti postavljane ili *u dva koraka (dvostepene)*, kada se prvo postavlja RT-PCR, a posle toga se sprovodi qPCR u drugoj, nezavisnoj reakciji, ili pak postavljane *u jednom koraku (jednostepene)*, kada se sinteza cDNK (RT-PCR) i qPCR odvijaju u jednoj istoj reakcionalnoj smeši, ali u dva vremenski povezana i temperaturno prilagođena programa. U slučaju jednostepene reakcije, ovakvu vrstu PCR metode je najpravilnije nazivati *kvantitativni reverzno-transkripcioni PCR* skraćeno *QRT-PCR* (od *engl. quantitative reverse transcription PCR*).

Uvidom u internet repozitorijum organizacije FIND – Foundation for Innovative New Diagnostics (<https://www.finddx.org/test-directory/>, na dan 12. 07. 2021), trenutno postoji registrovano 649 različitih vrsta dijagnostičkih testova na SARS-CoV-2 virus, od kojih su 202 molekularna testa zasnovana na qPCR metodi. Na tržištu su dostupne različite QRT-PCR platforme, od kojih su pojedine navedene u **Tabeli 1**.

U najvećem broju slučajeva, QRT-PCR omogućava otkrivanje nekoliko specifičnih gena koji kodiraju strukturne proteine virusa: E protein ovojnice (E od *engl. envelop*), N protein nukleokapsida, S protein šiljka (S od *engl. spike*) i/ili pak nestruktурне proteine - enzime RNK-zavisnu RNK polimerazu (RdRp, *engl. RNA-dependent RNA polymerase*) i 2'-O-metiltransferazu, obe kodirane od strane velikog ORF1ab gena. Gen E nosi informacije za stvaranje proteina u ovojnici, koji imaju svi koronavirusi. Gen N kodira multifunkcionalni N protein, koji indukuje snažan imunološki odgovor i učestvuje u virusnoj replikaciji. Enzim RdRp se prevodi posle oslobođanja virusne RNK u ćeliji domaćina i igra ulogu u umnožavanju genetičkog materijala virusa unutar ćelije, kao i enzim 2'-O-metiltransferaza, dok su ostali nestrukturni proteini SARS-CoV-2 prepisivani sa ORF1ab gena odgovorni za virusnu transkripciju, replikaciju, proteolitičku obradu, ali i suzbijanje imunoloških odgovora domaćina i suzbijanje ekspresije gena domaćina (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1489680>).

Pokazano je da najveću osetljivost i pouzdanost imaju one metode koje uključuju detekciju ORF1ab gena i N gena zajedno, a da najlošiju osetljivost imaju testovi koji detektuju i/ili gen S, i to najverovatnije zbog vrlo prisutnih mutacija na ovom genu [11,12].

LAMP METODA

Petljom-posredovana izotermalna metoda umnožavanja nukleinskih kiselina (*engl. loop-mediated isothermal amplification, LAMP*), koju je razvila japanska kompanija Eiken [13,14] je poslednjih nekoliko godina stekla veliku popularnost u oblasti terenske dijagnostike [14]. Od svih postojećih tehnika izotermalnog umnožavanja nukleinskih kiselina LAMP je najbolje istražena metoda i ima izuzetno široku primenu. Za razliku od PCR metode kod koje su

Naziv testa	Proizvođač	Zemlja	Ciljna sekvenca	Detekcija signala	Tip uzorka	IVD/RUO	Preporučen komplet za izolaciju NK
Abbott Real Time SARS-CoV-2	Abbott Molecular Inc.	USA	ORF1ab, N gen, IC	FAM, VIC, ROX	NFB OFB NB	IVD	Zatvoren automatski sistem ekstrakcije
Liferiver 2019-nCoV	BioVendor Group	Czech Republic	ORF1ab, N gen, E gen, IC	FAM, HEX, Cal Red, Cy5	NFB OFB NB	IVD	nije naveden preporučen proizvođač
GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit	OSANG Healthcare Co.	South Korea	ORF1ab, N gen, E gen, IC	FAM, Texas Red, JOE/VIC, Cy5	NFB, BAL, SP	IVD	QIAamp viral RNA Mini Kit
TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-qPCR Kit	Thermo Fisher Scientific	USA	ORF1ab, N gen, S gen, IC	FAM, VIC, ABY, JUN	NFB OFB NB	IVD	MagMAX™ Viral Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit	Sansure Biotech Inc.	China	ORF1ab, N gen, IC	FAM, ROX, Cy5	NFB OFB NB	IVD	set za izolaciju uključen u dijagnostički komplet
VIASURE SARS-CoV-2	CerTest Biotec, S.L.	Spain	ORF1ab, N gen, IC		NFB OFB NB	IVD	nije naveden preporučen proizvođač
qMAXSen™ Coronavirus (SARS-CoV-2)	Canvax Biotech	Spanija	N gen, IC	FAM, HEX	NFB OFB NB, SP	IVD	nije naveden preporučen proizvođač
Fosun COVID-19 RT-PCR Detection Kit	Shanghai Fosun Long March Medical Science	Kina	ORF1ab, N gen, E gen, IC	FAM, JOE, ROX, Cy5	NFB OFB NB	IVD	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Tabela 1: Pregled dostupnih QRT-PCR testova za detekciju SARS-CoV-2 virusa (IC – internal control, NFB – nazofaringealni bris, OFB – orofaringealni bris, NB – nazalni bris, BAL – bronhoalveolarna lavaža, SP – sputum). IVD – *in vitro* diagnostics; RUO – research use only

neophodni koraci na različitim temperaturama, što se omogućava cikličnim termostatom, LAMP se odvija pri konstantnoj temperaturi (izotermalno), a uz prisustvo četiri (do šest) različitih početnica koje se vezuju za šest (ili osam) različitih regiona u okviru ciljnog gena. Na ovaj način se obezbeđuje visoka specifičnost reakcije pri izotermalnim uslovima. Prilagodljivost ove metode omogućava praćenje reakcije umnožavanja u realnom vremenu, direktno u reakcionom sudu, bez naknadnih analiza, čime je omogućena visoka specifičnost i značajno smanjen rizik od zagađenja. Praćenje reakcija u realnom vremenu omogućeno je primenom jeftinih, prenosnih, ručnih uređaja koji ne zahtevaju ciklični termostat sa skupim optičkim modulom kao kod qPCR metode, što je izuzetno pogodno za testiranje na terenu (*engl. Point-Of-Care testing - POC*) [15,16].

LAMP POČETNICE

Jedna od značajnih razlika između LAMP i PCR metoda je to što se u okviru izvođenja LAMP-a koristi set od četiri (do šest) specifičnih početnica koje se prave na osnovu šest različitih regiona ciljnog gena: F3c, F2c i F1c regioni na 3' kraju i B1, B2 i B3 regioni na 5' kraju ciljnog gena (**Slika 1**):

Dve unutrašnje početnice:

- a) prednja unutrašnja početnica (*engl. forward inner primer, FIP*) i
- b) zadnja unutrašnja početnica (*engl. backward inner primer, BIP*);

Dve spoljašnje početnice:

- a) prednja spoljašnja početnica (*engl. forward outer primer, F3*) i
- b) zadnja spoljašnja početnica (*engl. backward outer primer, B3*);

Dve dodatne početnice komplementarne sa regionom petlje:

- a) prednja početnica petlje (*engl. forward loop primer, FL*) i
- b) zadnja početnica petlje (*engl. backward loop primer, BL*).

Kao što je prikazano na **Slici 1**, FIP se sastoji od F2 regiona na svom 3' kraju, koji je komplementaran F2c regionu ciljnog gena, i regiona na svom 5' kraju, koji je iste sekvence kao F1c region. Dalje, F3 početnica se sastoji od oligonukleotidne sekvene, koja je komplementarna F3c regionu ciljanog gena. Zadnja unutrašnja početnica – BIP, sastoji se od B2 regiona na svom 3' kraju, koji je komplementaran B2c regionu, i regiona na svom 5' kraju, koji je iste sekvene kao B1c region. Zadnja spoljašnja početnica – B3 prajmer, sastoji se od oligonukleotidne sekvene, koja je komplementarna B3c regionu ciljanog gena [13].

Za dizajniranje početnica za LAMP najčešće se koristi besplatni internet softver PrimerExplorer V4, Eiken Chemical Co. Ltd. (http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html). Iako je PrimerExplorer V4 veoma koristan i u širokoj je upotrebi, ima nekoliko ograničenja. Prvo, on podržava samo „ATCG“ IUPAC znakove u unešenoj sekvenci. Drugo, radi samo u Windows operativnim sistemima - Windows Vista/7 (ne podržava Mac, Linux i Solaris) i u određenom internet pretraživaču (Internet Explorer 7/8/9). Takođe, manje je prikladan za analize sa visokom stopom istovremene obrade podataka, budući da može da obavlja samo po jedno pretraživanje u jednom trenutku, prihvata sekvene duge samo do 2000 bp i rezultate prikazuje u HTML obliku [17].

PrimerExplorer V5, Fujitsu Ltd., Tokio, Japan je dostupan od oktobra 2016. godine (https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/index.html). Za razliku od verzije V4, PrimerExplorer V5 radi u Windows 7/8.1/10 i Mac OS X 10.8.2 operativnim sistemima i Internet Explorer 10/11 i Safari 6.0.1 internet pretraživačima.

Osim toga, za dizajn početnica se može koristiti i New England BioLabs onlajn softver tj. NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com>), kao i različite aplikacije koje nisu besplatne, poput OptiGene LAMP Designer-a (<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>).

Takođe, slično kao i kod klasične PCR metode, pre naručivanja i korišćenja početnica u LAMP analizi, potrebno je proveriti njihovu specifičnost BLAST pretraživanjem sekvenci u GenBank bazi podataka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/design-pcr-primers/>).

Prilikom dizajniranja LAMP početnica neophodno je ispuniti sledeće uslove:

1. dizajnirati ih tako da imaju odgovarajuće temperature topljenja TM (engl. melting temperature): ~ 65 °C (64–66 °C) za F1c i B1c, ~ 60 °C (59–61 °C) za F2, B2 i F3 i B3 i ~ 65 °C (64–66 °C) za početnice petlje; (https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1.pdf)
2. krajevi početnica treba da ispunjavaju određeni stepen stabilnosti, jer smanjenje Gibbsove slobodne energije (manje od -4 kcal/mol) za 3' krajeve početnica dovodi do veće stope njihovog vezivanja za ciljnu sekvencu;
3. sadržaj GC baznih parova bi trebalo da bude oko 50–60%;
4. dizajnirane početnice, posebno unutrašnje, ne smeju da formiraju bilo kakve sekundarne strukture, poput dimera početnica ili ukosnica, što se može izbeći dizajnom takvih početnica koje nemaju komplementarne 3' krajeve i previšok sadržaj GC baznih parova [18];
5. rastojanje između kraja F2 i B2 početnica (sekvenca koja se umnožava) treba da bude oko 120–180 bp, a između 5' kraja F2 i 5' kraja F1 početnica (deo koji formira petlju) oko 40–60 bp, dok rastojanje između F2 i F3, kao i B2 i B3 početnica, treba da bude od 0–20 bp [13].

MEHANIZAM LAMP REAKCIJE

U osnovi LAMP metode je sinteza DNK molekula putem cikličnog tj. ponavljajućeg izmeštanja lanaca, što je omogućeno korišćenjem posebne, termostabilne DNK polimeraze izolovane iz (*Geo**Bacillus stearothermophilus* (*Bst*)), koja poseduje visoku aktivnost izmeštanja lanaca, kao i 5'-3' polimeraznu aktivnost, ali nema 3'-5' egzonukleaznu aktivnost [14,18,19].

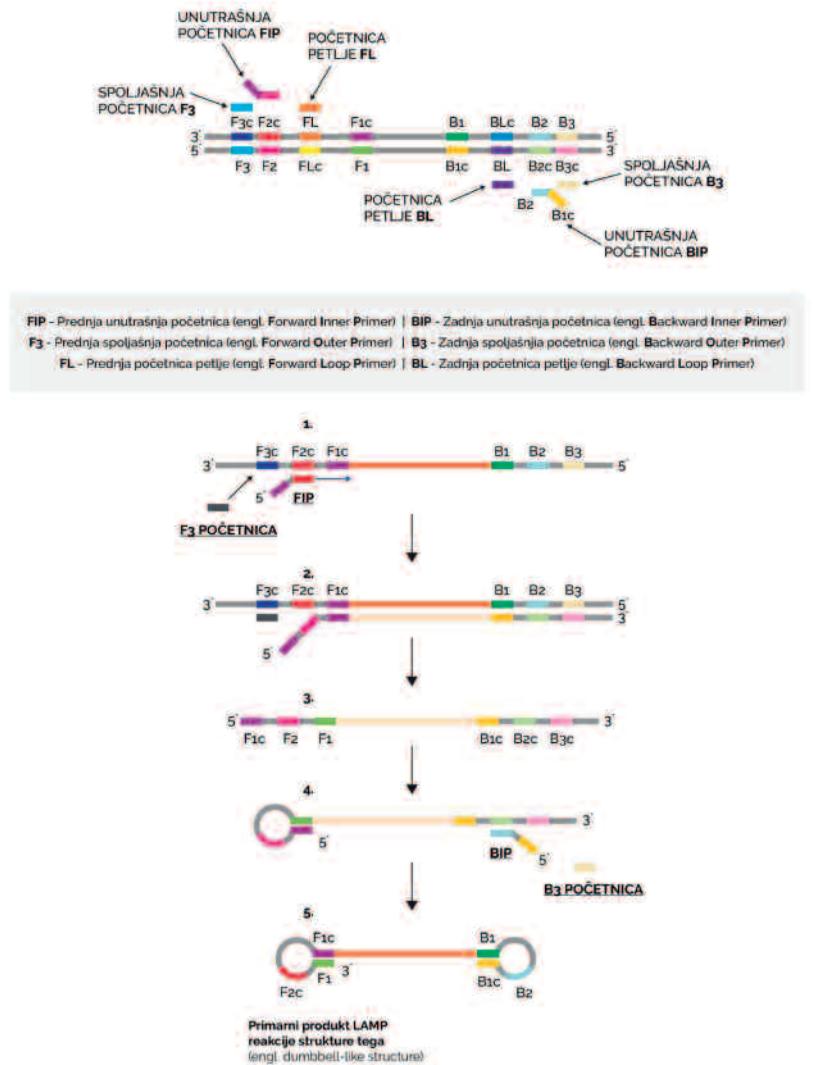
Za izvođenje LAMP reakcije je neophodno:

1. reakciona konstantna temperatura od 60–65°C tokom 60 minuta,
2. *Bst* DNK polimeraza,
3. slobodni dezoksiribonukleozid trifosfati tj. nukleotidi (dNTP),
4. specifične grupe početnica (četiri do šest) i
5. ciljna DNK sekvenca koju treba umnožiti [20].

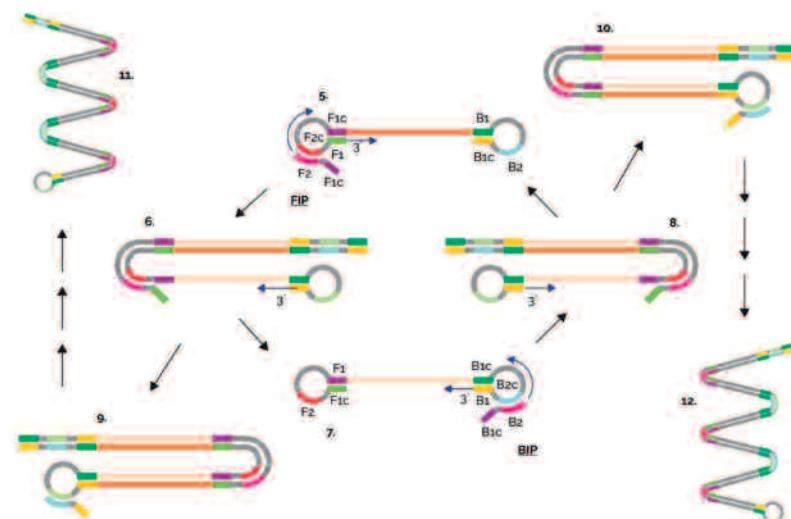
Mehanizam reakcije LAMP umnožavanja uključuje tri koraka (**Slike 1 i 2**):

1. proizvodnju početnog materijala,
2. ciklično umnožavanje i
3. elongaciju i recikliranje

Prvi koraci LAMP reakcije podrazumevaju prisustvo svih početnica, unutrašnjih i spoljašnjih. Najpre dolazi do vezivanja FIP početnica za 3' komplementarni region kodirajućeg lanca (F2c), što inicira oslobođanje matričnog lanca i sintezu novog lanca prisustvom *Bst* DNK polimeraze. Sledeći korak sinteze preuzima spoljašnja početnica (na **Slici 1** F3 početnica), koja se vezuje uzvodno od ciljnog regiona, prilikom čega dolazi do zamene lanaca i oslobođanja jednolančane DNK. Otpušteni lanac, tj. LAMP produkt dalje formira strukturu petlje na svom 5' kraju, zbog postojanja komplementarnih regiona u okviru novosintetisanog lanca (F1 i F1c). Ovakav ciklus vezivanja i zamene lanaca će se ponoviti i na suprotnoj strani ciljne DNK, prilikom čega se dobija kratka DNK struktura nalik tegu (engl. dumbbell-like DNA structure), koja služi za dalje umnožavanje ciljnog DNK molekula. Ova struktura takođe sadrži mnoge regije za inicijaciju LAMP amplifikacije na 3' krajevima petlji, kao i regije za vezivanje unutrašnjih početnica, što kao posledicu



Slika 1. LAMP početnice i mehanizam stvaranja primarnog LAMP produkta strukture tega (Prilagođeno prema [13])



Slika 2. Dalji mehanizam LAMP reakcije: formiranje struktura različitih veličina

ima formiranje konkatamernih struktura sa sve više regiona za inicijaciju sinteze [22]. Povećan broj polaznih tačaka za novosintezu DNK putem LAMP metode pružaju upravo početnice za petlje tj. sekvencu koju umnožavamo sa LB i FB, koji sadrže sekvence komplementarne jednostrukoj petlji (između B1 i B2 regiona i F1 i F2 regiona).

Rezultati LAMP metode su brza akumulacija produkata dvostrukе DNK i umnožavanje bioprodukata koji mogu lako da se detektuju [21], bilo kao endpoint eseji ili u realnom vremenu. Za endpoint detekciju se koristi klasična elektroforeza na agaroznom gelu, ili vizuelna evaluacija („golim okom“) putem kolorimetrije u okviru tzv. uređaja sa lateralnim protokom (engl. lateral flow device). Za detekciju u realnom vremenu kod LAMP metode se koriste turbidimetrija ili fluorescencija. Kod turbidimetrije se meri stepen zamučenja rastvora zbog nagomilavanja magnezijum pirofosfata, nusproizvoda DNK sinteze [22], dok se za fluorescenciju (ili čak i kolorimetriju golim okom) koriste helirajuće boje kao što su kalcein [23], hidroksinajtol plavo (engl. hydroxynaphthol blue, HNB) [24], SYBR green I i druge [25].

U poređenju sa klasičnom PCR metodom, LAMP metoda je otpornija na različite vrste inhibitora prisutnih u kliničkim uzorcima, tako da nema potrebe za mukarotinim koracima prečišćavanja DNK. Ne zahteva ciklični termostat i u kombinaciji sa reakcijom reverzne transkripcije ima veliku moć umnožavanja i RNK sekvenci. Veoma je brza, specifična, osetljiva i efikasna metoda koja omogućava detekciju DNK sa svega šest kopija u reakcionej smeši. LAMP ima prednost u odnosu na PCR metode amplifikacije i zbog manjeg broja jednostavnijih koraka pripreme uzorka. Upravo zbog toga, LAMP metoda ima veliki potencijal za primenu u POC ekonomičnoj dijagnostici zaraznih bolesti, kao i u medicinskim, farmakološkim i istraživanjima higijene životne sredine. Osim toga, LAMP metoda je pogodna za pripremu uzorka za sekvenciranje DNK Sangerovom metodom ili pirosekvenciranjem [26]. Najvažnije razlike izmedju PCR i LAMP metoda su sumirane u Tabeli 2.

	LAMP	PCR ili qPCR
Priprema uzorka	Ne zahteva prethodnu pripremu uzorka	Zahteva/ju prethodnu pripremu uzorka
Amplifikacija		
Enzim	<i>Bst</i> DNK polimeraza Autociklirajuća DNK amplifikacija Izotermalni uslovi (60 °C-65 °C)	<i>Taq</i> DNK polimeraza Zahteva cijedni termostat (95 °C/55 °C/72 °C)
Početnica	Četiri ili šest	Dve (plus jedna ili više proba qPCR)
Ostale komponente	dNTP, bufer, Mg ²⁺ , voda	dNTP, bufer, Mg ²⁺ , voda
Detekcija	Gel-elektroforeza, turbidimetrijski, golim okom, kolorimetrijski, fluorescencija, bioluminescencija itd.	Gel-elektroforeza, fluorescencija (qPCR)
Vreme trajanja reakcije	Moguće je vizuelno detektovati proizvode reakcije (turbidimetrijski i sl.)	Nemoguće je direktno vizuelno detektovati proizvode reakcije
Tipičan prinos reakcije	Brža metoda: Obično traje < 30 min	Sporija metoda: Obično traje > 1 h
Osetljivost na inhibitore matriksa uzorka	tolerantna	osetljiva

Tabela 2: Poređenje parametara LAMP metode u odnosu na klasičnu PCR (ili PCR u realnom vremenu) metodu (Prilagođeno iz: [20,53]).

UPOTREBA LAMP METODE U DIJAGNOSTICI SARS-CoV-2 (COVID-19)

Budući da je virus SARS-CoV-2 RNK virus, neophodno je korišćenje RT-LAMP metode tj. metode sa primjenjenom reverznom transkripcijom. Prva istraživanja u oblasti upotrebe RT-LAMP metode za brže otkrivanje virusa SARS-CoV-2 započela je grupa istraživača u februaru 2020 [27]. Ova studija je izvedena pre nego što je COVID-19 dobio dimenzije pandemije, stoga nisu korišćeni stvarni klinički uzorci. Da bi se testirala RT-LAMP metoda korišćena je sintetička DNK virusnog agensa, tada nazvanog novi koronavirus (ili nCoV). U ovoj studiji dizajniran je dvostepeni LAMP (Covid-19 Penn RAMP) u zatvorenoj cevi sa kolorimetrijskom ili fluorescentnom detekcijom. Rezultati LAMP testa pokazali su deset puta veću osetljivost od konvencionalnih RT-PCR testova. U drugoj studiji [28] simulirani su uzorci pacijenata tako što je u ljudsku pljuvačku, serum, oro- i nazofaringealne briseve i uzorke urina dodavan biološki uzorak sa frakcijom nukleinske sekvence SARS-CoV-2 virusa. Studija je imala za cilj razvoj brzog skrining dijagnostičkog testa i uzorci su analizirani pomoću RT-LAMP metode. Početnice su dizajnirane na osnovu javno dostupnih podataka o SARS-CoV-2 i upoređivane sa drugim sekvencama koronavirusa. Da bi se utvrdili optimalni uslovi za RT-LAMP testirani su različiti setovi početnica, nekoliko temperaturnih opsega (55–65 °C) i različita vremena inkubacije (20–45 min). Najbolji rezultati amplifikacije postignuti su na temperaturi od 63 °C tokom 30 minuta. Specifičnost LAMP testova proverena je ispitivanjem uzoraka različitih patogena uključujući viruse, bakterije i gljivice. U sledećoj studiji [29] pokazano je da su početnice dizajnirane za RNK-zavisnu sekvencu polimeraze (RdRp sekvenca) poliproteinskog regiona „otvorenog okvira za čitanje 1ab“ (ORF1ab) virusne RNK imale veću sposobnost umnožavanja. Test je pokazao visoku specifičnost kod kliničkih uzoraka pozitivnih na nekoliko drugih poznatih respiratornih virusa.

Druge studije su ispitivale upotrebu ciljnih početnica za različite regije koji kodiraju strukturne proteine, kao što je protein šiljka kojeg kodira S gen ili protein nukleokapsida kojeg kodira N gen, odvojeno ili u kombinaciji radi postizanja što veće osetljivosti [30,31] i [32]^P. Strategija ciljanja gena Nsp3 početnicom u kombinaciji sa onim početnicama koje ciljaju N i S gene, pokazala se uspešnom, ispoljivši značajne rezultate i najkraće vreme za sintezu cDNK [31]. U ponutom radu je dobijena visoka specifičnost dizajniranih početnica i nešto manja osetljivost. Da bi poboljšali efikasnost reakcije RT-LAMP istraživači su koristili nekoliko kolorimetrijskih metoda detekcije, gde su reagensi koji menjaju boju ugrađeni u reakcionu smešu. U studiji [31] dizajnirani su i ispitivani visoko specifični RT-LAMP testovi za detekciju SARS-CoV-2. Rezultati se mogu dobiti 30 minuta posle umnožavanja. Optimizovani reakcioni uslovi kolorimetrijske tehnike detekcije u opisanom radu podrazumevaju upotrebu leuko-kristalno ljubičaste boje (engl. LVC-leuco cristal violet). U cilju unapređenja jednostavnosti upotrebe, prenosivosti i ponovljivosti, u studiji [34]^P je primenjena kombinacija 3D štampane inkubacione komore za komercijalne PCR kivete i kolorimetrijske RT-LAMP reakcije. Studija [35] je imala za cilj unapređenje i RT-LAMP testa i same vizualizacije rezultata. Dizajnirano je 6 početnica koje su specifične za N gen, a reakcioni sistem je optimizovan plazmidom pUC57 koji sadrži N sekvencu gena. Rezultati ove studije su pokazali

da RT-LAMP testovi mogu detektovati prisustvo SARS-CoV-2 virusa sa ograničenjem od ≥ 6 kopija po μl pUC57 koji sadrži N sekvencu gena. Nedavno je [36] uspešno razvijen brz (< 40 min), jednostavan i precizan test koji se bazira na CRISPR-Cas12 metodi u kombinaciji sa RT-LAMP, primjenjen u formatu uređaja sa lateralnim protokom (*engl.* lateral flow device). Ovaj test je nazvan SARS-CoV-2 DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter (DETECTR). Prvi korak je primena RT-LAMP-a za umnožavanje RNK izolovane iz nazo/orofaringealnih uzoraka, zatim sledi detekcija virusne RNK-a posredovana Cas12 molekulom i fluorescentnim probama. Novorazvijeni test DETECTR može da pruži rezultat u roku od 30 minuta (od uzorka do rezultata) sa visokom osetljivošću (10 kopija RNK po μl). Format uređaja sa lateralnim protokom je vrlo efikasan za detekciju čak i vrlo niske koncentracije virusne RNK.

Nagura-Ikeda i saradnici su radili kliničke procene performansi molekularno-dijagnostičkih testova baziranih na RT-qPCR, direktnom RT-qPCR i RT-LAMP, kao i brzog antigenskog testa za dijagnostiku SARS-CoV-2, na uzorku pljuvačke pacijenata sa potvrđenim COVID-19-om [37]. Rezultati studije su pokazali da pljuvačka pacijenata u ranoj fazi pojavе simptoma predstavlja alternativnu opciju uzorka za postavljanje dijagnoze COVID-19 infekcije. Poređenje RT-qPCR testa, tri "direktna" RT-qPCR kompleta i RT-LAMP testa pokazalo je različitu osetljivost za detekciju virusne RNK, ali je zaključeno da bi svaki od ovih testova mogao da se koristi u zavisnosti od kliničke postavke, ukoliko se dobro obrati pažnja na bilo kakve lažno-negativne rezultate.

Usled nestašice zaliha kritičnih reagenasa poput nazalnih briseva, kompleta za izolaciju RNK i dr. tokom pandemije COVID-19, kao i činjenice da aktuelni konvencionalni testovi za NK doprinose samoj nestashi, Lali i saradnici [38] su razvili brz, jednostavan, osetljivi i jeftini kolorimetrijski test koristeći RT-LAMP metodu optimizovanu na uzorcima humane pljuvačke bez koraka prečiščavanja RNK, u cilju prevazilaženja pomenutih izazova. U studiji je opisana optimizacija protokola predtretmana ispljuvkva i reakcionih uslova kako bi se omogućila analitički osetljiva detekcija virusa pomoću RT-LAMP metode. Takođe, testirano je i da li bi predtretman ispljuvkva mogao da omogući i detekciju virusa konvencionalnom RT-qPCR metodom. S tim u vezi, došlo se do zaključka da optimizovani protokol predtretmana ispljuvkva omogućava analitički osetljivu detekciju SARS-CoV-2 iz uzorka kako kolorimetrijskim RT-LAMP-om, tako i RT-qPCR-om, bez koraka prečiščavanja RNK. Još jedan od značajnih doprinosa ove studije jeste isticanje fleksibilnosti primene LAMP eseja korišćenjem tri načina očitavanja: kolorimetrija golim okom, spektrofotometrija i fluorescencija u realnom vremenu. Sledeća studija bazirana na razvoju protokola za detekciju SARS-CoV-2 koji se zasniva na kolorimetrijskoj RT-LAMP metodi i ne podrazumeva korak prečiščavanja RNK jeste studija koju su izveli Ben-Assa i kolege [39]. Još jedan primer brzog, osetljivog RT-LAMP testa za dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa koji koristi kolorimetrijsko očitavanje za samo 30 minuta i pritom je kompatibilan sa postojećim, lako dostupnim reagensima je i studija autora Rabe i Cepko [40]. Ovakav vid testa u kombinaciji sa protokolima za inaktivaciju (nukleaza i viriona) i prečiščavanje, koji su optimizovani u istoj studiji, dovodi osetljivost metode na jednu kopiju virusne RNK po mikrolitru u pojedinačnom uzorku i ima za cilj povećanje mogućnosti testiranja na SARS-CoV-2. Takođe, u još jednoj studiji [41] je razvijen RT-LAMP test za detekciju SARS-CoV-2 koji već posle 30 minuta detektuje jednu kopiju viralne RNK po reakciji. Klinička osetljivost i specifičnost ovog testa iznose 100% i njegove performanse su uporedive sa RT-qPCR-om. Da bi dodatno smanjili troškove i omogućili detekciju golim okom, autori su koristili HNB boju za kolorimetrijsku detekciju reakcije umnožavanja. Još jedna grupa autora [42] je koristila HNB kao fluorescentni reagens za detekciju prilikom razvoja vizuelnog i brzog RT-LAMP testa za detekciju SARS-CoV-2 iz „respiratornih“ uzoraka, koji pritom kao ciljni gen koristi S gen ovog virusa.

U studiji koju su izveli Sun i saradnici [43] prikazan je sistem za terensku detekciju živog virusa iz medijuma nazalnog brisa koji je integriran sa pametnim telefonom i koristi panel konjskih respiratornih zaraznih bolesti kao model sistema za odgovarajuće ljudske bolesti, kao što je COVID-19. Specifične sekvene NK poreklom iz pet patogena umnožavane su LAMP metodom na mikrofluidičnom čipu i na završetku reakcija detektovane pomoću pametnog telefona. Već posle 30 minuta patogeni su uspešno detektovani, sa limitom detekcije koji je uporediv sa limitom konvencionalne PCR metode.

Još jedan robustan, tačan i jednostavan metod za brzu detekciju SARS-CoV-2 virusa razvijen je od strane Yu i tima [44]. Metod je baziran na RT-LAMP metodi i nosi naziv iLACO (*engl.* isothermal LAMP-based method for COVID-19) – izotermalni metod za COVID-19 baziran na LAMP-u, pri čemu je kao ciljni region odabran fragment ORF1ab gena. Interesantna stavka u ovoj studiji jeste dodatak SYBR green boje u cilju proširenja mogućnosti iLACO detekcije. Takođe, korišćen je i novi tip boje za NK, GeneFinder™ (D039 from Bridgen), koji ima poboljšan fluorescentni signal i osetljivost. Žu i saradnici [45] osmisili su test koji podrazumeva višestruko, petljom-posredovano izotermalno umnožavanje reverznom transkripcijom (*engl.* multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, mRT-LAMP) kombinovano sa biosenzorom lateralnog protoka na bazi nanočestica (*engl.* nanoparticle-based lateral flow biosensor, LFB) – mRT-LAMP-LFB, za dijagnostiku COVID-19. Korišćenjem dva seta LAMP početnica, ORF1ab gen (otvoreni okvir čitanja 1a/b) i N gen SARS-CoV-2 virusa istovremeno su umnožavani u jednoj reakcioniј tubici i detektovani, a rezultati detekcije su interpretirani pomoću LFB-a. U prisustvu početnica obeleženih sa FITC (fluoresceinom)/digoksinom i biotinom, mRT-LAMP je proizveo brojne dupleks amplikone sa vezanim FITC/digoksinom i biotinom. Amplikoni su utvrđeni pomoću LFB putem imunoreakcija (FITC/digoksin na dupleksu i anti-FITC/digoksin na test-liniji LFB-a) i bio-

tin/streptavidin interakcija (biotin na dupleksu i streptavidin na nanočestici polimeraze). Nakupljanje nanočestica je dovelo do pojave karakteristične grimizne trake, što omogućava multipleks analizu ORF1ab i N gena bez instrumenata.

U radu koji je objavila grupa naučnika sa Univerziteta Oksford [46], opisana je uspešna primena RT-LAMP metode za brzu detekciju SARS-CoV-2 (u roku od 30 minuta) korišćenjem kolorimetrijskog LAMP kompleta – WarmStart™ Colorimetric LAMP 29 Master Mix (DNA & RNA) (New England Biolabs). U ove svrhe korišćeno je 16 kliničkih uzoraka nazofaringealnog brisa (osam pozitivnih i osam negativnih). Kako bi se procenio potencijal RT-LAMP-a u detekciji SARS-CoV-2 sintetisana su četiri različita seta početnica (O117, S17, N1 i N15), čije su preformanse potom testirane na sintetisanim RNK fragmentima za N gen, S gen i ORF1ab gen dobijenih *in vitro* transkripcijom. U radu je pokazano da tridesetominutna RT-LAMP reakcija ima mogućnost detekcije do 2 kopije ciljne RNK po 25 µl reakcije. Još jedan rad u kojem je pokazan veliki kapacitet RT-LAMP metode u brzom skriningu SARS-CoV-2 objavili su Džiang i kolege [47]. U ovom radu akcenat je stavljen na brzinu i specifičnost ove metode koja bi, kako je u radu navedeno, mogla i do 2 puta da proširi kapacitete laboratorija za obradu kliničkih uzoraka. Primena RT-LAMP u detekciji kliničkih uzoraka je takođe pokazala visok stepen specifičnosti (99.5%) i osetljivosti (91.4%).

Radi se i na različitim poboljšanjima RT-LAMP-a za detekciju SARS-CoV-2. Na primer, rad [48] opisuje razvoj metode za smanjenje rizika od prenosne kontaminacije, poboljšanje validnosti testa uz kolorimetrijsku vizuelizaciju rezultata upotreboom HNB, dok su u radu [49] koristili sonde za razmenu fluorogenih oligonukleotidnih lanaca specifične za sekvencu, kako bi povećali brzinu i osetljivost u kolorimetrijskom RT-LAMP-u. Dao Ti i kolege [50] su evaluirali specifičnost RT-LAMP-a na kliničkim uzorcima nazofaringealnog brisa i utvrdili su da RT-LAMP testovi imaju odličnu specifičnost, uprkos manjoj osetljivosti u poređenju sa RT-PCR. Pored toga, razvili su protokol multipleksiranog sekvenciranja (LAMP - sekvenciranje) kao postupak dijagnostičke validacije za otkrivanje i beleženje ishoda RT - LAMP reakcija.

Postoje i komercijalni kompleti bazirani na RT-LAMP metodi za detekciju SARS-CoV-2 virusa – predstavljeni u **Tabeli 3**. Izdvajamo Color SARS-CoV-2 RT-LAMP Diagnostic Assay kompanije Color Health koji ima limit detekcije od 0.75 kopija viralne RNK po µl i dobio je tzv. autorizaciju za hitnu primenu (engl. emergency use authorization – EUA) od strane američke Agencije za hranu i lekove (engl. U.S: Food and Drug Administration - FDA) u maju 2020. godine [51]. AQ-TOP™ COVID-19 Rapid Detection Kit kompanije Seasun Biomaterials je još jedan kvalitativni RT-LAMP esej koji je takođe dobio EUA dozvolu od strane FDA u maju 2020 [52].

	LAMP	PCR ili qPCR
Priprema uzorka	Ne zahteva prethodnu pripremu uzorka	Zahteva/ju prethodnu pripremu uzorka
Amplifikacija		
Enzim	<i>Bst</i> DNK polimeraza Autociklirajuća DNK amplifikacija Izotermalni uslovi (60 °C-65 °C)	<i>Taq</i> DNK polimeraza Zahteva ciklični termostat (95 °C/55 °C/72 °C)
Početnice	Četiri ili sedi	Dve (plus jedna ili više proba qPCR)
Ostale komponente	dNTP, bufer, Mg ²⁺ , voda	dNTP, bufer, Mg ²⁺ , voda
Detekcija	Gel-elektroforeza, turbidimetrijski, golim okom, kolorimetrijski, fluorescencija, bioluminescencija itd.	Gel-elektroforeza, fluorescencija (qPCR)
	Moguće je vizuelno detektovati proizvode reakcije (turbidimetrijski i sl.)	Nemoguće je direktno vizuelno detektovati proizvode reakcije
Vreme trajanja reakcije	Brza metoda: Obično traje < 30 min	Sporija metoda: Obično traje > 1 h
Tipičan prinos reakcije	~ 10-20 mg	~ 0.2 mg
Osetljivost na inhibitore matriksa uzorka	tolerantna	osetljiva

Tabela 3: Pregled komercijalnih LAMP testova za detekciju SARS-CoV-2 virusa

ZAKLJUČAK

U preglednom radu su predstavljeni osnovni mehanizam, dizajn početnica i procedure izvođenja **izotermalne amplifikacije posredovane petljom** (engl. loop-mediated isothermal amplification, **LAMP**), sa posebnim akcentom na primenu LAMP metode za detekciju SARS-CoV-2 virusa, kao i na poređenje parametara LAMP metode sa PCR metodom kao

„zlatnim standardom“. Iz prikazanih radova se može zaključiti da je LAMP metoda značajno pristupačniji način testiranja na terenu, zahvaljujući tome što ne zahteva prethodnu pripremu uzoraka, manje je osetljiva na inhibitore prisutne u uzorcima, izvodi se na konstantnoj temperaturi i zbog toga je pogodna za minijaturizaciju procesa u vidu korišćenja mikrofluidičnih uređaja i uređaja lateralnog protoka (engl. lateral flow device). Takođe, LAMP reakcija je brža od PCR-a, dok je princip detekcije signala značajno jednostavniji – u zavisnosti od dizajna moguće je signal očitati i golim okom (kvalitativno) ili pametnim telefonom, što značajno povećava pristupačnost za korišćenje od strane većeg broja korisnika. Pri tome LAMP poseduje komparabilan nivo specifičnosti u odnosu na PCR. Zbog svega nabrojanog, testovi bazirani na RT-LAMP metodi predstavljaju dobru i ekonomičnu alternativu za masivno testiranje na SARS-CoV-2.

ZAHVALNICA.

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektima iz programa Horizont 2020 Evropske unije sa brojevima ugovora 739570 (ANTARES) i 872662 (IPANEMA), kao i kroz podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-68/2020-14/ 200358 za autore M. Dj, T.K i L.J.I i broj ugovora 451-03-9/2021-14/200125 za Ž.D.P.

Autori zahvaljuju Jeleni Ognjenov na pomoći u pripremi ilustracija za rad.

LITERATURA

1. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Aug 15;88(16):7276–80.
2. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992 Apr;10(4):413–7.
3. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*. 2017 Feb 2;8:108.
4. Clark MS, Thorne MA, Purać J, Burns G, Hillyard G, Popović ZD, et al. Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*. 2009 Jul 21;10:328.
5. Purać J, Kojić D, Petri E, Popović ŽD, Grubor-Lajšić G, Blagojević DP. Cold adaptation responses in insects and other arthropods: an “omics” approach. In: Raman C, Goldsmith MR, Agunbiade TA, editors. *Short views on insect genomics and proteomics*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 89–112.
6. Popović ŽD, Subotić A, Nikolić TV, Radojičić R, Blagojević DP, Grubor-Lajšić G, et al. Expression of stress-related genes in diapause of European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.). *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*. 2015 Aug;186:1–7.
7. Yodmuang S, Gadanski I, Chao PG, Vunjak-Novakovic G. Transient hypoxia improves matrix properties in tissue engineered cartilage. *J Orthop Res*. 2013 Apr;31(4):544–53.
8. Yodmuang S, Marolt D, Marcos-Campos I, Gadanski I, Vunjak-Novakovic G. Synergistic effects of hypoxia and morphogenetic factors on early chondrogenic commitment of human embryonic stem cells in embryoid body culture. *Stem Cell Rev and Rep*. 2015 Apr;11(2):228–41.
9. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611–22.
10. Kim D, Lee J-Y, Yang J-S, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020 May 14;181(4):914–921.e10.
11. van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol*. 2020 Jul;128:104412.
12. Banko A, Petrović G, Miljanović D, Loncar A, Vukcevic M, Despot D, et al. Comparison and Sensitivity Evaluation of Three Different Commercial Real-Time Quantitative PCR Kits for SARS-CoV-2 Detection. *Viruses*. 2021 Jul 8;13(7):1321.
13. Eiken Chemical Co. Ltd. [Eiken GENOME SITE] - The principle of LAMP method [Internet]. 2005 [cited 2021 Jul 12]. Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>
14. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):63e–63.
15. Vidic J, Vizzini P, Manzano M, Kavanaugh D, Ramarao N, Zivkovic M, et al. Point-of-Need DNA Testing for Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors (Basel)*. 2019 Mar 4;19(5).
16. Wan L, Gao J, Chen T, Dong C, Li H, Wen Y-Z, et al. LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biomed Microdevices*. 2019 Jan 7;21(1):9.
17. Torres C, Vitalis EA, Baker BR, Gardner SN, Torres MW, Dzenitis JM. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Bioinformatics*. 2011 Jun 16;12:240.
18. Welter M, Marx A. Combining the Sensitivity of LAMP and Simplicity of Primer Extension via a DNA-Modified Nucleotide. *Chemistry*. 2020 May 14;2(2):490–8.
19. Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser MJ, Klingele AJ, Liles MR, et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front Microbiol*. 2014 Aug 1;5:395.
20. Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog Dis*. 2018 Jun;15(6):309–31.
21. Esmatabadi M javad D, Bozorgmehr A, zadeh HM, Bodaghbadi N, Farhangi B, Babashah S, et al. Techniques for Evaluation of LAMP Amplicons and their Applications in Molecular Biology. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015 Dec 3;16(17):7409–14.

22. Deng H, Gao Z. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques. *Anal Chim Acta*. 2015 Jan 1;853:30–45.
23. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*. 2008;3(5):877–82.
24. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*. 2009 Mar;46(3):167–72.
25. Seyrig G, Stedtfeld RD, Tourlousse DM, Ahmad F, Towery K, Cupples AM, et al. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *J Microbiol Methods*. 2015 Dec;119:223–7.
26. Niessen L. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Jan;99(2):553–74.
27. El-Tholotha M, Bau HH, Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. 2020 Feb 19;
28. Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2020 Jun 12;15(6):e0234682.
29. Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Jin X, Zhang C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 18;21(8).
30. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jun;26(6):773–9.
31. Park G-S, Ku K, Beak S-H, Kim SJ, Kim SI, Kim B-T, et al. Development of Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assays Targeting SARS-CoV-2. *BioRxiv*. 2020 Mar 12;
32. Butt AM, Siddique S, An X, Tong Y. Development of a dual-gene loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection assay for SARS-CoV-2: A preliminary study. *medRxiv*. 2020 Apr 11;
33. Vabret N, Samstein R, Fernandez N, Merad M, Sinai Immunology Review Project, Trainees, et al. Advancing scientific knowledge in times of pandemics. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):338.
34. Gonzalez-Gonzalez E, Lara-Mayorga IM, Garcia-Rubio A, Garciamendez-Mijares CE, Guerra-Alvarez GE, Garcia-Martinez G, et al. Scaling diagnostics in times of COVID-19: Rapid prototyping of 3D-printed water circulators for Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) and detection of SARS-CoV-2 virus. *medRxiv*. 2020 Apr 14;
35. Wang D. One-pot Detection of COVID-19 with Real-time Reverse-transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay and Visual RT-LAMP Assay. *BioRxiv*. 2020 Apr 22;
36. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020 Jul;38(7):870–4.
37. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T, et al. Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19. *J Clin Microbiol*. 2020 Aug 24;58(9).
38. Lalli MA, Langmade JS, Chen X, Fronick CC, Sawyer CS, Burcea LC, et al. Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin Chem*. 2021 Jan 30;67(2):415–24.
39. Ben-Assa N, Naddaf R, Gefen T, Capucha T, Hajjo H, Mandelbaum N, et al. SARS-CoV-2 On-the-Spot Virus Detection Directly From Patients. *medRxiv*. 2020 Apr 27;
40. Rabe BA, Cepko C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020 Sep 29;117(39):24450–8.
41. LauYL, Ismail I, Mustapa NI, Lai MY, Tuan Soh TS, Hassan A, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of SARS-CoV-2. *PeerJ*. 2020 Jun 3;8:e9278.
42. Hu X, Deng Q, Li J, Chen J, Wang Z, Zhang X, et al. Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection. *mSphere*. 2020 Aug 26;5(4).
43. Sun F, Ganguli A, Nguyen J, Brisbin R, Shanmugam K, Hirschberg DL, et al. Smartphone-based multiplex 30-minute nucleic acid test of live virus from nasal swab extract. *Lab Chip*. 2020 May 5;20(9):1621–7.
44. Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clin Chem*. 2020 Jul 1;66(7):975–7.
45. Zhu X, Wang X, Han L, Chen T, Wang L, Li H, et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosens Bioelectron*. 2020 Oct 15;166:112437.
46. Huang WE, Lim B, Hsu C-C, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol*. 2020 Jul;13(4):950–61.
47. Jiang M, Pan W, Arasthfer A, Fang W, Ling L, Fang H, et al. Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jun 16;10:331.
48. Kellner MJ, Ross JJ, Schnabl J, Dekens MPS, Heinen R, Tanner NA, et al. Scalable, rapid and highly sensitive isothermal detection of SARS-CoV-2 for laboratory and home testing. *BioRxiv*. 2020 Jun 23;
49. Bhadra S, Riedel TE, Lakhotia S, Tran ND, Ellington AD. High-surety isothermal amplification and detection of SARS-CoV-2, including with crude enzymes. *BioRxiv*. 2020 Apr 14;
50. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2020 Aug 12;12(556).
51. FDA. EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) SUMMARY FOR THE COLOR SARS-COV-2 RT-LAMP DIAGNOSTIC ASSAY. FDA; 2020 Mar.
52. SeaSun Biomaterials. AQ-TO™ COVID-19 Rapid Detection Kit . FDA; 2020 May.
53. Rockweiler T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Primer Design and Assay Optimization. Lucigen Webinar; 2018.

NOBELOVA NAGRADA ZA HEMIJU:
CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma
THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY:
CRISPR/Cas9 genome editing



CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse

Marko Panić

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

Kontakt: marko.panic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Tehnologije za manipulaciju molekula DNK su omogućile brojna otkrića i prodore u biomedicinskim naukama. Ipak, metode za uvođenje ciljanih promena u genomu su do skora bile relativno komplikovane i nepristupačne najvećem broju naučnika. Primenom CRISPR-Cas9 tehnologije počela je revolucija u biomedicinskim naukama zato što su metode za genomsko inženjerstvo postale dostupne gotovo svakoj laboratoriji. Ova tehnologija je prešla veliki put od osnovnih istraživanja u vezi sa prokariotskim genomima pre nekoliko decenija, preko otkrića mehanizma stecenog imuniteta bakterija, da bi danas postala dominantna tehnologija za genomsko inženjerstvo. Fokus ovog rada je na praktičnom aspektu primene CRISPR-Cas9 tehnologije i njenim poređenjem u odnosu na alternative za uvođenje dvolančanih prekida u genomu (TALEN i ZFN nukleazama). Detaljno će se obraditi upotreba CRISPR-Cas9 tehnologije u bazičnim (naučnim) istraživanjima i u medicini. Razmatraće se i svi nedostaci trenutnih tehnologija za genomsko inženjerstvo, uključujući uvođenje nespecifičnih promena u genomu i načini prevazilaženja ovih nedostataka. Kroz brojne primere upotrebe CRISPR-Cas9 tehnologije će biti približeno zašto je ova metoda značajna ne samo za biomedicinske nauke, već za celokupno društvo.

Ključne reči: genomsko inženjerstvo, CRISPR- Cas9, genska terapija

CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application

Marko Panić

Center for human molecular genetics, University of Belgrade – Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

Correspondence: marko.panic@bio.bg.ac.rs

Abstract

Technologies for DNA manipulation have enabled numerous breakthroughs in the field of biomedical sciences. Until recently, methods for genome editing have been too complicated and practically unavailable for the vast majority of research laboratories. CRISPR-Cas9 technology has started a revolution in the biomedical sciences since it enabled the use of genome engineering methods in almost every research laboratory. This technology has gone a long way from its discovery in bacterial genomes, through being identified as a part of the bacterial immune system, to the application it is most known today – genome engineering. This paper will focus on the practical aspects of using CRISPR-Cas9 and its comparison to similar methods for genome engineering (using TALEN and ZFN nucleases). This paper will cover the benefits and drawbacks of CRISPR-Cas9 genome editing including off-target cleavage, and the possibilities to overcome these drawbacks. The use of CRISPR-Cas9 technology in basic research and clinical studies will be covered in detail. Current research related to CRISPR-Cas9 technology will be covered to emphasize the importance of this method not only for life sciences, but for society as a whole.

Keywords: genome engineering, CRISPR -Cas9, gene therapy

UVOD

Poslednjih nekoliko decenija smo svedoci brzog razvoja molekularne biologije. Sa otkrićem lančane reakcije polimeraze (PCR), metode za umnožavanje i modifikovanje molekula DNK su postale pristupačne gotovo svakoj laboratoriji. Ipak, metode za modifikovanje genoma organizama su do skoro bile relativno komplikovane i neefikasne. Sa primenom CRISPR-Cas9 tehnologije, metode za genomsko inženjerstvo konačno postaju izuzetno pristupačne široj naučnoj zajednici. To je ujedno i razlog zašto se stiče utisak da je revolucija u vezi sa genomskim inženjeringom počela relativno skoro. Međutim, razvoj ovih tehnologija je počeo krajem 1970-tih godina. Kao dokaz koncepta da endogeni lokus u eukariotskoj ćeliji može ciljano da se izmeni homologom rekombinacijom pomoći vektora donora ustanovljeno je 1979. godine u eksperimentima na pekarskom kvacsu (*Saccharomyces cerevisiae*) [1]. Ubrzo je sličan pristup primjenjen i na somatskim i embrionalnim ćelijama sisara u kulturi (slika 1) [2–4]. Relativno brzo nakon prvih uspešnih eksperimenata postaje jasno da je efikasnost uvođenja modifikacije u eukariotskim genomima na ovaj način izuzetno mala. Naime, ustanovljeno je da je homologna rekombinacija na ciljanom mestu u genomu u velikoj većini eukariotskih ćelija vrlo redak događaj, a donor vektor se uglavnom integriše na nasumičnom mestu u genomu. Tako je odsustvo homologne rekombinacije kod većine eukariotskih ćelija postala prepreka za masovniju primenu genomskog inženjeringa kako u naučne tako i u kliničke svrhe [5].

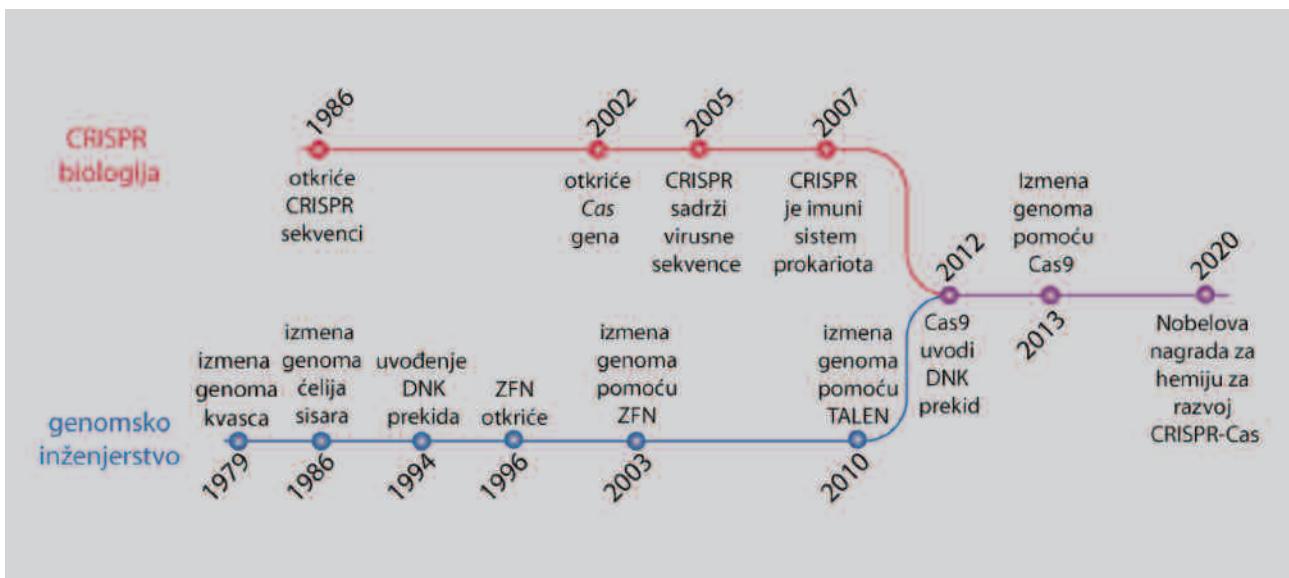
POČECI MODERNOG GENOMSKOG INŽENJERINGA - UVODENJE CILJANIH DVOLANČANIH PREKIDA U GENOM

Najveći izazov koji je trebalo da se prevaziđe jeste povećanje učestalosti homologne rekombinacije u somatskim ćelijama. Usled inertnosti endogenog lokusa, do homologne rekombinacije ne dolazi u odsustvu oštećenja DNK. Nakon oštećenja DNK, aktiviraju se mehanizmi popravke uključujući i reparaciju pomoći homologne rekombinacije. Stoga su prvi pristupi povećavanja stope rekombinacije bili bazirani na opštem oštećenju celokupne genomske DNK (uključujući i lokus od interesa) [6]. Ipak, problem kod opšteg oštećenja DNK jeste što sa sobom donosi i neželjene mutacije. Stoga je sledeći pristup bio uvođenje ciljanog dvolančanog prekida pomoći I-SceI (tkzv. „homing“ nukleaze) radi aktiviranja reparacije pomoći homologne rekombinacije [7]. Pristup pomoći „homing“ nukleaze je mnogo efikasniji od tadašnjih alternativa za genomsko inženjerstvo, ali ispostavilo se da nije lako naći odgovarajuće mesto sečenja „homing“ nukleaza, a praktično je nemoguće njihovo „programiranje“ tj. dizajniranje enzima da uvodi dvolančani prekid na tačno ciljanom mestu. Prva klasa enzima koja je mogla da se „programira“, tj. dizajnira da uvede prekid na specifičnoj sekvenci bile su sintetičke nukleaze sa cinkanim prstima (eng. zink finger nucleases, ZFN) [8,9]. Pri njihovom dizajnu je iskorишćena mogućnost da se specifični domeni sa cinkanim prstima vezuju za definisane sekvene. Kombinacijom nekoliko različitih domena sa cinkanim prstima postiže se specifično vezivanje za tačno odabranu sekvencu u genomu. Na kraju, dodavanjem FokI endonukleaznog domena za takav niz domena sa cinkanim prstima dobija se mesto-specifična nukleaza. Budući da FokI u formi dimera uvodi dvolančani prekid, neohodno je i za komplementarni lanac dizajnirati fuziju domena sa cinkanim prstima koji će se vezivati za tu sekvencu. Na ovaj način postiže se vrlo specifično uvođenje dvolančanog prekida u željenoj sekvenci. Promenom kombinacije domena sa cinkanim prstima može da se menja mesto tj. sekvenca gde će biti uveden dvolančani prekid [8,9]. Ipak, za veliku većinu naučno-istraživačkih laboratorijskih dizajniranje specifičnih ZFN je bilo isuviše kompleksno, i ova tehnologija nije našla na široku primenu u naučnoj zajednici [10]. Problem složenosti specifičnih endonukleaza je delimično rešen sa TALEN nukleazama (eng. Transcription activator-like effector nuclelease), koje koriste TALE domene koji prepoznaju samo jedan nukleotid, nasuprot domenima kod ZFN koji prepoznaju tri nukleotida [11]. ZFN i TALEN su pokazale da ciljano uvođenje dvolančanog prekida povećava efikasnost modifikovanja genoma. Poređenja radi, svi prethodni pristupi bazirani samo na homolognoj rekombinaciji su imali efikasnost 0.5–2% (sa selekcijom pomoći antibiotika), dok je efikasnost ZFN i TALEN drastično veća (5–30%, sa selekcijom pomoći antibiotika). Ipak, ovi enzimi su izuzetno komplikovani za dizajniranje, a sa druge strane relativno skupi ukoliko se komercijalno naručuju (1000–20000 USD). Upravo zbog te kompleksnosti nikad ZFN i TALEN nisu bile dovoljno pristupačne da bi genomski inženjering postao jedna od standardnih metoda u svim naučno-istraživačkim laboratorijama [10].

CRISPR-Cas9 SISTEM – OD INTRIGANTNE SEKVENCE SA NEPOZNATOM FUNKCIJOM DO NOBELOVE NAGRADE ZA RAZVOJ METODE ZA MODIFIKOVANJE GENOMA

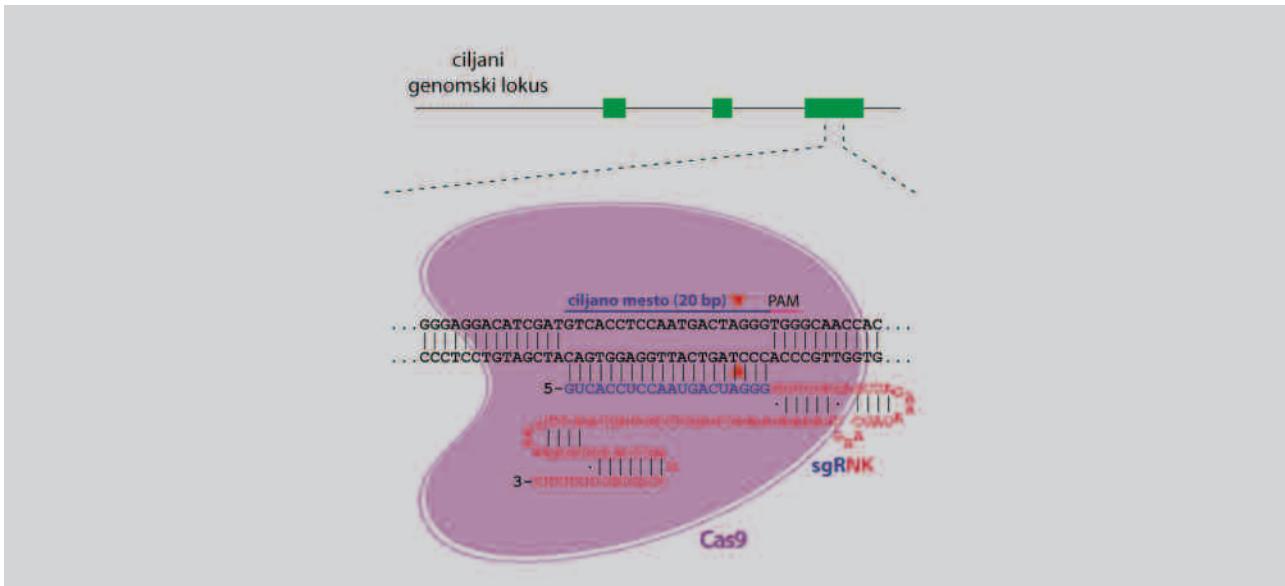
Paralelno sa razvojem metoda za genomski inženjering, sredinom 2000-tih godina se nekoliko laboratorijskih grupa proučavaju CRISPR (eng. Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats). Ove sekvene su opisane 1987. godine kao niz kratkih ponovljenih sekvenci između kojih se nalaze isto kratke ali jedinstvene sekvene u genomu bakterije *Escherichia coli* (slika 1) [12]. Kasnije su CRISPR sekvene otkrivene u brojnim bakterijama i arheama [13]. Osim

CRISPR sekvenci, identifikovane su i *cas* (eng. CRISPR associated) sekvence za koje je bioinformatički utvrđeno da mogu da kodiraju proteine sa nukleaznom i helikaznom aktivnošću [14]. Prve prepostavke su bile da CRISPR i *cas* genomski regioni imaju ulogu u popravci DNK ili regulaciji ekspresije drugih gena [14]. Do prodora u otkrivanju funkcije CRISPR sekvenci dolazi 2005. godine kada postaje jasno da jedinstvene sekvence u CRISPR regionu potiču od sekvenci virusa bakteriofaga [15]. Ubrzo potom dolazi do otkrića da CRISPR i *cas* sekvence predstavljaju elemente stečenog imunskog sistema bakterija. Naime, eksperimentalno je pokazano da jedinstvene sekvence u okviru CRISPR regiona predstavljaju „memoriju“ na prethodne virusne infekcije i da bakterije ugradnjom virusnih sekvenci u CRISPR region stiču imunitet na dati virus [16]. Sledecihi nekoliko godina je fokus bio na pronalaženju molekulskog mehanizma prepoznavanja virusnih sekvenci, njihove obrade, ugradnje u genom, transkripcije i samog mehanizma koji omogućava imunitet na dati virus. Ustanovljeno je da zapravo postoje tri različita tipa molekulskih mehanizama tj. tri različite klase CRISPR-cas sistema: klasa I, klasa II i klasa III [10]. U svim klasama postoje nukleaze koje koriste transkript iz CRISPR regiona da prepoznaju virusne sekvence koje su identične sa jedinstvenim sekvencama CRISPR regiona i uvedu dvolančani prekid u virusne sekvence. U kontekstu uvođenja dvolančanog prekida, zanimljivo je da u CRISPR-Cas klasi II tu ulogu ima samo jedan protein – Cas9 (slika 2) [17,18]. Pokazano je da se za Cas9 nukleazu vezuju dva RNK molekula, crRNK i tracrRNK (CRISPR RNK, eng. trans-activating crRNK). Dvolančani prekid se uvodi u sekvenci koja sadrži region dužine od oko 20 nukleotida koji je komplementaran sa crRNK sekvencom i nalazi se odmah uz PAM sekvencu (eng. Protospacer Adjacent Motif). PAM sekvenca je različita za Cas9 enzime različitih vrsta, a za najčešće korišćen Cas9 (izolovan iz *Streptococcus pyogenes*) ta sekvenca je NGG, gde je N bilo koji od četiri nukleotida.



Slika 1. Šematski prikaz razvoja genomskog inženjerstva i CRISPR biologije. Razvoj metoda za genomsko inženjerstvo je šematski prikazan na plavoj liniji, dok je razvoj CRISPR biologije prikazan na crvenoj liniji. Ključni događaji su označeni, kao i godina kada su se dogodili. Trenutak spajanja ova dva naučna polja (u ljubičastu liniju na slici) se dogodio 2012. godine kada je pokazano da je Cas9 RNK-vodena DNK endonukleaza. Nedugo zatim je 2013. godine pokazano da Cas9 može da se koristi za modifikovanje genoma.

Nakon opisivanja molekulskog mehanizma delovanja Cas9, vrlo brzo postaje jasno da bi bilo moguće iskoristiti Cas9 za uvođenje specifičnih i ciljanih dvolančanih prekida u genomu eukariotskih ćelija [19–21]. Dodatno, CRISPR-Cas9 sistem je pojednostavljen time što su cr- i tracrRNK spojene u jedan molekul sgRNK (eng. single guide RNK) (slika 2). Prve studije su pokazale da CRISPR-Cas9 ima sličnu efikasnost kao ZFN ili TALEN, ali dizajn CRISPR-Cas9 sistema je drastično jednostavniji i pristupačniji [19–21]. Naime, dovoljno je da se uklonira kratka sekvenca od 20 nukleotida u plazmid za ekspresiju gRNK i Cas9 i počne sa genomskim inženjeringom. Poređenja radi, dizajn ZFN ili TALEN nukleaza traje oko 2 meseca, dok je za dizajn gRNK dovoljno par sati. Takođe, molekulsko kloniranje plazmida za ZFN ili TALEN traje oko 3 nedelje, dok molekulsko kloniranje u slučaju CRISPR-Cas9 tehnologije traje oko 3 dana. I konačno, zbog kompleksnosti su se ZFN i TALEN nukleaze uglavnom naručivale komercijalno dok je CRISPR-Cas9 gotovo svako mogao da dizajnira a hemikalije (tj. oligonukleotidi) koštaju veoma malo (svega 50 USD). Stoga je, u kratkom vremenskom periodu, genomski inženjerering pomoću CRISPR-Cas9 tehnologije postao dostupan gotovo svakoj laboratoriji u svetu. Konačno, kao potvrda značaja ove tehnologije za biomedicinske nauke i nauku uopšte, za „razvoj CRISPR-Cas9 metode za uređivanje genoma“ dodeljena je Nobelova nagrada za hemiju 2020. godine. Nobelovu nagradu su doobile Dženifer Dudna (eng. Jennifer Doudna) i Emanuel Šarpentje (fra. Emmanuelle Charpentier), naučnice koje su u svojim bazičnim istraživanjima pokazale da je Cas9 nukleaza vođena pomoću cr- i tracrRNK [17].



Slika 2. Šematski prikaz Cas9 endonukleaze i sgRNK. Cas9 endonukleaza iz *Streptococcus pyogenes* (ljubičasto) je prikazana na slici. Ciljano mesto je obeleženo plavom linijom, a odmah uz njega je PAM sekvenca koja je u slučaju *S.pyogenes* Cas9 NGG. Može se primetiti kako je 5' - kraj sgRNK komplementaran sa antiparalelnim lancem ciljanog mesta (plavo obojeni nukleotidi). Ostatak sgRNK (crveno obojeni nukleotidi) ima strukturu ulogu vezivanja za Cas9. Crvenim trouglovima je obeleženo mesto gde se uvodi dvolančani prekid (blizu PAM mesta).

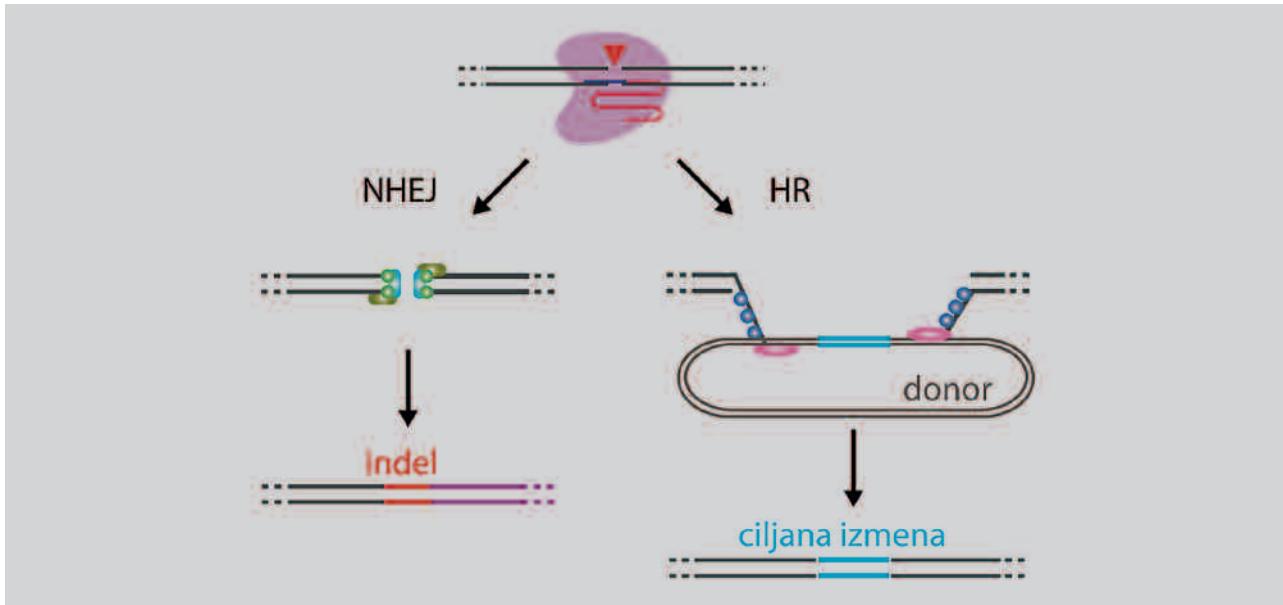
PRIMENA CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE U BAZIČNIM ISTRAŽIVANJIMA

U ovom revijskom radu fokus je na do sada najširoj primeni CRISPR-Cas tehnologije, a to je pravljenje ćelijskih linija sa ciljanim modifikacijama u genomu. CRISPR-Cas tehnologija se u bazičnim istraživanjima najčeće koristi za ispitivanje funkcije proteina kroz modifikaciju gena koji kodira dati protein. Treba istaći da se isti principi koriste i za pravljenje model organizama (npr. miševa, zebriča), a protokoli i vektori su prilagođeni fiziologiji i razviću odgovarajućeg model organizma.

Strategije za genomske modifikacije protein-kodirajućih gena se u suštini dele na dve kategorije – „knockout“ i „knock-in“ pristup (slika 3). Pri „knockout“ pristupu se radi ciljana potpuna inaktivacija gena, dok se pri „knock-in“ pristupu uvodi ciljana i specifična izmena postojećeg gena [5,10,22]. Oba pristupa počinju uvođenjem ciljanog i specifičnog dvolančanog prekida u genom. Uvedeni dvolančani prekid ćelije mogu da „poprave“ na dva načina – nehomolognim spajanjem krajeva (*eng.* non homologous end joining, NHEJ) i reparacijom putem rekombinacije (*eng.* homology directed repair, HDR) (slika 3). Somatske diferencirane ćelije dvolančani prekid najčešće popravljaju nehomolognim spajanjem krajeva [5,10]. Treba imati na umu da je NHEJ reparacioni put sklon „sitnim“ greškama koje podrazumevaju male insercije ili delekcije (obično od nekoliko baznih parova). U tehničkom smislu pravljenja genomske modifikacije, NHEJ može da dovede do promene okvira čitanja ukoliko se modifikacija vrši unutar egzona koji su deo otvorenog okvira čitanja. Drugim rečima, dovoljno je samo uvesti dvolančani prekid pomoću CRISPR-Cas9 kako bi se napravila ćelijska linija u kojoj nema ciljanog proteina [23]. Efikasnost pravljenja izmenjenih ćelijskih linija na ovaj način direktno zavisi od dva činioca – efikasnosti transfekcije ćelija i efikasnosti Cas9-sgRNK da uvedi dvolančani prekid. Efikasnost transfekcije je obično poznata za datu ćelijsku liniju i metodu transfekcije, dok efikasnost sečenja Cas9 zavisi od sgRNK. Brojni razlozi utiču na ovu efikasnost, a najčešće se navodi pozicija ciljne sekvence u okviru nukleozoma [19–21]. Preporuka je dizajnirati makar tri različite sgRNK, testirati njihove efikasnosti sečenja i tipično će makar jedna sgRNK imati efikasnost sečenja 5–15% [23].

U „knock-in“ pristupu je cilj da se izmeni ili uvede nova sekvenca u genom (npr. specifična mutacija ili dodatna sekvenca za „tagovanje“ proteina). Tada je potrebno, osim CRISPR-Cas9 vektora zbog dvolančanog prekida, uvesti u ćeliju i vektor donor. Vektor donor sadrži ciljanu sekvencu koja se uvedi u genom, i nizove nukleotida uzvodno i nizvodno od ciljane sekvence koji su komplementarni sa genomske regionom gde će se uvesti promena. Nakon uvođenja dvolančanog prekida, ćelija može taj prekid da popravi NHEJ ili HDR reparacionim putem. Popravka NHEJ putem ne dovedi do integracije donor vektora u genom. Međutim, ukoliko ćelija popravi dvolančani prekid pomoću HDR, dolazi do rekombinacije sa regionom koji je komplementaran sa oštećenim regionom [5]. U fiziološkom smislu, to je sestrinska hromatida oštećenog regiona, a u kontekstu izmene genoma za HDR može da se iskoristi sekvenca vektora donora i da se praktično integriše donor u genom [10,24,25]. Na taj način se postiže ciljana promena sekvence genoma sa željenom sekvencom. Efikasnost dobijanja knock-in ćelijskih linija zavisi od nekoliko faktora: 1) efikasnosti transfekcije,

2) efikasnosti uvođenja dvolančanog prekida i 3) učestalosti popravke dvolančanog prekida rekombinacijom. Prva dva faktora su ista kao i u knockout pristupu, a učestalost popravke dvolančanog prekida pomoću HDR je ograničavajući faktor u ovom slučaju. Ovaj faktor zavisi od tipa ćelijske linije, ali je relativno mali u diferenciranim somatskim ćelijama. Tipično je učestalost popravke pomoću HDR na odgovarajućem mestu oko 1:100-1:100,000 ćelija [5]. Budući da su ovo relativno retki događaji, vektor donor najčešće sadrži i genetički element koji će omogućiti selekciju. Tipično je to gen za rezistenciju na neki od eukariotskih antibiotika (npr. neomicin ili puromocin) ili npr. gen koji kodira za zeleni fluorescentni protein (GFP) koji omogućava sortiranje ćelija pomoću fluorescencije. I pored selekcije, treba imati na umu da će najveći broj klonskih ćelijskih linija biti linije koje imaju nasumičnu integraciju vektora donora negde u genomu, najčešće ne u ciljanom regionu.



Slika 3. Modifikovanje genoma pomoću ciljanog dvolančanog prekida u molekulu DNK. Cas9 (ljubičasto) uvodi dvolančani prekid na ciljanom mestu molekula DNA (dve crne linije). Takav prekid može da se popravi pomoću nehomolognog spajanja krajeva (NHEJ, levo) ili rekombinacionog reparacionog puta (HR, desno). U slučaju popravke pomoću NHEJ, nastaju male insercije ili delecije (Indel, crveno) na popravljenom molekulu DNA. Take insercije ili delecije mogu dovesti do nizvodne promene okvira čitanja (deo molekula DNA označen ljubičasto). U slučaju popravke rekombinacionim reparacionim putem, slobodni krajevi molekula DNA se obrađuju i formiraju tzv. invazivne lance. Takvi invazivni lanci mogu biti spareni sa drugim DNA molekulom sa kojim imaju homologiju. U ovom kontekstu to može da bude vektor donor koji sadrži pored homologne sekvene i ciljanu izmenu koja će biti uvedena u genom (svetlo plavo).

UVOĐENJE NESPECIFIČNIH DVOLANČANIH PREKIDA

Nijedna od trenutnih metoda za genomsko inženjerstvo zasnovano na uvođenju dvolančanog prekida (ZFN, TALEN, CRISPR) nije savršeno specifična. Za sve pomenute tehnologije je pokazano da se dvolančani prekid, pored ciljanog mesta, uvodi i na drugim (neželjenim, eng. off-target) mestima u genomu [5]. U slučaju CRISPR tehnologije, već sa prvim *in vitro* studijama je pokazano da Cas9 nije apsolutno specifičan enzim, i da može da uvede dvolančani prekid i u sekvenci koja je samo delimično komplementarna sekvenci gRNK [17]. Slični rezultati su dobijeni i u eukariotskim ćelijama i model organizmima [26–29]. Sve studije u kojima je ispitivana učestalost uvođenja nespecifičnih dvolančanih prekida su pokazale da ona uglavnom zavisi od dva faktora. Prvi faktor jeste pozicija nekomplementarnih nukleotida na sgRNK. Naime, nespecifični dvolančani prekidi se češće uvođe ukoliko se radi o „nepoklapanju“ sekvenci distalno od PAM mesta (5' kraj gRNK). Drugi faktor je sam broj nekomplementarnih baznih parova. Npr. ukoliko se na 5' kraju sgRNK, distalno od PAM mesta, razlikuje jedan nukleotid, efikasnost uvođenja nespecifičnog dvolančanog prekida je uporediva sa učestalošću specifičnog dvolančanog prekida u ciljanoj sekvenci. Sa tri i više nukleotida razlike, učestalost uvođenja nespecifičnog dvolančanog prekida dramatično opada [26–28]. Nezavisno od toga kolika je verovatnoća da se uvede nespecifična promena u genomu, potrebno je naglasiti da za sve primene CRISPR-Cas9 tehnologije treba pretpostaviti da ona u ovom trenutku nije jednaka nuli, i u skladu sa tim voditi računa o dizajnu naučno-istraživačke studije, ili kliničkoj primeni ove tehnologije.

U kontekstu naučno istraživačkog rada, potrebno je dokazati da je bilo koji fenotip posledica izmene ciljanog gena, a ne neke mutacije koja je posledica nespecifičnosti Cas9 enzima. Jedan od mogućih pristupa ovom problemu jeste da se svaki fenotip demonstrira u barem dve nezavisne klonske ćelijske linije [23]. Drugi način potvrđivanja specifičnosti fenotipa jeste da se uradi tzv. „rescue“ eksperiment. Pri izvođenju „rescue“ eksperimenta, potrebno je povratiti funkciju

gena od interesa u ćeliji. To se može uraditi egzogeno transfekcijom ili transdukcijom (plazmid ili virus), ili povratkom endogenog gena pomoću CRISPR-Cas9 tehnologije [30,31]. Ukoliko nakon povratka funkcionalnog gena dođe do reverzije pokazanog fenotipa, jasno je da je dati fenotip posledica promene na datom genu od interesa a ne nespecifične promene u genomu. U kontekstu model organizama, moguće je npr. i uvesti promenu u ciljani deo genoma, i onda pomoću nekoliko generacija ukrštanja sa životinjama divljeg soja postići eliminaciju svih neželjenih promena u genomu [5]. Sve ove metode najviše zavise od eksperimentalnih mogućnosti koje su najčešće određene samim model organizmom. Nezavisno od model organizma, za bilo koje naučno istraživanje u kojem se koristi genomski inženjering, potrebno je pokazati da je određena promena posledica ciljane promene a ne nespecifično uvedene mutacije.

Sa druge strane, u kliničkoj praksi važi praktično nulta tolerancija na uvođenje nespecifičnih promena u genom. Ovo je, pored tehničkih poteškoća „dostave“ komponenti CRISPR-Cas sistema u živim organizmima, najveća prepreka za iskorišćenje punog potencijala CRISPR-Cas tehnologije u kliničkoj praksi. Naime, svaka nespecifična mutacija uvedena modifikovanjem genoma u kliničkoj praksi znači da se povećava potencijal za kasnije komplikacije (npr. aktiviranje onkogena) [32].

Dalja naučna istraživanja, a naročito primena genomskega inženjeringu u kliničkoj praksi, predstavljaju snažne podsticaje za dalje unapređenje CRISPR-Cas tehnologije, naročito u poboljšavanju specifičnosti izmena u genomu. Trenutno se ovakva unapređenja razvijaju u dva relativno nezavisna pravca – usavršavanje bioinformatičkih alata za dizajn sgRNK i usavršavanje eksperimentalnih metoda za genomsko inženjerstvo. U kontekstu bioinformatičkog usavršavanja, prisutan je trend pravljenja sve boljih alata za dizajniranje specifičnih sgRNK koji uzimaju u obzir sve prethodne publikacije o nespecifičnosti Cas9 [33]. Što se tiče samih eksperimentalnih metoda, paralelno se radi na nekoliko različitih pristupa usavršavanja CRISPR-Cas specifičnosti. Jedan od predloga za povećanje specifičnosti jeste da se zapravo smanji količina Cas9 proteina i sgRNK tj. da se preciznije doziraju [27]. Na ovaj način je pokazano da se povećava specifičnost, ali treba imati na umu da se ipak smanjuje i efikasnost uvođenja ciljanog prekida. Druga mogućnost je uvođenje bliskih jednolančanih prekida pomoću izmenjenog Cas9 (eng. nickase Cas9) navođenog pomoću dve različite sgRNK [34]. Pokazano je da se na ovaj način smanjuje uvođenje nespecifičnih mutacija 50 do 1500 puta. Alternativno, postoje pristupi za ciljane izmene Cas9 proteina koje ga čine drastično specifičnijim. Primer je Cas9-HF (eng. high fidelity) koji je specifičan do te mere da nije moguće detektovati nespecifične dvolančane prekide [35]. Sva ova potencijalna rešenja nisu međusobno isključiva i verovatno će kombinacija različitih pristupa rezultirati alatima koji su apsolutno specifični.

KLINIČKA PRIMENA CRISPR-Cas

Primena CRISPR-Cas u kliničkoj praksi je u početnoj fazi, ima izuzetan potencijal, ali je teško predvideti njene domete u budućnosti. Dva najveća izazova na koje treba odgovoriti u ovom trenutku su onemogućavanje uvođenja nespecifičnih promena u genomu i rešenje dostave CRISPR-Cas efektora do specifičnih ćelija u organizmu, što je opšti izazov za sve genetički dizajnirane terapije [36]. Trenutno je aktuelno nekoliko desetina kliničkih ispitivanja u kojima se primenjuje CRISPR-Cas i suštinski se sve kliničke primene u ovom trenutku mogu podeliti u dve velike kategorije: *ex vivo* i *in vivo* [37].

EX VIVO KLINIČKA PRIMENA CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE

Pri *ex vivo* primeni tehnologija za genomski inženjering, ćelije se uzimaju od pacijenta ili donora, zatim se izolovane ćelije modifikuju *in vitro*, i konačno se modifikovane ćelije vraćaju nazad u pacijenta [37]. Najveća prednost *ex vivo* primene CRISPR-Cas tehnologije se ogleda u tome što je tehnički jednostavnije izvršiti genomsku modifikaciju ćelija *in vitro* nego u samom organizmu. Nedostatak *ex vivo* pristupa je to što je ograničen na ćelije koje je moguće izolovati i kasnije vratiti u pacijenta [36,37]. Ovaj pristup se trenutno koristi gotovo isključivo za T limfocite ili hematopoetske matične ćelije. Već sada postoji praksa transplantacije T limfocita ili hematopoetskih stem ćelija iz zdravih donora u pacijenta, ali tek 20% pacijenata nađe odgovarajućeg donora za ovakve procedure [38]. Stoga, pristup genomskom inženjeringu ćelija samog pacijenta ima veliki potencijal jer nije potrebno tražiti odgovarajućeg donora za proceduru transplantacije. Kada je reč o bolestima koje imaju potencijal da se leče na ovaj način, veliki broj ispitivanja je vezan za HIV infekciju, srpsku anemiju, β-talasemiju, kao i za reprogramiranje ćelija imunog sistema zarad efikasnijeg odgovora na ćelije kancera [36]. U kontekstu HIV infekcije, fokus je na genomskim modifikacijama CCR5 gena (koreceptora za HIV) u hematopoetskim matičnim ćelijama i CD4+ ćelijama [37]. Postoje indikacije da bi ovaj terapijski pristup mogao biti delimično efikasan, jer je izgleda pored eliminacije CCR5 koreceptora potrebno eliminisati još jedan koreceptor virusa – CXCR4. Sličan terapijski pristup je bio dizajniran pomoću ZFN, ali se očekuje da će CRISPR-Cas tehnologija biti uspešnija jer je adekvatnija za istovremene i višestruke izmene u genomu (korišćenjem većeg broja gRNK molekula, ume-

sto celokupnih plazmida za različite ZFN proteine) [39]. Dok je HIV terapija bila u fokusu na početku prvih CRISPR kliničkih ispitivanja, trenutno se najviše radi na direktnim modifikacijama mutacije za srpastu anemiju i β-talasemiju u genomu, a u poslednje vreme je sve više istraživanja vezanih za modifikovanje ćelija imunog sistema radi poboljšanja odgovora na kancer [37]. Sve ove tehnologije za sada pokazuju veliki potencijal i postoje naznake da će opravdati velika očekivanja. Od posebne važnosti je dugoročno praćenje osoba podvrgnutih ovakvim terapijama kako bi se ispitale eventualne nepredvidive i neočekivane komplikacije nastale kao posledica genomske terapije.

IN VIVO KLINIČKA PRIMENA CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE

U toku su i kliničke studije sa *in vivo* pristupom genomskom inženjeringu pomoću CRISPR-Cas sistema, mada je njihov broj manji od broja *ex vivo* studija [37]. Najveća prepreka za ovu vrstu primene CRISPR-Cas tehnologije je zapravo ograničenost metoda za dostavu odgovarajućih CRISPR-Cas efektora (plazmida, iRNK ili proteina) do ciljanih ćelija u organizmu. Upravo je ovaj razlog najviše doprineo da se sve kliničke CRISPR-Cas *in vivo* studije rade u tkivima koja su pristupačnija za transfekciju, kao što su oko, jetra i cerviks [36]. Trenutno je najveći broj studija fokusiran na eliminaciju HPV18 i HPV16 onkogena iz genoma u cerviku. Paralelno sa CRISPR-Cas tehnologijom, u drugim kliničkim studijama se koriste ZFN i TALEN za iste ili slične modifikacije genoma. Ove studije se prate sa velikom pažnjom jer će moći direktno da se uporede sve tri najzastupljenije tehnologije genomskega inženjerstva [37]. Studija koja je najviše napredovala sa CRISPR primenom *in vivo* jeste pristup za genomsko lečenje transtiretinske amiloidoze [40]. U ovoj bolesti mutacija čini transteritin toksičnim usled pogrešenog konformacionog savijanja. Terapija se zasniva na deleciji mutacije u *TTR* genu pomoću CRISPR efektora - Cas9 iRNK i jedne sgRNK, koji se dostavljaju u hepatocite pomoću lipidnih nanočestica. Prvi rezultati su vrlo ohrabrujući jer su pokazali smanjenje količine mutiranog *TTR* u krvi i do 87% [40]. Navedene terapije su i dalje eksperimentalnog karaktera, a pacijenti će biti dugoročno praćeni pre nego što CRISPR-Cas terapija postane dostupnija široj populaciji.

Osim genomskog inženjeringa somatskih ćelija, u poslednje vreme se sve više govori o genomskom inženjeringu polnih ćelija, a čak i ljudskih embriona. Štaviše, nekoliko studija je već dokazalo mogućnost modifikovanja genoma ljudskih embriona [41,42]. Ipak, sa velikim iznenađenjem je dočekana vest o rođenju bliznakinja kojima je pomoću CRISPR-Cas9 modifikovan *CCR5* gen u NR Kini. Tom studijom je rukovodio He Jiankui sa Univerziteta za nauku i tehnologiju u Šendženu (NR Kina). Trenutno nije moguće naći nikakve dokaze da su takve tvrdnje tačne, niti bilo kakav naučni rad koji bi izneo podatke da potvrdi takve tvrdnje. U tom smislu, teško je komentarisati takav slučaj jer zapravo gotovo ništa nije poznato od eksperimentalnih podataka. Jedino što je izvesno u ovom slučaju jeste da nije postojala nikakva etička dozvola za ovaku vrstu intervencije na ljudskim embrionima. U ovom trenutku prema zvaničnim saznanjima nema nijedne osobe koja je rođena sa modifikovanim genomom. Ipak, ovaj slučaj je podstakao mnoga regulatorna tela da uzmu u razmatranje etičku stranu i opravdanost menjanja genoma ljudi. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je nedavno izdala savetodavni dokument gde se detaljno razmatra etička strana menjanja ljudskog genoma u različitim slučajevima (npr. postnatalno somatske ćelije, ili polne ćelije) [43].

Još jednom treba istaći da je za budućnost CRISPR-Cas tehnologije i menjanja genoma u terapiji od suštinskog značaja dugoročni ishod brojnih kliničkih studija koje se trenutno izvode. Trenutni rezultati su relativno povoljni, ali treba sagledati potencijalne posledice na osnovu kojih će se proceniti opravdanost korišćenja ove tehnologije [37].

DODATNE PRIMENE CRISPR-Cas TEHNOLOGIJE

Iako je fokus ovog rada na upotrebi CRISPR-Cas tehnologije za uvođenje specifičnog dvolančanog prekida na molekulu DNK, važno je napomenuti i druge primene. Neke eksperimentalne potrebe ne zahtevaju uvođenje DNK prekida, već mogu CRISPR-Cas tehnologiju da iskoriste samo kao platformu za vezivanje za specifičnu DNK sekvencu. U takvoj ulozi se najčešće koristi mutant Cas9 koji nema nukleaznu aktivnost – dCas9 (*eng. deactivated Cas9*) [10]. Kao takav, dCas9 se koristi kao molekul-nosač za koji se vezuju drugi proteini efektori u zavisnosti od potrebe eksperimenta. Tako je npr. moguće koristiti CRISPR-Cas tehnologiju za transkripcionu aktivaciju (fuzijom sa VP64) ili represiju (fuzijom sa KBAB) [44]. Fuzijom GFP-dCas9 može da se obeleži određeni genomski lokus za proučavanje dinamike hromozoma u živim ćelijama. dCas9 je moguće koristiti i u epigenetičkim istraživanjima i to za acetilaciju histona (fuzijom sa p300), DNK metilaciju i demetilaciju (fuzija sa DNMT3a i TET1) [44,45].

Zanimljivo je da CRISPR-Cas tehnologija ima i veliki potencijal za razvoj novih tipova dijagnostičkih testova. Veliki potencijal ove tehnologije se ogleda u brzini razvoja i činjenici da ne zahteva složenu laboratorijsku aparaturu a može čak i da se prilagodi za vizuelnu detekciju (npr. imunohromatografski ili kolorimetrijski). Zbog ovih osobina i trenutne pandemije je veliki fokus na CRISPR-Cas tehnologiji u kontekstu detekcije SARS-CoV-2 [46,47], ali treba napomenuti da je još uvek teško sagledati potencijal ove relativno mlade dijagnostičke tehnologije.

ZAKLJUČAK

CRISPR-Cas tehnologija je već napravila revoluciju u biomedicinskim naukama i bez sumnje će nastaviti da omogućava brojne prodore u biologiji i medicini u budućnosti. Osim genomskog inženjeringu, CRISPR-Cas tehnologija se može primeniti i za selektivno obeležavanje genoma, modifikovanje epigenoma i u dijagnostičke svrhe. Uz sve potencijalne primene, postaje jasno da će ova tehnologija imati veliki uticaj ne samo na biomedicinske nauke, već i na celokupno društvo. Široka pristupačnost tehnologija za modifikovanje genoma sa sobom donosi velike koristi, ali potrebno je napomenuti da donosi i velike etičke dileme. Sigurno je da će u rešavanju etičkih dilema morati da postoji konsezus kojem u velikoj meri već doprinose naučnici, lekari, ali i ljudi kojima ove tehnologije nisu bliske a imaju ulogu u kreiranju regulative u vezi sa genomskim inženjeringom [43]. Svakako da će konsenzus o upotrebi CRISPR-Cas tehnologije zavisiti dobrom delom i od rezultata kliničkih ispitivanja koja se trenutno sprovode. Sa pažnjom ćemo svi pratiti dugoročne efekte ovih kliničkih ispitivanja jer će uticati na to gde će se postaviti etička granica modifikovanja genoma. A do tada, CRISPR-Cas tehnologija je sigurno postala jedna od osnovnih metoda u molekularnoj biologiji i praktičemo razvoj tehnika koje se na njoj baziraju.

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se Prof. Dr Dušanki Savić-Pavićević, Dr Meliti Vidaković i Dr Snežani Kojić na izuzetno korisnim sugestijama tokom pisanja rada. Autor je član „Returning expert“ programa (Centrum für internationale Migration und Entwicklung, SR Nemačka).

LITERATURA

1. Scherer S, Davis RW. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;
2. Smithies O, Ronald G, Boggs S, Koralewski M, Kucherlapati R. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985;317:230–4.
3. Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*. 1986;44(3):419–28.
4. Thomas K, Capecchi M. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51:503–12.
5. Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annual Review of Biochemistry*. 2014.
6. Latt SA. Sister chromatid exchange formation. *Annu Rev Genet*. 1981;15:11–55.
7. Rouet P, Smith F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8096–106.
8. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1156–60.
9. Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* (80-). 2003;300(5620):764.
10. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014.
11. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):756–61.
12. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakatura A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429–33.
13. Mojica F, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. 2000;36:244–6.
14. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(2):482–96.
15. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60(2):174–82.
16. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* (80-). 2007;315(5819):1709–12.
17. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease Sfigs. *Science* (80-). 2012;
18. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):2579–86.
19. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* (80-). 2013;339(6121):823–6.
20. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. 2013;2013(2).
21. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819–23.
22. Uddin B, Chen NP, Panic M, Schiebel E. Genome editing through large insertion leads to the skipping of targeted exon. *BMC Genomics*. 2015;16(1).
23. Chen N-P, Uddin B, Hardt R, Ding W, Panic M, Lucibello I, et al. Human phosphatase CDC14A regulates actin organization through dephosphorylation of epithelial protein lost in neoplasm. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(20):5201–6.

24. Hilbert M, Noga A, Frey D, Hamel V, Guichard P, Kraatz SHW, et al. SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriole architecture. *Nat Cell Biol.* 2016;18(4):393–403.
25. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–308.
26. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reynd D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;
27. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;
28. Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol.* 2013;
29. Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 2013;
30. Jin J, Xu Y, Huo L, Ma L, Scott AW, Pizzi MP, et al. An improved strategy for CRISPR/Cas9 gene knockout and subsequent wildtype and mutant gene rescue. *PLoS One.* 2020;
31. Mazo G, Soplop N, Wang WJ, Uryu K, Tsou MFB. Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia. *Dev Cell.* 2016;39(4):424–37.
32. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science (80-).* 2003;
33. Chuai G hui, Wang QL, Liu Q. In Silico Meets In Vivo: Towards Computational CRISPR-Based sgRNA Design. *Trends in Biotechnology.* 2017.
34. Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity A B C Figure 2. Double Nicking Facilitates Efficient Genome Editing in Human Cells. *Cell.* 2013;
35. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;
36. Foss D V., Hochstrasser ML, Wilson RC. Clinical applications of CRISPR-based genome editing and diagnostics. *Transfusion.* 2019;59(4):1389–99.
37. Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, Carney JP, Butler KS. Gene editing and CRISPR in the clinic: Current and future perspectives. *Biosci Rep.* 2020;40(4).
38. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252–60.
39. Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Hum Gene Ther.* 2018;29(1):51–67.
40. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2021;1–10.
41. Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, Fogarty NME, Kubikova N, Hardman E, et al. Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(22).
42. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363–72.
43. WHO Expert Advisory Committee on Developing Global Standards for Governance and Oversight of Human Genome Editing. Human genome editing: a framework for governance. Geneva; 2021.
44. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9(1).
45. Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, Bockor L, Korac P, Julg B, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(12):5615–28.
46. Abudayyeh OO, Gootenberg JS. CRISPR diagnostics. *Science (80-).* 2021;372(6545):914–5.
47. Xiong E, Jiang L, Tian T, Hu M, Yue H, Huang M, et al. Simultaneous Dual-Gene Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on CRISPR/Cas9-Mediated Lateral Flow Assay. *Angew Chemie - Int Ed.* 2021;60(10):5307–15.

Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika

Anita Skakić, Maja Stojiljković

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu,

Kontakt: maja.stojiljkovic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

CRISPR/Cas9 (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*) je prirodni alat za editovanje genoma usvojen iz prokariotskog adaptivnog imunskog odbrambenog sistema. Zbog svoje visoke efikasnosti i preciznosti, protein Cas9 koji pripada CRISPR sistemu klase II, pronašao je primenu u mnogim poljima nauke. Editovanje genoma zasnovano na tehnologiji CRISPR/Cas9 predstavlja jedan od najperspektivnijih alata za lečenje humanih bolesti sa genetičkom osnovom, uključujući kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne poremećaje i različite vrste tumora. Genska terapija zasnovana na CRISPR/Cas9 opsežno se proučava u pretkliničkim i kliničkim studijama. Editovanje genoma CRISPR/Cas9 je takođe robustan alat za stvaranje *in vitro* ćelijskih i životinjskih model sistema za istraživanje i lečenje genetičkih bolesti, posebno bolesti povezanih sa tačkastim promenama. U ovom radu, osvrnućemo se kratko na istoriju i mehanizam sistema CRISPR/Cas9, različite metodološke pristupe, napraviti pregled primena u biomedicini i opisati njegovu ulogu u razvoju novih molekularnih terapeutika za retke nasledne bolesti.

Ključne reči: CRISPR/Cas9, editovanje genoma, genska terapija, *in vitro* i životinjski model sistemi, retke bolesti, molekularni terapeutici

Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics

Anita Skakic, Maja Stojiljkovic

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

Correspondence: maja.stojiljkovic@imgge.bg.ac.rs

42

Abstract

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) is a naturally occurring genome editing tool adopted from the prokaryotic adaptive immune defense system. Due to its high efficiency and precision, the Cas9 protein derived from the type II CRISPR system, has found applications in many fields of science. Currently, CRISPR/Cas9-based genome editing has become one of the most promising tools for treating human genetic diseases, including cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, and various types of tumors. CRISPR/Cas9-based gene therapy is extensively studied in preclinic and clinic treatments. CRISPR/Cas9 genome editing is also a robust tool to create *in vitro* cellular and animal model systems for investigating and treating human genetic disorders, particularly diseases associated with point mutations. Therefore, in this review, we will present a brief history and mechanism of the CRISPR/Cas9 system. We will also describe the different methodological approaches, review applications in biomedicine and describe its role in the development of new molecular therapeutics for rare inherited diseases.

Key words: CRISPR/Cas9, genome editing, gene therapy, *in vitro* and animal model systems, rare diseases, molecular therapeutics

1. UVOD

CRISPR/Cas9 (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*) tehnologija predstavlja revolucionarnu metodu koja je privukla pažnju naučnika širom sveta iz razloga što omogućava precizno editovanje genoma različitih tipova ćelija i organizama. CRISPR/Cas9 je u literaturi opisana kao RNK molekulom posredovana adaptivna odbrana imunskog sistema bakterija i arheja od invazije virusa i plazmida (1). Ovaj sistem prvo je otkriven 1980. godine u *Escherichia coli* (2), ali njegova funkcija nije potvrđena sve do 2007. godine kada je pokazano da *Streptococcus thermophilus* može steći otpornost na bakteriofag integracijom infektivnog genetičkog fragmenta u svoj CRISPR lokus (3). Od tada, ovaj novootkriveni sistem ubrzo je modifikovan kako bi se koristio kao alat za editovanje željenih regiona u različitim genomima (4).

Otkako je prepoznata 2012. godine (1, 5), tehnologija editovanja genoma CRISPR/Cas9 brzo je razvijena i primenjena u mnogim biološkim i biomedicinskim poljima. Naročito je u poslednjih 5 godina ova tehnologija značajno modifikovana i poboljšana u različite osnovne i primenjene istraživačke svrhe, uključujući biotehnološku primenu u poljoprivredi i biomedicini. Na osnovu svojih karakteristika i potencijala za editovanje željenih regiona gena, formiranje novih model sistema kako za funkcionalne studije, tako i za testiranje novih molekularnih terapeutika, CRISPR/Cas9 privukao je veliku pažnju u lečenju mnogih bolesti sa genetičkom osnovom. Stoga se čini da je tehnologija CRISPR/Cas9 napravila revoluciju u molekularnoj biologiji i medicini. Kao potvrda značaja ovog otkrića, godine 2020. Emanuel Šarpentije i Dženifer Dudna dobitne su Nobelovu nagradu za hemiju za otkriće CRISPR/Cas genetskih makaza, jednog od najmoćnijih alata za editovanje genoma.

Zbog svoje preciznosti i pojednostavljenjog editovanja genoma, CRISPR/Cas se takođe koristi za razvoj genske terapije sa ogromnim potencijalom, koja uključuje editovanje, regulaciju i praćenje pojedinačnih gena na genomskom i epigenomskom nivou (6). Stoga, u ovom radu osvrnućemo se na mehanizam delovanja i različite metodološke prištupe, napraviti pregled primena u biomedicini i opisati njenu ulogu u razvoju novih molekularnih terapeutika za retke nasledne bolesti.

2. KLASIFIKACIJA SISTEMA CRISPR/Cas

CRISPR/Cas predstavlja bakterijski adaptivni imuni sistem koji koristi RNK molekulom vođenu nukleazu za odstranjivanje stranog genetičkog materijala uvođenjem dvolančanih prekida u DNK ili RNK molekul (7-9). Do sada su identifikovane dve glavne klase CRISPR/Cas sistema koji ukupno sadrže šest tipova i 33 podtipova (4). Ukupna klasifikacija i njihove opšte karakteristike sumirane su u Tabeli 1.

Klasa	Tip	Efektorski kompleksi	Nukleazni domen	Targetna sekvenca
I	I		HD ¹ fuzionisan sa Cas3	
	III	Više Cas proteina u zavisnosti od tipa i podtipa – Cas3 (nekad fuzionisan sa Cas2), Cas5-Cas8, Cas10, Cas11	HD fuzionisan sa Cas10	
	IV		Nepoznat	DNK
II	II	Cas9	RuvC i HNH ²	
	V	Cas12a (Cpf1)/Cas12b/Cas12c/Cas12d	RuvC i Nuc ³	
	VI	Cas13a/Cas13b/Cas13c/Cas13d	HEPN ⁴	RNK

¹HD – Histidin-aspartat domen, ²HNH – HisAsn-His nukleazni domen, ³Nuc – nukleazni domen u Cpf1,

⁴HEPN – Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domains

Tabela 1. Pregled CRISPR/Cas klasifikacije i opšte karakteristike

Do sada su identifikovane dve glavne klase CRISPR/Cas sistema u širokom spektru bakterijskih i arhejskih domaćina koje se karakterišu različitim arhitekturama efektorskih kompleksa koji čine jedinstveni Cas proteini (4). To ilustruje spektar biohemijskih primena koje oni obavljaju u različitim koracima imuniteta posredovanog ovim sistemom, ali samo su neki od njih prilagođeni kao istraživački alati (4, 10). Sistemi klase I koriste multisubjedinični kompleks proteina Cas, dok se sistemi klase II oslanjaju na Cas-protein sa jednim efektorom. Iako čine oko 90% otkrivenih sistema CRISPR/Cas, vrlo je malo primera sistema klase I koji su namenjeni za editovanje genoma sisara (11-13).

Najbolje opisan i najviše izučavan je CRISPR sistem tip II (1, 5, 14) koji se sastoji od nukleaze Cas9, crRNK (CRISPR-RNK) niza koji kodira mali vodič RNK molekul (eng. *single-guide RNA*, sgRNK) i neophodne pomoćne transaktivirajuće crRNK (eng. *trans activated crRNA*, tracrRNK) koja olakšava procesovanje crRNK lanca i omogućava povezivanje crRNK i Cas9 u ribonukleoproteinski kompleks (5, 14). Svaka crRNK jedinica sastoji se iz 20 nt dugačke *guide* sekvene i parcijalno direktnih ponovaka (koji se nazivaju protospejseri), koji navode Cas9 na 20 bp dugačku target sekvencu DNK i spajaju se sa njom po principu komplementarnosti. Vezivanje endonukleaze Cas9 sa željenim genomskim lokusom posredovano je i kratkom sekvencom od 3 bp u targetnoj DNK sekvenci. Taj niz naziva se protospejser susedni motiv ili region PAM (eng. *Protospacer Adjacent Motif*, PAM). Neophodno je da motiv PAM bude smešten odmah nishodno od mesta komplementarnosti, u suprotnom Cas9 se neće vezati ni uvesti dvolančane prekide. U CRISPR/Cas9 sistemu koji potice od *S. pyogenes*, targetnom DNK lokusu mora da prethodi motiv PAM 5'-NGG ili 5'-NAG (1), dok drugi Cas9 ortologzi mogu zahtevati drugačije motive PAM kao kod *S. thermophilus* (5'-NNAGAA za CRISPR1 i 5'-NGGNG za CRISPR3) i *Neisseria meningitidis* (5'-NNNNGATT) (5, 14).

3. STRATEGIJE

Tehnologija editovanja genoma zasnovana na CRISPR/Cas9 sistemima poslednjih 10 godina reprogramirana je da cilja određene regije eukariotskog genoma i postala je moćno oruđe za genetski inženjering (1, 5). Istraženi su mnogi pristupi kako bi se poboljšala aktivnost editovanja genoma upotrebom ove tehnologije i mnoge strategije su razvijene i primenjene u brojnim studijama. Među njima, *knockout* i *knockin* gena, editovanje baze i *prime* editovanje pokazale su se neverovatno obećavajuće u genskoj terapiji. Štaviše, ove strategije primenjene su za editovanje genoma u pret-kliničkim istraživanjima i kliničkim ispitivanjima.

3.1. *Knockout* i *knockin* gena

Metoda editovanja genoma zasniva se na upotrebi endonukleaza koje su vođene malim dizajniranim sgRNK molekulom koji se komplementarno vezuje za željeni DNK lokus i time omogućava endonukleazi da na specifičnom mestu u genomu uvode dvolančani prekid (eng. *Double Strand Break*, DSB) ~ 3-4 bp ushodno od regiona PAM (1, 15). Nakon uvedenog prekida, targetovani lokus biva podvrgnut reparaciji DNK uz pomoć dva glavna mehanizma:

- nehomologim sparivanjem krajeva (eng. *Non-Homologous End Joining*, NHEJ),
- reparacijom homologom rekombinacijom (eng. *Homology Directed Repair*, HDR)(16).

U odsustvu reparacione matrice, dvolančani prekid popravlja se procesom NHEJ koji ostavlja ožiljke u formi malih insercija/delecija (eng. *indels*). NHEJ se može iskoristiti za konstruisanje *knockout* gena, pošto male insercije/delecije u okviru kodirajućeg regiona gena dovode do promena koje menjaju okvir čitanja (eng. *frameshift variants*) i pojave pre-vremenog stop kodona (eng. *nonsense variants*) (17).

HDR je alternativni put reparacije DNK. Iako se dešava znatno ređe i varijabilnije frekvencije nego NHEJ, ovaj proces može biti korišćen za generisanje precizno definisanih modifikacija targetovanih lokusa uz prisustvo egzogeno uvedene matrice za reparaciju (konstruisanje *knockin* gena). Reparaciona matrica može biti u formi dvolančanog DNK konstrukta ili jednolančanog DNK oligonukleotida (ssODN, eng. *Single-Stranded Donor Oligonucleotide*) (18). Upotrebom ove strategije, moguće je izvršiti inserciju novog gena na željenu lokaciju u genomu, kao ispravljanje nesintonimnih varijanti u targetovanom genomskom lokusu. Ipak, efikasnost ovog procesa je znatno niža od NHEJ, iz razloga što je HDR aktivna samo u celijama koje se dele, a efikasnost zavisi od tipa i stanja celije, kao i od genomskog lokusa i reparacione matrice (18).

3.2. Editovanje baze

Nesumnjivo je da je ova metoda stekla značajnu popularnost poslednjih godina i prepoznata je kao moćno sredstvo moderne medicine. Međutim, uprkos mnogim prednostima, ovaj alat sklon je greškama, što može dovesti do uvođenja neželjenih promena u genomu (*off-target*). Editovanje baze (eng. *base editing*, BE) predstavlja vrstu editovanja genoma koja obezbeđuje direktnu, nepovratnu konverziju jednog baznog para u drugi na ciljanom genomskom lokusu bez potrebe za uvođenjem dvolančanih prekida, reparacione matrice i procesa HDR (19).

Princip editovanja genoma zasnovanog na tehnologiji CRISPR/Cas9 bazira se na postojanju dva funkcionalna domena Cas9, jedan je HNH, a drugi RuvC, gde svaki domen preseca jedan lanac ciljane sekvene DNK formirajući dvolančani prekid (20, 21). Ako se jedan ili oba funkcionalna domena deaktiviraju promenom njihovih aminokiselina ili modifikacijom strukture, to ne utiče na njihovu aktivnost vezivanja za DNK. Prema ovom principu, naučnici su modifikovali Cas endonukleazu da bi izmenili domene HNH i/ili RuvC i samim tim formirali deaktiviran protein Cas9 (dCas9) i Cas9 nikazu (eng. *Cas9 nickase*, nCas9) za različite svrhe editovanja genoma. Što je još važnije, svi proteini Cas, dCas ili nCas mogu se fuzionisati sa različitim molekulima, uključujući drugi enzim, bez uticaja na njihovu funkciju veziva-

nja i uvođenja prekida. Koristeći ova saznanja, grupa David R. Liu na Univerzitetu Harvard prvi put je razvila tehnologiju CRISPR/Cas editovanja baze za promenu određene baze na željenom mestu u genomu fuzijom enzima za modifikovanje baze sa nCas9 endonukleazom (22). U svojoj studiji fuzionisali su enzim citidin deaminazu (eng. *Cytidine deaminase*, CDA) sa nCas9 da bi napravili editor baze citozina (eng. *Cytosine Base Editor*, CBE), koji može da izvrši zamenu citidina (C) u uridin (U), a zatim u procesu translacije se on prevodi u timin (T) i putem ovog načina uspešno su dobili editovanje baze C>T ili G>A (22). Kasnije su takođe razvili sistem editovanja koji menja A>T bazni par u G>C bazni par fuzijom enzima adenin deaminaze (eng. *Adenine deaminase*, ADA) sa nCas9, koga su nazvali adeninski bazni editor (eng. *Adenine Base Editor*, ABE) (19). Trenutno su ABE i CBE dve klase CRISPR/Cas DNK editora baze, koji mogu izvršiti zamenu sve četiri nukleotidne promene (C>T, A>G, T>C i G>A). Nedavno je nekoliko laboratorija razvilo editor dvostrukog deaminaza koji kombinuje ABE i CBE, sa ciljem da se istovremeno indukuje editovanje baze adenina i citozina. (23).

3.3. Editovanje RNK

Pored editovanja DNK, sistem CRISPR/Cas9 mogu da edaju i RNK. CRISPR/Cas13 sistem (klasa II, tip VI) sadrži protein Cas13 sa ribonukleaznom aktivnošću, koji se može vezati za ciljanu jednolančanu RNK (eng. *single stranded RNA*, ssRNK) i uvoditi prekide (24). Do danas su identifikovana četiri proteina Cas13: Cas13a (poznat i kao C2c2), Cas13b, Cas13c i Cas13d (25). Uspešno su primjenjeni u degradaciji RNK, obeležavanju transkriptata, regulaciji obrade primarnog transkripta i detekciji virusa (26-28). Kasnije, razvijena su dva sistema za izmenu baze u RNK, (*Repair* sistem, omogućava zamenu A>G; *Rescue* sistem, omogućava zamenu C>T) spajanjem katalitički inaktiviranog Cas13 (dCas13) sa domenom adenin/citidin deaminaze ADAR2 (adenozin deaminaza koja deluje na RNK tip 2) (29, 30).

3.4. Prime editovanje

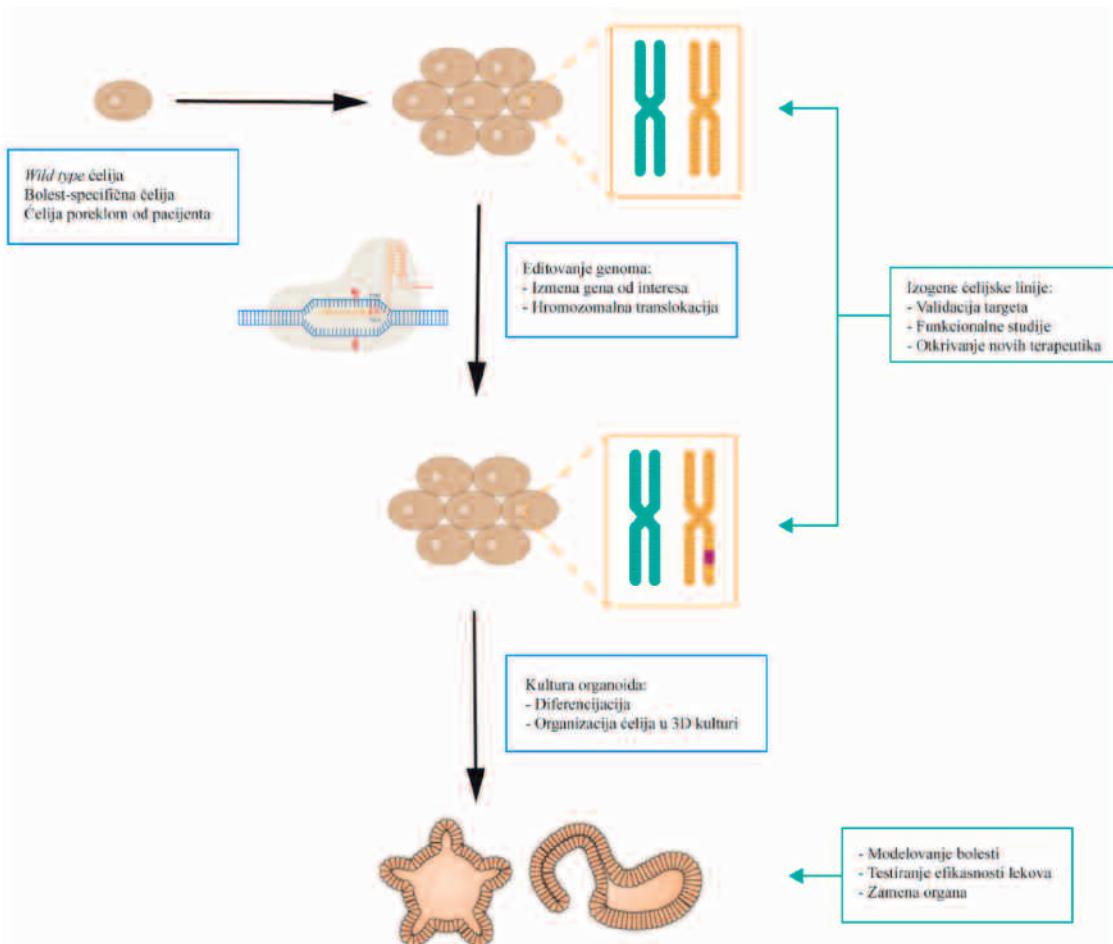
Osnovno editovanje (eng. *Prime Editing*, PE) predstavlja najnoviju primenu tehnologije CRISPR/Cas, koju je 2019. godine razvila grupa Liu sa Univerziteta Harvard (31). Ovaj metod editovanja uveo je dve velike promene u tradicionalni sistem CRISPR/Cas9: fuziju reverzne transkriptaze sa nCas9 i *prime* vodič RNK (eng. *Prime editing guide RNA*, pegRNK) umesto tradicionalne sgRNA. U pegRNK, osim sgRNA koja sadrži i tracrRNK i graničnik (eng. *spacer*), nalazi se i gen-specifična sekvenca RNK koja sadrži vezivno mesto prajmera (eng. *Primer Binding Site*, PBS) koje je komplementarno sa željenim regionom za editovanje. Takođe, pored regiona PBS nalazi se i deo sekvene sa varijantom koja se uvodi u genom (31). U ovom novom pristupu sgRNA navodi sistem CRISPR/Cas9 da prepozna i locira DNK vezujući region. Nakon što nCas9 preseče suprotni lanac DNK i formira jednolančani prekid DNK, mesto prekinutog lanca DNK služi kao mesto za vezivanje PBS sekvence iz pegRNK. Uz pomoć fuzionisane reverzne transkriptaze, vrši se sinteza novog fragmenta DNK koji za cilj ima da zameni željeni region u genomu. Dakle, *prime* editovanje može da zameni određenu sekvencu DNK bez egzogeno uvedene matrice (31). Za razliku od tradicionalnog CRISPR/Cas9 sistema i editovanja baze, *prime* editovanje može da zameni bilo koji nukleotid upotrebo jednog sistema sa sniženom verovatnoćom pojave off-targeta. Takođe, može poboljšati efikasnost i tačnost ovog sistema, a samim tim i značajno proširiti opseg editovanja genoma u biološkim i terapijskim istraživanjima. U teoriji moguće je ispraviti do 89% poznatih varijanti u genima koji izazivaju različite bolesti (31). Ipak, kao nova tehnika editovanja genoma, potrebno je još istraživanja kako bi se bolje razumeo i poboljšao ovaj sistem.

4. PRIMENE CRISPR/Cas9 SISTEMA U ISTRAŽIVANJU HUMANIH OBOLJENJA

4.1. CRISPR/Cas9 sistem za uspostavljanje *in vitro* ćelijskih model sistema

Napredak metoda za sekvinciranje DNK na velikoj skali i njihova široka upotreba, proširio je razumevanje povezanosti prisustva genetičkih varijanti sa predispozicijom razvoja određenih bolesti i odgovora na specifičnu terapiju. Takav napredak podstakao je interesovanje za „personalizovanu“ ili „preciznu“ medicinu, koja kombinuje kliničke i biohemiske informacije o pacijentu sa ličnim genetičkim podacima kako bi direktno informisala pojedinca o individualnoj strategiji lečenja. Međutim, hipoteze generisane naporima opservacionih „omika“ često zahtevaju testiranje na preciznim genetskim modelima, posebno za određivanje patogenog efekta varijanti nepoznatog značaja (eng. *variants of uncertain significance*, VUS), optimizaciju stratifikacije pacijenta, preusmeravanje upotrebe odobrenih lekova na nove patologije i razvijanje alternativnih načina lečenja.

Iako postoje jasne indikacije za razvoj određene bolesti, često postoje mnoge zbumujuće karakteristike koje zaklanjaju direktnu vezu određenog genotipa sa fenotipom bolesti. Trenutno se istraživači često oslanjaju na odgovarajuće uzorce pacijenata iz bolesnog i zdravog tkiva kako bi se utvrdila njihova povezanost. Međutim, kolekcije ovakvih uzoraka u mnogim slučajevima nisu dostupne. Pojava tehnologije CRISPR/Cas9 drastično je promenila ovaj pristup (Slika 1). Stvaranje izogenih knockout humanih i životinjskih ćelijskih linija za uporednu genomiku sada je tako jedno-



Slika 1. Primena tehnologije CRISPR/Cas9 u generisanju ćelijskih modela. CRISPR/Cas9 editovanje genoma može se koristiti za generisanje izogenih ćelijskih linija za testiranje patogenog efekta uvedenih varijanti u gen od interesa, funkcionalne studije kao i za validaciju targeta molekularnih terapeutika. Izogene ćelijske linije takođe se mogu koristiti za stvaranje organoida, koji su posebno korisni za modeliranje procesa diferencijacije i samoorganizacije, kao i za testiranje efikasnosti novih terapeutika.

Knockout gena putem CRISPR/Cas9 pokazao se efikasnim u praktično svim tipovima ćelija, uključujući indukovane pluripotentne matične ćelije (eng. *induced pluripotent stem cells*, iPSCs), organoide specifične za određeni tip tuma i primarne imunske ćelije (34-36). *Knockout* pristup našao je svoju primenu i u otkrivanju senzitivnosti tumorskog tkiva na terapijski pristup koji podrazumeva uvođenje dvolančanih prekida u targetovane gene tumorskih ćelija (37-39). Na ovaj način formirane izogene *knockout* tumorske ćelijske linije omogućavaju istraživačima da utvrde uzročne uloge onkogena, tumor supresora i drugih faktora u tumorogenesi.

Slično tome, upotreboom pristupa *knockin* za ubacivanje željenih promena pomoću aktivacije HDR, omogućeno je testiranje efekta genetičkih varijanti povezanih sa razvojem različitih bolesti. Na primer, HDR može poslužiti za generisanje ćelijskih linija sa prisustvom varijanti u različitim genima za upoređivanje efekata svake promene detektovane kod pacijenata, kao što je to slučaj za onkogene KRAS, PIK3CA i IDH1, ili tumor supresore uključujući TP53, RB1 i VHL (40). Uopšteno, ovako editovane ćelijske linije mogu se koristiti za analizu efekta varijanti na razvoj bolesti ili za ispitivanje novih molekularnih terapeutika. U studiji Skakić i sar. po prvi put u Srbiji je upotrebljena tehnologija CRISPR/Cas9 i pristup *knockin*, i to za uvođenje nove, neokarakterisane humane varijante c.248G>A (41) u gen SLC37A4 humane embrionalne bubrežne ćelijske linije 293Flpln T-Rex (HEK293Flpln) i formiran je novi *in vitro* model sistem za funkcionalnu karakterizaciju ove varijante i ispitivanje uloge ove promene u patogenezi glikogenoze tip Ib (GSD tip Ib) (42). Novi *in*

vitro GSD tip Ib model sistem je u okviru iste studije upotrebljen za analizu apoptoze i stresa endoplazmatičnog retikuluma (37), a u budućnosti će imati primenu u testiranju molekularnih terapeutika dizajniranih da koriguju metaboličke abnormalnosti povezane sa disfunkcijom bubrega kod osoba obolelih od GSD tip Ib.

Pored toga, iPSCs su pokazale veliku mogućnost primene u uspostavljanju modela bolesti, otkrivanju lekova i razvoju ćelijske terapije specifične za pacijenta (43). iPSCs imaju sposobnost samoobnavljanja i potencijal višestruke diferencijacije, što je od velikog značaja u uspostavljanju modela bolesti i u istraživanjima regenerativne medicine (44). Poslednjih godina, kombinovanjem sistema CRISPR/Cas sa iPSCs tehnologijom, istraživači su kreirali mnogobrojne nove i pouzdane *in vitro* model sisteme bolesti i pružili nova rešenja za supsticacionu terapiju ćelija i preciznu terapiju kod raznih ljudskih bolesti, uključujući neurodegenerativne bolesti, β-talasemiju, sindrom stečene imunodeficiencije (AIDS), itd. (43-45).

4.2. CRISPR/Cas9 sistem za konstruisanje životinjskih model sistema

Pored primene ove tehnologije za editovane genoma različitih ćelijskih kultura, CRISPR/Cas9 dramatično je promenilo našu sposobnost konstruisanja životinjskih model sistema. Jedna od glavnih primena i prednosti tehnologije CRISPR/Cas9 za editovanje genoma je konstruisanje životinjskih model sistema za proučavanje i lečenje humanih genetičkih oboljenja.

Da bi se doobile životinje koje će ispoljavati određeni fenotip bez mozaičnog potomstva, vrši se editovanje matičnih ćelija samog embriona (eng. *embryonic stem cell, ESC editing*), koji se ubrzo nakon izmene genoma implementira u matericu ženke (23). Efikasno editovanje upotrebom CRISPR/Cas9, uključujući NHEJ ili HDR, može se postići takođe i mikroinjekcijom ili jednostavnom elektroporacijom zigota umesto manipulacijom matičnih ćelija embriona (46, 47). Ovakav pristup pruža nekoliko prednosti. Prvo, s obzirom da se u jednom koraku može izmeniti više gena, dvostruko i trostruko varijantni miševi mogu se brzo generisati bez potrebe za ukrštanjem jednovarijantnih sojeva. Drugo, editovanje zigota eliminiše zahtev za izolacijom, gajenjem i editovanjem ESC-a, što je predstavljalo glavnu prepreku za praćenje genetske varijabilnosti kod nekoliko model organizama relevantnih za proces otkrića novih terapeutika, poput pacova. Editovanje zigota takođe ubrzava stvaranje dodatnih varijanti u već postojećim životinjskim modelima za određene bolesti, eliminajući potrebu za ukrštanjem jednovarijantnih sojeva (48).

Primena CRISPR/Cas9 na veliki broj organizama obećava, jer je tradicionalno targetovanje gena i dalje teško u pretkliničkim modelima, osim kod miševa. Editovanje genoma upotrebom ove tehnologije izvedeno je kod pacova (27, 49), pasa (50) i majmuna (51), vrsta koje se najčešće koriste tokom pretkliničkih studija razvoja terapeutika. Sve u svemu, CRISPR/Cas9 je revolucionarni metod za editovanje genoma animalnih modela koji je smanjio vreme potrebno za generisanje targetovanih modela sa nekoliko godina na par meseci ili nedelja. U eri otkrivanja novih terapeutika, veliki spektor životinjskih model sistema je moguće kreirati u vremenskom okviru koji je relevantan za rane odluke o investiranju resursa za razvijanje i testiranje novih lekova.

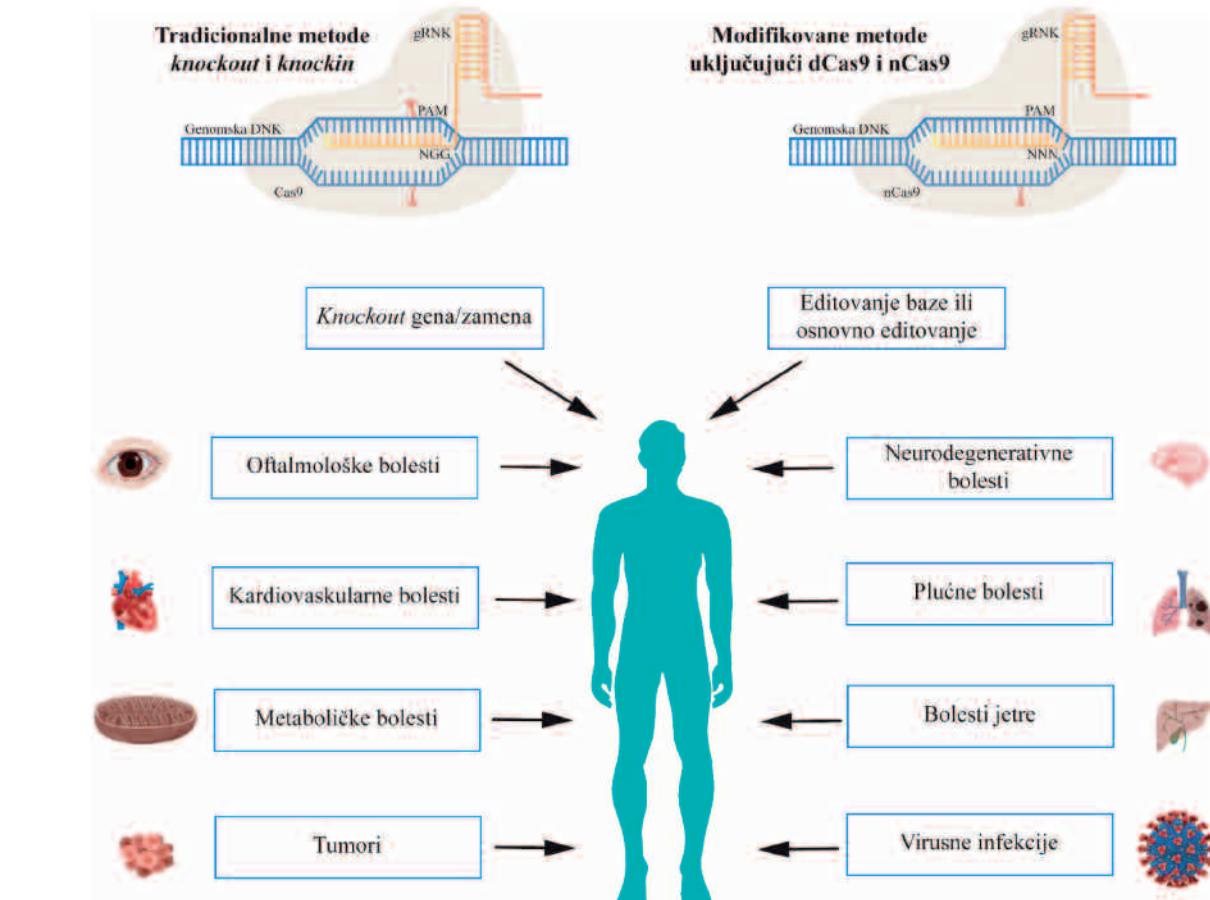
4.3. Upotreba CRISPR/Cas sistema u genskoj terapiji

Genska terapija se odnosi na uvođenje stranih gena u ciljne ćelije za lečenje specifičnih bolesti sa genetskom osnovom (52). S obzirom da je genska terapija germinativnih ćelija komplikovana i uključuje etička i bezbednosna pitanja, danas je genska terapija ograničena na gensku terapiju somatskih ćelija (53). Tradicionalna genska terapija obično se sprovodi homologom rekombinacijom ili upotrebom lentivirusnih vektora. Ipak, efikasnost homologe rekombinacije je niska, a lentivirusni vektori se nasumično integrišu u genom domaćina, što u kliničkim okvirima predstavlja potencijalni bezbednosni rizik (54). Trenutno, sa brzim razvojem CRISPR/Cas9 sistema, on se široko primenjuje u genskoj terapiji za lečenje određenih retkih bolesti sa monogenskom osnovom, infektivnih bolesti, različitih tipova tumora, a svoj potencijal pokazuje i u lečenju neurodegenerativnih, kardiovaskularnih bolesti, itd (Slika 2) (53, 54). Određene terapije za editovanje genoma posredovane CRISPR/Cas9 sistemom već su dostigle fazu kliničkog ispitivanja (55).

4.3.1. Retke bolesti

Retke bolesti su heterogena grupa bolesti čija se kategorizacija zasniva na niskoj prevalenci. Sve bolesti čija je prevalenca niža od 5:10 000 se ubrajaju u retke bolesti. Trenutno je u literaturi opisano blizu 7000 različitih retkih bolesti (56). Sa razvojem medicine i molekularne genetike, neprekidno se opisuju nove retke bolesti. Prema podacima Internacionalnog konzorcijuma za istraživanje retkih bolesti, IRDiRC, u poslednjih deset godina opisano je blizu 900 novih retkih bolesti (57). Za retke bolesti je zajedničko i to što su po pravilu teške, hronične i neizlečive bolesti koje pogađaju mlade (čak 50% se razvija u dečijem uzrastu).

Iako su retke bolesti pojedinačno retke, osobe obolele od retkih bolesti su brojne. Smatra se da je 6-8% svetske populacije obolelo, što bi značilo da čak 330 miliona ljudi u svetu boluje od neke retke bolesti (56). U Srbiji ne postoji



Slika 2. Potencijal editovanja genoma upotrebom različitih pristupa tehnologije CRISPR/Cas9 u lečenju humanih genetskih bolesti.

registrovani oboljeli od retkih bolesti, ali se na osnovu navedene svetske statistike, broj oboljelih od retkih bolesti u Srbiji može proceniti na blizu 500 000.

Kod preko 80% retkih bolesti identifikovana je genetička osnova, dok se kod oko 20% retkih bolesti osnova može naći u virusnim i bakterijskim infekcijama, alergijama ili uticaju životne sredine. Retke bolesti sa genetičkom osnovom mogu biti monogenske, multifaktorijalne (dečije leukemije) ili hromozomske aberacije (Turnerov sindrom, Edvarsov sindrom itd.).

Monogenske bolesti su genetičke bolesti uslovljene prisustvom varijanti u samo jednom genu. Sve monogenske bolesti se prema svojoj prevalenci mogu svrstati u retke, i do sada je registrovano više od 6600 humanih monogenskih bolesti (58).

Za retke bolesti za koje postoji jasan klinički simptom, kao što je to slučaj sa hiperfenilalaninemijom u krvi i telesnim tečnostima koja je prepoznatljiv znak bolesti fenilketonurija, sniženim nivoom MCV i MCH parametara u krvnoj slici koji ukazuju na beta talasemiju ili povišenim nivoom 17-hidroksiprogesterona što je simptom karakterističan za kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju, do genetičke potvrde se stiže testiranjem jednog gena (59-61). Međutim, zbog kompleksne kliničke slike većine retkih bolesti, tek je sekvenciranje nove generacije pojednostavilo i ubrzalo dijagnostiku omogućavajući da se veći broj gena, koji bi mogli da budu odgovorni za razvoj simptoma bolesti, istovremeno analiziraju (41, 62).

Napredak u razvoju lekova za retke bolesti (orfan lekova) na žalost ne prati adekvatnim tempom napretke koji su postignuti u dijagnostici (63). Trenutno za čak 90% monogenskih bolesti ne postoji specifičan efikasan tretman. Ova činjenica ukazuje na ogromnu potrebu za novim istraživanjima i otkrićima adekvatnih terapeutskih opcija za oboljele od monogenskih bolesti.

U današnje vreme, mnogi životinjski modeli monogenskih bolesti tretirani su genskom terapijom posredovanom CRISPR-om. Dalje, u toku su čak i klinička ispitivanja za neke monogenske bolesti bazirana na genskoj terapiji upotrebom tehnologije za editovanje genoma CRISPR/Cas9 (Tabela 2) (55).

ID kliničke studije	Bolest	Gen	Faza kliničke studije	Tretman	Uzrast	Država
NCT03745287	Bolest srpastih ćelija	BCL11A	I/II	CTX001	12-35	SAD, Belgija, Nemačka, Kanada i Italija
NCT03728322	Talasemija	HBB	I	iHSCs	2-60	/
NCT03855631	Kabuki sindrom 1	MLL4	završena	Intervencija na primarnim ćelijama poreklom od pacijenta	6+	Francuska
NCT03872479	Leber congenital amaurosis (LCA)	CEP290	I/II	AGN-151587	3+	SAD
NCT04122742	Rubinstein- Taybi sindrom	CREBBP	I	Izmena varijanti u genu CREBBP	10+	Francuska

Tabela 2. Pregled kliničkih ispitivanja genske terapije upotrebom tehnologije za editovanje genoma CRISPR/Cas9

4.4. CRISPR/Cas9 sistem za kreiranje novih terapeutskih pristupa i lekova

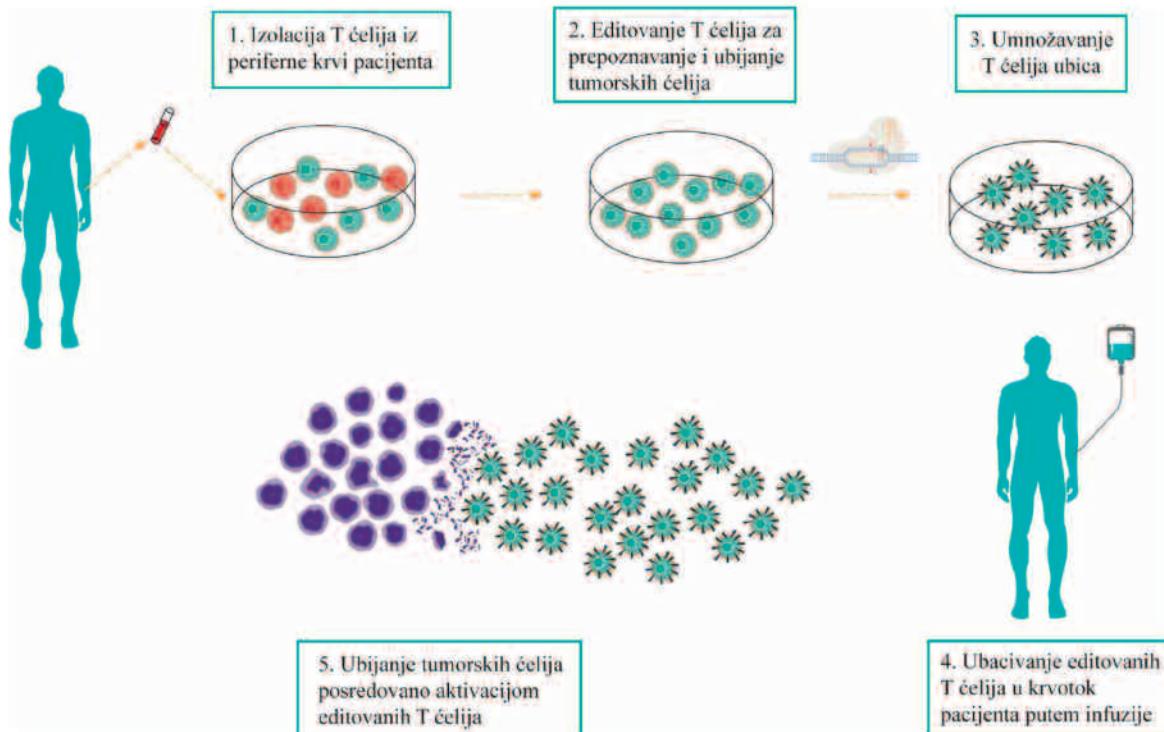
Pored stvaranja moćnih istraživačkih alata, editovanje genoma upotrebom različitih pristupa tehnologije CRISPR/Cas9, takođe pruža nadu za kreiranje potpuno novih terapeutika. Brzo i jeftino reprogramiranje enzima Cas9 daje mu jasnu prednost u odnosu na druge metode editovanja (poput ZFNs i TALEN) kada se iskaže potreba za izmeđom mnogo različitih genskih lokusa.

Primena editovanja gena za somatske bolesti počela je da se preklapa sa eksplozivnim poljem imunoterapije tumora, sa interesom usredstvenim na proizvodnju himernih antigen T-ćelijskih receptora (eng. *chimeric antigen receptor T cells*, CAR-Ts) nove generacije. Ove modifikovane T ćelije, koje eksprimiraju receptore specifične za tumorske ćelije, pokazale su potencijal u lečenju različitih leukemija i limfoma, a mogu se koristiti i za lečenje solidnih tumora (64). Receptori CAR sadrže ekstracelularni vezujući domen, koji prepoznae antigen koji je snažno eksprimiran na tumorskoj ćeliji, i intracelularni himerni signalni domen koji prilikom angažovanja receptora, aktivira T ćelije i promoviše ubijanje tumorskih ćelija posredovano T-ćelijama. Prva ovakva terapija CAR-T ciljala je CD19, antigen koji se eksprimira na B limfocitima i srodnim ćelijama karcinoma. (65).

Trenutno se većina CAR-T ćelija generiše pomoću sopstvenih T ćelija svakog pacijenta, što je skup i dugotrajan proces koji uključuje izolovanje, modifikovanje i umnožavanje T ćelija za svakog novog pacijenta. CAR-T terapija bi mogla da postane mnogo brža i jeftinija ako se generiše univerzalni davalac CAR-Ts, jer takve ćelije bi znatno povećale broj obolelih koji bi mogli da se leče jednim proizvodom. Međutim, odbacivanje transplantiranih ćelija, prouzrokovano prepoznavanjem ćelija primalaca od strane CAR-T ćelija i prepoznavanje CAR-T ćelija od strane domaćina, i dalje ostaju glavne prepreke. U tom kontekstu, tehnologija CRISPR/Cas9 bi mogla biti iskorišćena za formiranje knockout endogenih TCR gena u T ćelijama, što bi moglo sprečiti neželjeno odbacivanje CAR-T ćelija (Slika 3). Strategije za editovanje genoma mogu se takođe koristiti za sprečavanje ili odlaganje odbacivanja CAR-T ćelija od strane imunog sistema primoca uklanjanjem ili smanjenjem ekspresije histokompatibilnih antigena na donorskim T ćelijama (66). Do danas, nekoliko kliničkih ispitivanja je u toku koja podrazumevaju upotrebu tehnologije CRISPR/Cas9 za knockout receptora PD1 endogenih T ćelija i u CAR-T ćelijama koje targetiraju melanom, tumor pluća, prostate i bešike, kao i karcinom bubrežnih ćelija (67-70).

5. ZAKLJUČAK

Intenzivan razvoj sistema CRISPR/Cas9 je doveo do značajnih rezultata u savremenoj nauci zato što na jednostavan i visoko efikasan način omogućava transkripcionu regulaciju, genomske modifikacije i epigenetičko editovanje. Sistem CRISPR/Cas9 uspešno se koristi za editovanje genoma širokog spektra vrsta, poput miševa, pacova, pasa, majmuna i ljudi. Tehnologija CRISPR/Cas9 kao moćno sredstvo za editovanje genoma primenjena je u mnogim oblastima, od ba-



Slika 3. Kratak pregled terapijskog pristupa u formiranju CAR-T terapije upotrebom tehnologije CRISPR/Cas9

zičnih naučnih istraživanja, personalizovanog pristupa u lečenju humanih bolesti do terapije tumora. Mnogobrojna istraživanja o upotrebi ovog sistema u lečenju različitih humanih bolesti sa genetičkom osnovom su u toku.

ZAHVALNICA.

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-12.
- Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(2):67-83.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):E2579-86.
- Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*. 2018;9(1):1911.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-70.
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 2011;45:273-97.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467-77.
- Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2019;374(1772):20180087.
- Cameron P, Coons MM, Klompe SE, Lied AM, Smith SC, Vidal B, et al. Harnessing type I CRISPR-Cas systems for genome engineering in human cells. *Nature Biotechnology*. 2019;37(12):1471-7.

12. Dolan AE, Hou Z, Xiao Y, Gramelspacher MJ, Heo J, Howden SE, et al. Introducing a Spectrum of Long-Range Genomic Deletions in Human Embryonic Stem Cells Using Type I CRISPR-Cas. *Mol Cell.* 2019;74(5):936-50.e5.
13. Morisaka H, Yoshimi K, Okuzaki Y, Gee P, Kunihiro Y, Sonpho E, et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun.* 2019;10(1):5302.
14. Garneau JE, Dupuis M, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010;468(7320):67-71.
15. Hsu PD, Zhang F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(8):603-10.
16. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-23.
17. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):636-46.
18. Chen F, Pruitt-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods.* 2011;8(9):753-5.
19. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* 2017;551(7681):464-71.
20. Jiang F, Taylor DW, Chen JS, Kornfeld JE, Zhou K, Thompson AJ, et al. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science.* 2016;351(6275):867-71.
21. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 2014;156(5):935-49.
22. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533(7603):420-4.
23. Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet.* 2018;19(12):770-88.
24. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belant JJ, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature.* 2017;550(7675):280-4.
25. O'Connell MR. Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. *J Mol Biol.* 2019;431(1):66-87.
26. Ali Z, Mahas A, Mahfouz M. CRISPR/Cas13 as a Tool for RNA Interference. *Trends Plant Sci.* 2018;23(5):374-8.
27. Yang LZ, Wang Y, Li SQ, Yao RW, Luan PF, Wu H, et al. Dynamic Imaging of RNA in Living Cells by CRISPR-Cas13 Systems. *Mol Cell.* 2019;76(6):981-97.e7.
28. Granados-Riveron JT, Aquino-Jarquin G. CRISPR-Cas13 Precision Transcriptome Engineering in Cancer. *Cancer Res.* 2018;78(15):4107-13.
29. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science.* 2017;358(6366):1019-27.
30. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, Koob J, Kellner MJ, Ladha A, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science.* 2019;365(6451):382-6.
31. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019;576(7785):149-57.
32. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308.
33. Zarei A, Razban V, Hosseini SE, Tabei SMB. Creating cell and animal models of human disease by genome editing using CRISPR/Cas9. *J Gene Med.* 2019;21(4):e3082.
34. Grobarczyk B, Franco B, Hanon K, Malgrange B. Generation of Isogenic Human iPS Cell Line Precisely Corrected by Genome Editing Using the CRISPR/Cas9 System. *Stem Cell Rev Rep.* 2015;11(5):774-87.
35. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med.* 2015;21(3):256-62.
36. Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimberlin C, van Boxtel R, Buijs A, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature.* 2015;521(7550):43-7.
37. Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nat Biotechnol.* 2015;33(6):661-7.
38. Kasap C, Elemento O, Kapoor TM. DrugTargetSeqR: a genomics- and CRISPR-Cas9-based method to analyze drug targets. *Nat Chem Biol.* 2014;10(8):626-8.
39. Smurnyy Y, Cai M, Wu H, McWhinnie E, Tallarico JA, Yang Y, et al. DNA sequencing and CRISPR-Cas9 gene editing for target validation in mammalian cells. *Nat Chem Biol.* 2014;10(8):623-5.
40. Chen J, Ye Y, Sun H, Shi G. Association between KRAS codon 13 mutations and clinical response to anti-EGFR treatment in patients with metastatic colorectal cancer: results from a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(1):265-72.
41. Skakic A, Djordjevic M, Sarajlija A, Klaassen K, Tosic N, Kecman B, et al. Genetic characterization of GSD I in Serbian population revealed unexpectedly high incidence of GSD Ib and 3 novel SLC37A4 variants. *Clin Genet.* 2018;93(2):350-5.
42. Skakic A, Andjelkovic M, Tosic N, Klaassen K, Djordjevic M, Pavlovic S, et al. CRISPR/Cas9 genome editing of SLC37A4 gene elucidates the role of molecular markers of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal involvement in glycogen storage disease type Ib. *Gene.* 2019;703:17-25.
43. Hotta A, Yamanaka S. From Genomics to Gene Therapy: Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. *Annu Rev Genet.* 2015;49:47-70.
44. Kim HS, Bernitz JM, Lee DF, Lemischka IR. Genomic editing tools to model human diseases with isogenic pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2014;23(22):2673-86.
45. Chang CY, Ting HC, Su HL, Jeng JR. Combining Induced Pluripotent Stem Cells and Genome Editing Technologies for Clinical Applications. *Cell Transplant.* 2018;27(3):379-92.
46. Chen S, Lee B, Lee AY, Modzelewski AJ, He L. Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *J Biol Chem.* 2016;291(28):14457-67.
47. Wang W, Kutny PM, Byers SL, Longstaff CJ, DaCosta MJ, Pang C, et al. Delivery of Cas9 Protein into Mouse Zygotes through a Series of Electroporation Dramatically Increases the Efficiency of Model Creation. *J Genet Genomics.* 2016;43(5):319-27.
48. Beard C, Hochedlinger K, Plath K, Wutz A, Jaenisch R. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis.* 2006;44(1):23-8.

49. Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013;31(8):681-3.
50. Zou Q, Wang X, Liu Y, Ouyang Z, Long H, Wei S, et al. Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *J Mol Cell Biol.* 2015;7(6):580-3.
51. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell.* 2014;156(4):836-43.
52. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature.* 2015;526(7573):351-60.
53. Steffin DHM, Hsieh EM, Rouse RH. Gene Therapy: Current Applications and Future Possibilities. *Adv Pediatr.* 2019;66:37-54.
54. Sahel DK, Mittal A, Chitkara D. CRISPR/Cas System for Genome Editing: Progress and Prospects as a Therapeutic Tool. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;370(3):725-35.
55. Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:2401-15.
56. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(2):165-73.
57. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell.* 2019;177(1):32-7.
58. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM® Baltimore, MD: McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University; 2021 [updated 30. July 2021. Available from: <http://omim.org/>.
59. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucev B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clin Genet.* 2006;70(2):151-5.
60. Radmilovic M, Zukic B, Stankovic B, Karan-Djurasevic T, Stojiljkovic M, Spasovski V, et al. Thalassemia syndromes in Serbia: an update. *Hemoglobin.* 2010;34(5):477-85.
61. Milacic I, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, et al. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro CYP21A2 gene mutations. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(11):1199-210.
62. Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin Genet.* 2016;90(3):252-7.
63. Hechtelt Jonker A, Hivert V, Gabaldo M, Batista L, O'Connor D, Artsma-Rus A, et al. Boosting delivery of rare disease therapies: the IRDiRC Orphan Drug Development Guidebook. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(8):495-6.
64. Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood.* 2012;119(24):5697-705.
65. Fellmann C, Gowen BG, Lin PC, Doudna JA, Corn JE. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(2):89-100.
66. Torikai H, Reik A, Soldner F, Warren EH, Yuen C, Zhou Y, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood.* 2013;122(8):1341-9.
67. Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature.* 2016;535(7613):476-7.
68. Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity.* 2013;39(1):49-60.
69. Lloyd A, Vickery ON, Laugel B. Beyond the antigen receptor: editing the genome of T-cells for cancer adoptive cellular therapies. *Front Immunol.* 2013;4:221.
70. Hoos A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(4):235-47.

BIOMEDICINA
RETKE BOLESTI

BIOMEDICINE
RARE DISEASES



Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti

Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju, Centar za forenzičku i primenjenu molekularnu genetiku, Beograd, Srbija

Kontakt: milica@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Po definiciji, retke bolesti obuhvataju oboljenja čija je učestalost manja od 1 u 2000 u Evropi. Do sada je identifikovano skoro 7000 retkih bolesti uzrokovanih mutacijama u preko 4000 gena, a na svakih 50 osoba u Evropi jedna ima retku bolest za koju je pokazano ili se smatra da je genetički uzrokovana.

Objavljivanje preliminarne sekvence humanog genoma 2001. godine, kao i automatizacija reakcija PCR-a i sekvenciranja, omogućilo je otkrivanje velikog broja gena uzročnika retkih bolesti, kao i uspostavljanje i široku primenu molekularno - genetičke dijagnostike. Na ovaj način je omogućena dijagnostika bolesti koje su se odlikovale relativno čestim pojavljivanjem, a koje nisu imale posebno izraženu alelsku ili lokusnu heterogenost.

Razvoj metoda masivnog paralelnog sekvenciranja omogućio je širu dijagnostiku poznatih bolesti, ali se otvorila i mogućnost da se potraži uzrok za svaku retku bolest, međutim, nakon više od 10 godina masovne primene, preko 70% bolesti verovatno uzrokovanih naslednim faktorima i dalje ima nepoznatu etiologiju.

Ključne reči: retke bolesti, dijagnostika, humani genom, sekvenciranje

Diagnostics of rare diseases: New paradigm

Milica Keckarevic Markovic, Miljana Kecmanovic, Dusan Keckarevic

University of Belgrade – Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Forensic and Applied Molecular Genetics, Belgrade, Serbia

Correspondence: milica@bio.bg.ac.rs

Abstract

Rare diseases comprise diseases with a frequency less than 1 in 2000 in Europe. So far, almost 7,000 rare diseases caused by mutations in over 4,000 genes have been identified, and for every 50 people in Europe, one has a probably genetically caused rare disease.

The draft sequence of the human genome published in year 2001, as well as the automation of PCR and sequencing techniques enabled the identification of a large number of genes that cause rare diseases, as well as the establishment and wide application of molecular-genetic diagnostics. Thus, it was possible to establish the genetic background of relatively frequent and diseases without significant allelic or locus heterogeneity.

The development of massive parallel sequencing methods has enabled a broader diagnosis of known diseases, but also enabled scientific community to look for the cause of each rare disease. However, after more than 10 years, over 70% of probably genetically caused diseases still have an unknown etiology.

Key words: rare diseases, diagnostics, human genome, sequencing

Veličina humanog genoma iznosi oko 3,2 milijarde baznih parova (bp). Razvoj metoda masivnog parelelnog sekvenciranja (MPS, eng. *Massive Parallel Sequencing*) omogućio je sekvenciranje velikog broja humanih genoma, a poređenjem genoma različitih individua i analizom sličnosti i razlike između njih utvrđene su razmere prisutne varijabilnosti. Danas se tako zna da u genomu svake osobe postoji, u proseku, preko 3,2 miliona nukleotidnih varijanti (SNV, eng. *Single Nucleotide Variant*) i preko 700 000 inserciono-delecionih polimorfizama (INDEL, eng. *Insertion Deletion Polymorphism*) od kojih je oko 5000 SNV i 300 INDEL prisutno u pojedinačnim genomima (privatne varijante) (1), a oko 75 SNV i 3 INDEL nastaju *de novo* (2). Humani genomi se međusobno razlikuju i po strukturnim varijantama koje zahvataju regione preko 1000 bp (translokacije, inverzije, velike delecije, varijacije u broju kopija - CNV, eng. *Copy Number Variation*) (2), kao i po varijaciji u broju uzastopnih kraćih ponovljenih sekvenci (mikro- i minisateliti). Svaka osoba u proseku nosi preko 200 velikih delecija, među kojima i jednu privatnu (1). Takođe, svaka osoba, u proseku, nosi po nekoliko stotina varijanti u protein kodirajućim genima za koje se predviđa ili se zna da su štetne, a od toga oko 85 mutacija za koje se očekuje da dovode do gubitka funkcije (LoF, eng. *Loss of Function*) (1, 2).

Analizom velikog broja humanih genoma moguće je utvrditi učestalosti različitih varijanti sekvence DNK (alela) u odgovarajućoj populaciji, pri čemu je učestalost manje ili najmanje zastupljeno alela (MAF, eng. *Minor Allele Frequency*) od interesa za dalje analize. Varijante čija je učestalost manja od 1% smatraju se retkim (eng. *Rare*), između 1 i 5% kao varijante niske učestalosti (eng. *Low-frequency*), dok se varijante zastupljene sa preko 5% smatraju uobičajenim (eng. *Common*). Učestale varijante su prisutne u populacijama različitog porekla, dok su retke i varijante sa niskom učestalošću često populaciono - specifične. Najveća varijabilnost u sekvenci DNK je prisutna u populacijama afričkog porekla, a razlike u varijabilnosti i prisustvu pojedinih varijanti u različitim populacijama su oblikovane evolucionim mehanizmima, pre svega genetičkim driftom, ali i prirodnom selekcijom. Za retke i varijante niske učestalosti, koje su potencijalni uzročnici retkih genetičkih bolesti (RGD, eng. *Rare Genetic Diseases*), imajući u vidu njihovu populacionu specifičnost, posebno je značajna zastupljenost populacija različitog porekla u analizama humanih genoma.

Retke bolesti su definisane kao oboljenja od kojih boluje manje od 200 000 ljudi u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (3), odnosno čija je učestalost u Evropi manja od 1 u 2000 (4). Među retkim bolestima najzastupljenije su bolesti koje imaju genetičku osnovu, a među njima bolesti uzrokovane mutacijama u pojedinačnim genima, odnosno monogenske bolesti koje se zbog jasnih obrazaca nasleđivanja, nazivaju i Mendelovskim (eng. *Mendelian disorders*). Do danas je otkiveno oko 7000 retkih bolesti, koje su uzrokovane mutacijama u preko 4000 gena (5, 6), a njihova kumulativna zastupljenost u Evropi iznosi 1 u 50 osoba (7). Zbog dugogodišnjeg nedostatka interesovanja za izuzetno retke bolesti, često prisutne u pojedinačnim pedigreeima, nazivaju se i bolestima "siročićima" (eng. *Orphan diseases*).

Monogenske bolesti su uglavnom uzrokovane mutacijama u protein – kodirajućim (strukturnim) genima, a nasleđuju se na jedan od sledećih načina: autozomno - dominantno, autozomno - recessivno, X- ili Y-vezano, u zavisnosti od pozicije pogođenog gena u genomu, od uticaja uzročne mutacije na strukturu i sintezu, kao i funkciju kodiranog protiena. Recesivno nasleđivanje je povezano sa gubitkom funkcije proteina, koja može biti uzrokovana mutacijama koje dovode do promena u okviru čitanja (eng. *Frameshift*), mutacijama u mestima za splajsovanje (eng. *Splice Site*), kao i mutacijama koje dovode do pojava stop kodona (eng. *Nonsense*). Autozomno - recessivne bolesti se ispoljavaju u slučaju homozigotnog prisustva mutacije ili ređe, u slučaju prisustva kombinovanih heterozigota, gde su različite mutacije prisutne u različitim kopijama gena, a za posledicu imaju gubitak funkcije proteina kodiranih sa obe kopije gena prisutne u genomu. Autozomno - dominantno nasleđivanje bolesti podrazumeva da mutacija na jednoj kopiji gena dovodi do ispoljavanja bolesti, pri čemu se uglavnom radi o mutacijama koje dovode do promene smisla (eng. *Missense*). Dominantan efekat mutacije može biti uzrokovani dobijanjem nove, toksične funkcije izmenjenog proteina (eng. *Gain of Function*), kao i dominantno negativnim efektom, kada izmenjeni onemogućava funkcionisanje neizmenjenog (*wt*, eng. *Wild Type*) proteina. U nekim slučajevima smanjena količina proteina, kao posledica heterozigotnog prisustva mutacije koja dovodi do gubitka funkcije, može da dovede do ispoljavanja bolesti i tada je reč o haploinsuficijenciji.

Iako su većinom monogenske, u retke genetički uzrokovane bolesti se mogu svrstati i numeričke i strukturne hromozomske aberacije, bolesti izazvane varijacijama u broju kopija (CNV, mikroduplikacije, mikrodelekcije), poremećaji u utiskivanju gena (ID, eng. *Imprinting disorders*), bolesti uzrokovane mutacijama u mitohondrijskom genomu (mitohondrijske bolesti), bolesti sa multigenском osnovom, kao i bolesti uzrokovane dinamičkim mutacijama, a čije nasleđivanje se ne može jasno predvideti. Takođe, nasleđivanje monogenskih bolesti sa smanjenom penetrabilnošću i različitom ekspresivnošću se ne može predvideti iz Mendelovih pravila, a obrazac nasleđivanja bolesti koje smanjuju reproduktivni fitnes najčešće nije moguće utvrditi, već se mutacije uglavnom javljaju *de novo*.

Razvoj metoda koje omogućavaju analize velikih delova ili čitavih genoma, bazirane na masivnom paralelnom sekvenciranju, i njihova široka dostupnost od 2009. godine, nametnula je novu paradigmu u analizi retkih bolesti, dijagnozu za svakog pacijenta, koja ima za cilj da se pronađe uzrok za svaku retku bolest (8). U prethodnih nekoliko decenija, od otkrića prvog asociiranog lokusa i prvog gena uzročnika, pa do perioda masivnog paralelnog sekvenciranja, otkriće gena odgovornih za retke bolesti bilo je sporo, vremenski i finansijski zahtevno, i uglavnom ograničeno na visoko pe-

netrabilne i široko zastupljene bolesti (autozomno recessivne, autozomno dominantne bolesti koje ne smanjuju reproduktivni fitnes ili bolesti uzrokovane rekurentnim mutacijama). Do sekvenciranja humanog genoma i objavljivanja preliminarne sekvene 2001. godine, pristupi u identifikaciji novih gena podrazumevali su kombinaciju analiza vezanosti (eng. *Linkage Analysis*), pozicionog kloniranja i sekvenciranje gena kandidata identifikovanih u regionu asociiranom sa bolešću, a odabranih za sekvenciranje prvenstveno na osnovu pretpostavljene ili poznate funkcije, te mogućeg učestvovanja u patogenezi bolesti (8). Huntingtonova bolest je prva povezana sa genetičkim lokusom na 4. hromozomu, a vezanost je utvrđena 1983. godine (9). Uzročni gen, gen za protein huntingtin, identifikovan je 10 godina kasnije, a u otkriću je učestvovalo 58 istraživača iz šest istraživačkih grupa, i analizirane su osobe iz 75 velikih pedigreea iz Venecuele (10). Do 1995. godine otkrivena su 42 gena (11), dok je do 2001. godine otkriveno oko 1300 gena uzročnika retkih bolesti (12).

Otkriće i automatizacija metode lančane reakcije polimeraze (PCR, eng. *Polymerase Chain Reaction*) i automatizacija metode sekvenciranja omogućilo je sekvenciranje humanog genoma (1990-2004.). Poznavanje sekvene humanog genoma olakšalo je i ubrzalo otkrivanje novih gena uzročnika retkih bolesti, a dostupnost, jednostavnost i brzina metode PCR omogućila je široku rasprostranjenost dijagnostike retkih bolesti za koje je bio poznat uzročni gen ili geni, odnosno uzročna mutacija. Korišćenim metodama baziranim na PCR-u praćenom restrikcionom digestijom i/ili elektroforezom ili sekvenciranjem PCR produkata bilo je moguće pretraživati region na prisustvo bilo kakve promene u analizanoj sekvenci (SSCP, eng. *Single Strand Conformation Polymorphism*, sekvenciranje), ili detekcija tačno odgovarajuće, ciljane, mutacije (RFLP, eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, AFLP, eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AS-PCR, eng. *Allele Specific PCR*). Bolesti koje su bile podobne za dijagnostiku su se odlikovale relativno visokom zastupljeničušću, ali i ne previše izraženom alelskom i lokusnom heterogeničušću. Na osnovu prisustva i učestalosti pojedinih mutacija, kao i nivoa uključenosti različitih gena u slučaju lokusne heterogenosti formirani su populaciono – specifični algoritmi za dijagnostiku pojedinih bolesti ili grupa bolesti (13,14). Na ovaj način bilo je omogućeno postavljanje dijagnoze retkih bolesti na genetičkom nivou, ali je značajan broj pacijenata čija se bolest nije mogla objasniti nekom od učestalijih mutacija ili mutacijama u genima koji su često pogođeni ostajao bez konačne dijagnoze, te genetičkog saveta, čak i u slučajevima kada je klinička dijagnoza bila jasna. Ovo je posebno dolazilo izražaja u genima uzročnicima sa velikim brojem egzona (gen za distrofin, uzročnik Dišenove/Bekerove mišićne distrofije, *CFTR* gen, uzročnik cistične fibroze), kao i kod bolesti sa izraženom lokusnom heterogeničušću (hereditarne motorne i senzorne neuropatije, HMSN). Takođe, bez mogućnosti dijagnostike bile su izuzetno retke bolesti uzrokovane privatnim mutacijama.

Masivno paralelno sekvenciranje omogućilo je veliki pomak u dijagnostici retkih bolesti. Od 2009. godine identificuje se u proseku 250 novih asocijacija bolesti i gena uzročnika (15). U periodu od 2012. do 2015. godine oko 60% novih asocijacija činila je identifikacija novih gena, a preostalih 40% identifikacija novih fenotipova uzrokovanih mutacijama u genima već od ranije povezanim sa bolestima (8). Poslednjih godina, sa otkrićem sve više gena, taj odnos se neminovno pomera u korist otkrivanja povezanosti novih bolesti ili novih manifestacija poznatih bolesti i od ranije poznatih gena uzročnika RGD. Analize velike propusne moći generišu i veliku količinu podataka, te je razvoj metoda masivnog paralelnog sekvenciranja praćen razvojem hardvera za čuvanje i analizu podataka, informacionih tehnologija, formiranjem baza za skladištenje podataka, razvojem bioinformatičkih programa, kao i edukacijom kadrova za analizu velikih količina podataka (eng. *Big Data Analysis*). Formiraju se međunarodni konzorcijumi za istraživanje RGD (iRDiRC, eng. *International Rare Disease Research Consortium*) sa ciljem da svaka obolela osoba u razumnom vremenskom periodu dobije dijagnozu, i, ukoliko je moguće, terapiju, a koji podrazumevaju saradnju između lekara kliničara i istraživača iz velikog broja zemalja, ujednačavanje dijagnostičkih kriterijuma, kao i široku dostupnost dobijenih rezultata kroz objavljinje naučnih radova i ažuriranje internet baza podataka (5).

Prelazak sa standardne dijagnostike RGD na metode MPS doveo je do promene u načinu postavljanja hipoteze o potencijalnom genu uzročniku na osnovu prethodnih ispitivanja, kliničke slike pacijenta i porodične anamneze. Tako je, za razliku od standardne dijagnostike, svaka obolela osoba za koju postoji dovoljno podataka u prilog tome da boluje od genetički uzrokovane retke bolesti dobar kandidat za analize, bez obzira da li se radi o od ranije poznatoj ili bolesti koja se po prvi put sreće, i bez obzira da li postoji prethodna pretpostavka o potencijalnom genu uzročniku. Argumenti koji govore u prilog pretpostavci da se radi o genetički uzrokovanoj bolesti su ostali isti: postojanje porodičnog stabla sa većim brojem obolelih, visoka penetrabilnost bolesti sa jasnim obrascem nasleđivanja, kao i preklapanje simptoma kod nesrodnih pacijenata. Za osobe obolele od teških bolesti sa ranim početkom, obično prisutne u pojedinačnim porodicama, tek je uvođenje masivnog paralelnog sekvenciranja omogućilo određivanje genetičke osnove, a samim tim i značajno povećanje senzitivnosti analiza.

U dijagnostici retkih bolesti masivnim paralelnim sekvenciranjem postoje različiti pristupi koji podrazumevaju sekvenciranje manjeg ili većeg dela, a potencijalno i celog genoma. Odabir pristupa zavisi, pre svega, od simptoma bolesti, od činjenice da li su oni već od ranije poznati i asociirani sa genima uzročnicima ili se prvi put javlja(ju), i da li se

sumnja na jasno definisano bolest za koju je poznato da se odlikuje alelskom i/ili lokusnom heterogenošću. Analiza genskih panela je najjednostavniji prisutup i podrazumeva simultanu analizu gena, pre svega egzona i egzon – intron granica, povezanih sa nekom bolešću ili grupom bolesti, a koje se odlikuju alelskom i/ili lokusnom heterogenošću. Na ovaj način se sekvenciraju samo određeni delovi genoma, analize najmanje koštaju, a obrada dobijenih podataka je najjednostavnija (5). Ovakav pristup daje najveću pouzdanost dobijene informacije, jer se svaka analizirana sekvenca pročita veliki broj puta. Međutim, ove analize su ograničene na retke bolesti koje se relativno često javljaju i za koje postoji dovoljan broj informacija kako bi se konstruisali genski paneli. Sa otkrićem mutacija u novim genima i/ili regulatornim elementima i potvrdom povezanosti sa odgovarajućom bolešću, genski paneli se dodatno proširuju. Uobičajeni sledeći pristup je analiza kliničkog egzoma, kojim se sekvenciraju geni od ranije asocirani sa različitim bolestima. Ovakav pristup se bira kada su u pitanju bolesti nepoznate etiologije. Broj analiziranih gena je trenutno oko 5000 i stalno se usklađuje sa novim otkrićima. Kao i kod genskih panela, sekvenciraju se regioni gena koji se jasno mogu dovesti u uzročno - posledičnu vezu sa simptomima (egzoni i egzon – intron granice), a proširuju se i sekvencama regulatornih regiona, ukoliko je utvrđena njihova povezanost sa bolešću. Kao alternativa kliničkom egzomu koristi se analiza sekvenciranjem čitavog egzoma (WES, eng. *Whole Exome Sequencing*) i često odabir jedne od ove dve metode zavisi od laboratorije koja izvodi analize, njenih potencijala i ciljeva istraživačkih projekata. Svakako, ukoliko analize kliničkog egzoma ne daju rezultate, sledeći korak je WES. Sveobuhvatni pristup je analiza čitavog genoma (WGS, eng. *Whole Genome Sequencing*) i njemu se pristupa tek kada su prethodne mogućnosti iscrpljene. Iako se pomoću WGS analizira preko 90%, a danas i čitav genom, a WES-om se analizira oko 2% genoma (16, 17, 18), rezultati WGS-a nisu doneli značajno više informacije od WES-a, osim u domenu insercija i delecija, strukturnih varijanti i varijanti u broju kopija (18, 19). Jedan od razloga je i manja konzerviranost, odnosno veća raznovrsnost varijanti u nekodirajućim delovima genoma koja ukazuje na manji selektivni pritisak i generalno velika količina varijanti dobijenih analizom sekvene genoma, a za koje nije moguće ili je veoma teško uspostaviti uzročno – posledičnu vezu sa bolešću na osnovu same sekvene.

Radi ujednačavanja opisa simptoma, kao i za integraciju informacija o povezanosti genotipa i fenotipa, razvijen je sistem ontologija humanih fenotipova (HPO, eng. *Human Phenotype Ontology*) (20). Na ovaj način su pojednostavljenje razmena i deponovanje informacija u internet baze podataka, što je od posebnog značaja za dijagnostiku izuzetno retkih bolesti, gde prisustvo iste varijante povezane sa istim simptomima u bar dva posebno zabeležena slučaja daje potvrdu da se radi o patogenoj varijanti. HPO obuhvata standardizovani rečnik fenotipskih abnormalnosti koje se sreću kod humanih bolesti i trenutno sadrži preko 13 000 izraza i preko 156 000 povezanosti varijanti sa fenotipovima (21).

Kako su rezultati masivnog paralelnog sekvenciranja često opterećeni velikim brojem uočenih varijanti, u cilju pojednostavljinja samog procesa, HPO klasifikacija je integrisana u algoritme programa za njihovu analizu, pa se tako prvenstveno analiziraju oni geni za koje je utvrđena povezanost sa odgovarajućim simptomima. Rezultati mogu da ukažu na postojanje varijanti za koje je već ustanovljena uzročno – posledična veza sa bolešću, što pojednostavljuje dočinje zaključka o genetičkoj osnovi bolesti u konkretnom slučaju. Ukoliko se uoči nova varijanta, ali u genu koji je prepoznat kao potencijalni gen - uzročnik, dočinje zaključka zahteva i dodatne analize, koje se pre svega odnose na efekat mutacije na fenotip. Generalno, da bi analizirana varijanta bila potencijalni uzročnik retke bolesti treba da zadovolji jedan ili više kriterijuma, i oni se često automatski uzimaju u obzir prilikom analize rezultata. Pa tako, kao potencijalno uzročne, uzimaju se u obzir varijante koje nisu prisutne u referentnoj populaciji ili čija je zastupljenost izuzetno niska. Koja će se MAF koristiti kao prag za analize zavisi od karakteristika same bolesti (težine kliničke slike, vremena pojave prvih simptoma), njene učestalosti, kao i od prepostavljenog i/ili evidentiranog načina nasleđivanja. Korišćenje podataka iz analiza genoma ili egzoma referentne populacije je od velikog značaja, imajući u vidu uticaj demografskih faktora, te potencijalno veliki efekat genetičkog drifta, na populacionu zastupljenost retkih varijanti. Takođe, mutacije koje dovode do jasne promene na nivou kodiranog proteina (*nonsense*, *frameshift*, mutacije u mestima za splajsovanje, *missense* mutacije) i koje se nalaze na evoluciono konzerviranim pozicijama, a čiji se efekat može prepostaviti korišćenjem različitih bioinformatičkih alatki (programi *SIFT* (22), *Polyphen* (23), *MutationTaster* (24)), segregacija mutacije sa bolešću (25), prisustvo iste mutacije u različitim porodicama (26), govore u prilog uzročno – posledičnoj vezi sa analiziranom bolešću.

Metode masivnog paralelnog sekvenciranja su najveći pomak donele dijagnostici retkih bolesti koje se odlikuju visokom penetrabilnošću i/ili jasnim nasleđivanjem koje se može pratiti u velikim porodičnim pedigreeima ili kroz analizu većeg broja porodica, a za koje prethodnim pristupima nije bila dijagnostikovana uzročna mutacija, uglavnom kao posledica retke zastupljenosti (privatne mutacije) i visoke alelske i/ili lokusne heterogenosti. Veliki broj novih gena je povezan sa različitim bolestima, utvrđene su nove veze varijanti i bolesti (alelska heterogenost), kao i nove veze gena i bolesti (lokusna heterogenost). U zavisnosti od primjenjenog pristupa, kao i od selekcije pacijenata, otkrivanje uzročne varijante sekvenciranjem kliničkog ili celog egzoma generalno se kreće od 25% do oko 50% (8, 16, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34), dok je sekvenciranje genoma, i pored velikog napretka u samoj metodologiji koja danas omogućava

čitanje kompletne sekvence, i dalje ograničeno na mali broj centara koji zadovoljava tehničke mogućnosti za ovakve analize, a rezultati dobijeni WGS-om komplikovani za interpretaciju, zbog nemogućnosti uspostavljanja uzročno – posledične veze između velikog broja identifikovanih varijanti i razvoja bolesti.

Autozomno – recessivne bolesti koje su obično prisutne u velikim pedigreeima se lakše mogu povezati sa bolešću, zbog prisustva mutacije u, najčešće, homozigotnom obliku kod obolelih članova porodice i heterozigotnom kod nosilaca (35, 36, 37), dok se za autozomno – dominantne bolesti koje se nasleđuju u porodicama teže može otkriti uzročna varijanta, s obzirom da se veliki broj varijanti nasleđuje zajedno. Kod ovakvih slučajeva, za identifikaciju uzročne mutacije značajno je postojanje većeg broja nesrodnih porodica ili velikih, razgranatih pedigreea u kojima su obolele osobe u što daljem srodstvu (38, 39). Za otkrivanje *de novo* mutacija sa dominantnim efektom, a koje su asocijirane sa teškom kliničkom slikom sa ranim početkom, analize obično uključuju oba roditelja i dete (trio) (40). Svakako, dete u odnosu na roditelje ima oko 75 *de novo* SNV (2), te je za konačnu dijagnozu značajno i postojanje drugih pacijenata sa preklapajućim simptomima (41, 42).

Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti omogućila je velikom broju pacijenata da dođe do sigurne ili, bar, potencijalne genetičke dijagnoze, pri čemu za preko 70% pacijenata nakon prvih analiza etiologija bolesti ostaje i dalje nepoznata. Ponovna analiza rezultata WES-a nakon nekoliko godina, a zahvaljujući novim gen - varijanta - fenotip po vezanostima i većem broju sekvenciranih egzoma i genoma dostupnih u internet bazama podataka, te unapređenim algoritmima za analizu, omogućava utvrđivanje genetičke osnove za dodatnih 10% pacijenata sa RGD (15, 43). U pojedinim slučajevima uzročna mutacija može biti nedijagnostikovana usled prisustva mozaicizma, odnosno embrionalne *de novo* mutacije i njenog odsustva u analiziranom (obično krv), a prisustva u pogodenom tkivu. Takođe, očekuje se da će se sa napredovanjem tehnologije WGS, razvojem tehnologija analiza transkriptoma i metiloma u cilju identifikacije novih genotip – fenotip povezanosti, dobiti odgovor za još preko 10% RGD pacijenata (44).

LITERATURA

1. The UK10K Consortium. The UK10K project identifies rare variants in health and disease. *Nature* 2015; 526(7571): 82–90.
2. Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays Biochem* 2018; 62(5): 643–723.
3. United States Congress. Rare Diseases Act of 2002. 2002. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-107publ280/html/PLAW-107publ280.htm>.
4. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No 141/2000 of the European parliament and of the council of 16 December 1999 on orphan medicinal products. 1999. <http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg....>
5. McInerney-Leo AM, Duncan EL. Massively Parallel Sequencing for Rare Genetic Disorders: Potential and Pitfalls. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11: 628946.
6. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man (<https://omim.org/>).
7. Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data. In *Orphanet Report Series: Rare Diseases collection*. Ana Rath, editor. 2014. http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_disease....
8. Boycott KM, Rath A, Chong JX, Hartley T, Alkuraya FS, Baynam G, et al. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *Am J Hum Genet* 2017; 100(5):695–705.
9. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983; 306(5940):234–8.
10. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993; 72(6):971–83.
11. Collins FS. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat Genet* 1995; 9(4):347–50.
12. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 2002; 298(5602):2345–9.
13. 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.
14. Keckarevic Markovic M, 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.
15. Wenger AM, Guturu H, Bernstein JA, Bejerano G. Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers. *Genet Med* 2017; 19(2):209–214.
16. Shamseldin HE, Maddirevula S, Fafeih E, Ibrahim N, Hashem M, Shaheen R, et al. Increasing the sensitivity of clinical exome sequencing through improved filtration strategy. *Genet Med* 2017; 19(5):593–598.
17. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med* 2018; 3:16.
18. Logsdon GA, Vollger MR, Hsieh P, Mao Y, Liskovskykh MA, Koren S, et al. The structure, function and evolution of a complete human chromosome 8. *Nature* 2021; 593(7857):101–107.
19. Fang H, Wu Y, Narzisi G, O'Rawe JA, Barrón LT, Rosenbaum J, et al. Reducing INDEL calling errors in whole genome and exome sequencing data. *Genome Med* 2014; 6(10):89.
20. Robinson PN, Köhler S, Bauer S, Seelow D, Horn D, Mundlos S. The Human Phenotype Ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease. *Am J Hum Genet*. 2008; 83(5):610–5.
21. The Human Phenotype Ontology. <https://hpo.jax.org/app/>

22. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc* 2016; 11(1):1-9.
23. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; 7(4):248-9.
24. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11(4):361-2.
25. McInerney-Leo AM, Le Goff C, Leo PJ, Kenna TJ, Keith P, Harris JE, et al. Mutations in LTBP3 cause acromicric dysplasia and geleophysic dysplasia. *J Med Genet* 2016; 53(7):457-64.
26. Zankl A, Duncan EL, Leo PJ, Clark GR, Glazov EA, Addor MC, et al. Multicentric carpotarsal osteolysis is caused by mutations clustering in the amino-terminal transcriptional activation domain of MAFB. *Am J Hum Genet* 2012; 90(3):494-501.
27. Anazi S, Maddirevula S, Faqueih E, Alsedairy H, Alzahrani F, Shamseldin HE, et al. Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Mol Psychiatry* 2017; 22(4):615-624.
28. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* 2016; 18(7):696-704.
29. Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D, Powis Z, Chao EC, Tippin Davis B, et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med* 2015;17(7):578-86.
30. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014;312(18):1870-9.
31. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA* 2014; 312(18):1880-7.
32. Posey JE, Rosenfeld JA, James RA, Bainbridge M, Niu Z, Wang X, et al. Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients. *Genet Med* 2016; 18(7):678-85.
33. Yavarna T, Al-Dewik N, Al-Mureikhi M, Ali R, Al-Mesaifri F, Mahmoud L, et al. High diagnostic yield of clinical exome sequencing in Middle Eastern patients with Mendelian disorders. *Hum Genet* 2015; 134(9):967-80.
34. Stark Z, Tan TY, Chong B, Brett GR, Yap P, Walsh M, et al. A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genet Med* 2016; 18(11):1090-1096.
35. Bredrup C, Saunier S, Oud MM, Fiskerstrand T, Hoischen A, Brackman D, et al. Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19. *Am J Hum Genet* 2011; 89(5):634-43.
36. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, Giunta C, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2011; 88(3):362-71.
37. McInerney-Leo AM, Schmidts M, Cortés CR, Leo PJ, Gener B, Courtney AD, et al. Short-rib polydactyly and Jeune syndromes are caused by mutations in WDR60. *Am J Hum Genet* 2013; 93(3):515-23.
38. Sparrow DB, McInerney-Leo A, Gucev ZS, Gardiner B, Marshall M, Leo PJ, et al. Autosomal dominant spondylocostal dysostosis is caused by mutation in TBX6. *Hum Mol Genet* 2013; 22(8):1625-31.
39. Sirmaci A, Spiliopoulos M, Brancati F, Powell E, Duman D, Abrams A, et al. Mutations in ANKRD11 cause KBG syndrome, characterized by intellectual disability, skeletal malformations, and macrodontia. *Am J Hum Genet* 2011; 89(2):289-94.
40. Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J, et al. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *Am J Hum Genet* 2012; 91(2):349-57.
41. Rauch F, Moffatt P, Cheung M, Roughley P, Lalic L, Lund AM, et al. Osteogenesis imperfecta type V: marked phenotypic variability despite the presence of the IFITM5 c.-14C>T mutation in all patients. *J Med Genet* 2013; 50(1):21-4.
42. Wade EM, Daniel PB, Jenkins ZA, McInerney-Leo A, Leo P, Morgan T, et al. Mutations in MAP3K7 that Alter the Activity of the TAK1 Signaling Complex Cause Frontometaphyseal Dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2016; 99(2):392-406.
43. Basel-Salmon L, Orenstein N, Markus-Bustani K, Ruhrman-Shahar N, Kilim Y, Magal N, et al. Improved diagnostics by exome sequencing following raw data reevaluation by clinical geneticists involved in the medical care of the individuals tested. *Genet Med* 2019; 21(6):1443-1451.
44. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell*. 2019; 177(1):32-37.

Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih *DMPK* ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1

Jovan Pešović¹, Stojan Perić², Lana Radenković¹, Vidosava Rakočević-Stojanović^{2,3}, Dušanka Savić-Pavićević¹

¹ Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Centar za humanu molekularnu genetiku, Beograd, Srbija

² Klinika za neurologiju, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: jovan.pesovic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Povećanje broja ponovljenih motiva u mikrosatelitskim lokusima ili dinamične mutacije uzrokuju skoro 50 neuroloških oboljenja, označenih kao bolesti ekspanzija ponovljenih motiva. Kvantitativan efekat broja ponovljenih motiva na fenotip i inheretno nestabilna priroda dinamičnih mutacija objašnjavaju jedinstvene karakteristike ove grupe bolesti, kao što su genetička anticipacija – ranije i teže ispoljavanje bolesti u narednim generacijama, i izrazito varijabilni klinički fenotipovi. Miotonična distrofija tip 1 (DM1) je uzrokovana ekspanzijama CTG tripleta u *DMPK* genu, čiji broj predstavlja glavnu determinantu ekstremno varijabilne kliničke prezentacije koja otežava predviđanje toka bolesti. Deo fenotipske varijabilnosti, neobjasnjene veličinom ekspanzije, ukazuje na postojanje dodatnih modifikatora bolesti. Kod ~5% DM1 bolesnika opisane su ekspanzije sa varijantnim tripletima (CCG, CTC, CAG), koji su dovedeni u vezu sa neobičnim i/ili blažim simptomima nego što bi se očekivalo na osnovu veličine ekspanzije datog bolesnika. Ovaj rad daje pregled dosadašnjih znanja o tipovima varijantnih tripleta u *DMPK* ekspanzijama, kliničkim karakteristikama bolesnika i mehanizmima kojim varijantni tripleti ostvaruju svoj modifikujući efekat na fenotip. Ključna uloga pripisuje se stabilijućem efektu varijantnih tripleta na *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama, što objašnjava kasniji uzrast početka simptoma bolesti, kao i stabilijućem efektu u polnim ćelijama što objašnjava odsustvo najteže forme bolesti u porodicama sa varijantnim tripletima. Takođe, rad predstavlja naše originalno otkriće metilacije varijantnih CCG tripleta, koje otvara pitanje uloge epigenetičkih mehanizama u stabilizaciji *DMPK* lokusa. Dosadašnja znanja ističu kliničku relevantnost varijantnih tripleta u pogledu pružanja adekvatnog genetičkog saveta i regrutovanja bolesnika za kliničke studije, i podržavaju somatsku nestabilnost ekspanzija kao metu za nove terapeutike.

Ključne reči: miotonična distrofija 1, ekspanzije tripleta, somatska nestabilnost, metilacija DNK, uzrast početka bolesti, varijantni tripleti

Genetic and epigenetic characterization of variant *DMPK* expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1

Jovan Pešović¹, Stojan Perić², Lana Radenković¹, Vidosava Rakočević-Stojanović^{2,3}, Dušanka Savić-Pavićević¹

¹ University of Belgrade-Faculty of Biology, Centre for Human Molecular Genetics, Belgrade, Serbia

² Neurology Clinic, University Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

³ University of Belgrade-Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia

Correspondence: jovan.pesovic@bio.bg.ac.rs

Abstract

Repeat expansions in microsatellites or dynamic mutations cause ~50 neurological diseases, known as repeat expansion diseases. Quantitative effect of the repeat number and inherent instability of dynamic mutations underlie unique features of these diseases, such as genetic anticipation – an earlier and more severe disease presentation in successive generations, and a pronounced variability in clinical presentation. Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is caused by expansion of CTG repeats in *DMPK* gene, whose number is the main determinant of an extremely variable phenotype, making prognosis of the disease course challenging. A part of unexplained phenotype variability suggests the existence of disease modifiers. Variant repeats (CCG, CTC, CAG) are present in ~5% of patients and have been associated with unusual and/or milder symptoms.

toms than expected for a given expansion size. In this review, we provide an overview of types of variant repeats, clinical characteristics of patients, and mechanisms by which variant repeats modify DM1 phenotype. The key role is attributed to their stabilizing effect on *DMPK* expansions in the somatic cells, explaining a later age at symptoms onset, as well as in the germline cells, clarifying the absence of the most severe DM1 form in families with variant repeats. Additionally, we present our discovery of the methylation of CCG variant repeats, raising the question of the role of epigenetic mechanisms in the stabilization of *DMPK* locus. Current knowledge highlights the clinical relevance of variant repeats for genetic counseling and patient recruitment for clinical studies, and supports somatic instability of expansions as therapeutic targets.

Key words: myotonic dystrophy 1, triplet expansions, somatic instability, DNA methylation, age at onset, variant repeats

UVOD

Ponovljene sekvence DNK čine više od polovine genoma čoveka i predstavljaju značajan izvor genetičke varijabilnosti. Iako dugo smatrane viškom DNK (eng. *junk DNA*), savremena genomska istraživanja govore u prilog tome da su mnoge klase ovih sekvenci funkcionalne sa važnom regulatornom ulogom [1]. Mikrosateliti čine jednu od najbolje okarakterisanih klasa ponovljenih sekvenci. To su tandemski ponovljeni elementi sastavljeni od kratkih motiva dužine 1-6 baznih parova. Pretpostavlja se da postoji više od milion ovakvih lokusa rasutih u genomu čoveka koji zauzimaju približno 3% genoma [2]. Ovi elementi se odlikuju stopom mutacija koja je za nekoliko redova veličina veća u odnosu na prosečnu u genomu čoveka (10^{-3} vs. 10^{-9}) [3], što za posledicu ima da se broj ponovljenih motiva u okviru jednog lokusa razlikuje među individuama.

Mikrosatelitski lokusi dospevaju u fokus biomedicinskih istraživanja pre tri decenije kada je otkriveno da povećanje ili ekspanzija broja ponovljenih motiva može predstavljati direktni uzrok monogenskih oboljenja. Ovaj novi tip mutacija je zbog svoje inherentne osobine da se broj ponovljenih motiva menja kroz generacije, dostižući stopu mutacije 1, nazvan dinamičnim mutacijama, a bolesti koje uzrokuju označene su kao bolesti ekspanzija ponovljenih motiva (eng. *repeat expansion diseases*). Do danas je opisano približno 50 oboljenja uzrokovanih dinamičnim mutacijama u kodirajućim i nekodirajućim regionima gena uzročnika. Čak 17 bolesti je opisano u poslednje tri godine zahvaljujući metodološkom napretku u tehnologijama sekvenciranja, posebno razvoju sekvenciranja dugih fragmenata DNK (eng. *long-read sequencing*) [4]. Može se očekivati da će identifikacija novih dinamičnih mutacija rasvetliti genetičku osnovu još izvesnog broja retkih bolesti koje se danas rutinski dijagnostikuju sekvenciranjem kratkih fragmenata DNK, tehnologijom koja je uglavnom „slepa” za ekspanzije ponovljenih motiva.

Zanimljivo je da se većina bolesti ekspanzija ponovljenih motiva manifestuje neurološkim simptomima, a značajan broj i razvojnim poremećajima. Najpoznatije među njima su: Huntingtonova bolest (HD), fragilni X sindrom, miotonične distrofije i amiotrofična lateralna skleroza. Jedinstvene osobine bolesti ekspanzija ponovljenih motiva u odnosu na druge monogenske bolesti su: genetička anticipacija – ranije ispoljavanje bolesti u narednim generacijama sa težom kliničkom slikom, i izrazito varijabilni klinički simptomi, čak i među članovima jedne porodice. Ove osobine, koje odstupaju od konvencionalnih Mendelovih principa nasleđivanja, objašnjavaju se kvantitativnim efektom broja ponovljenih motiva (veličine ekspanzije) na fenotip i inheretno nestabilnom prirodom dinamičnih mutacija kroz generacije i tokom života bolesnika [5]. Genotip-fenotip studije su, takođe, ukazale na postojanje dodatnih faktora koji mogu da modifikuju efekat uzročne mutacije.

Slično istraživanjima u poljima drugih retkih bolesti, istraživanja bolesti ekspanzija ponovljenih motiva su nakon upoznavanja odnosa genotip-fenotip i razumevanja molekularnih mehanizma patogeneze ušla u fazu ispitivanja inovativnih genetičkih terapija. Ispostavilo se da poseban izazov predstavlja regrutovanje bolesnika za kliničke studije usled izražene fenotipske varijabilnosti. U ovom radu će kroz fokus na miotoničnu distrofiju tipa 1, tipičnog predstavnika bolesti ekspanzija ponovljenih motiva, biti opisani karakteristični odnosi dinamičnih mutacija i fenotipa, poznati modifikatori efekata uzročne mutacije i mogući mehanizmi kojima modifikatori ostvaruju svoj efekat.

MIOTONIČNA DISTROFIJA TIP 1

Miotonična distrofija tip 1 (DM1, MIM #160900) je retka neuromišićna bolest multisistemskog karaktera koja pogađa 1-5 u 10000 osoba (ORPHA:273). Tipični simptomi bolesti uključuju: mišićnu slabost, miotoniju, kataraktu, zahvaćenost srčanog mišića, endokrinih organa i centralnog i perifernog nervnog sistema [6, 7]. Iako klinički opisana još početkom dvadesetog veka, genetička osnova bolesti otkrivena je tek 1992. godine. Kao uzročna mutacija DM1 okarakterisana je ekspanzija CTG tripleta u 3' netranslatirajućem regionu *DMPK* gena (MIM *605377) [8] (slika 1A). U osnovi patogeneze DM1 leži mutirana RNK sa ponovljenim CUG tripletima. Na njenim sekundarnim strukturama dolazi do funkcionalnog zarobljavanja proteina iz familije MBNL, što vodi formiranju toksičnih RNK fokusa u jedru [9]. MBNL proteini su multifunkcionalni RNK-vezivni proteini sa važnom ulogom master regulatora alternativnog splajsovanja. Posledica njihovog funkcionalnog zarobljavanja je opšti poremećaj metabolizma RNK u ćeliji, pre svega obrasca splajsovanja, čime se objašnjava multisistemski karakter DM1. Otkriće da molekul RNK dobija novu toksičnu funkciju (eng. *RNA gain-of-function*) prvi put je označeno kao glavni patološki mehanizam u osnovi neke bolesti upravo kod DM1 i miotonične distrofije tipa 2 [10]. Dodatni mehanizam molekularne patogeneze je specifičan vid translacije sa molekulom RNK koji sadrže ekspanzije (eng. *repeat-associated non-ATG translation, RAN translation*) [11].

DM1 je jedno od fenotipski najvarijabilnijih monogenskih oboljenja. Slično drugim bolestima ekspanzija ponovljenih motiva, veličina ekspanzije predstavlja glavnu determinantu fenotipa DM1 [12, 13]. Broj CTG tripleta kreće se u opsegu od 50-100 kod asimptomatskih osoba ili bolesnika sa blagim simptomima koji se javljaju nakon 40. godine života (kasna forma DM1). Najveći broj bolesnika ima 100-1000 CTG tripleta i odlikuje se simptomima tipičnim za DM1 koji počinju tokom adolescencije ili nakon 20. godine života (juvenilno-adultna forma DM1). *DMPK* ekspanzije sa više od 1000 tripleta uzrokuju najteže forme bolesti koje odlikuje mentalna retardacija i koje se ispoljavaju tokom dečijeg uzrasta ili na samom rođenju (dečija i kongenitalna forma DM1). Kongenitalna forma DM1 se često završava smrću odojčeta usled problema sa disanjem. Za DM1 porodice karakteristična je veoma upečatljiva genetička anticipacija. Za samo tri generacije, od asimptomatskog dede, preko čerke, sa često nedijagnostikovanom adultnom formom bolesti u periodu prve trudnoće, bolest se u narednoj generaciji može manifestovati na samom rođenju.

Jedan od glavnih izazova u proceni veličine *DMPK* ekspanzije, a samim tim i u izučavanju odnosa genotipa i fenotipa, kao i praćenju promene veličine ekspanzije u međugeneracijskim prenošenjima, predstavlja izrazita nestabilnost ove mutacije u somatskim ćelijama. Somatska nestabilnost zavisi od veličine ekspanzije i uzrasta bolesnika, tkivno je specifična i ima tendenciju ka daljem povećanju broja tripleta tokom života bolesnika [14, 15]. U cilju što preciznije procene veličine ekspanzije primenjuje se specifična modifikacija PCR-a nazvana SP-PCR (eng. *small-pool PCR*). Metoda podrazumeva umnožavanje *DMPK* ekspanzija iz nekoliko desetina ćelija i kroz dovoljan broj ponavljanja omogućava određivanje veličine tzv. progenitornog alela, koji bi mogao predstavljati verovatnu nasleđenu veličinu ekspanzije [14, 16]. Na osnovu procene veličine progenitornog alela u grupi od preko 130 DM1 bolesnika, Morales i saradnici su utvrdili da veličina ekspanzije jeste glavna odrednica uzrasta pojave prvih simptoma [17]. Varijabilnost u veličini ekspanzije između bolesnika objašnjava ~65% ukupne varijabilnosti uzrasta na početku bolesti, dok preko 30% neobjašnjene varijabilnosti ukazuje na to da postoje drugi genetički, epigenetički i/ili sredinski faktori koji modifikuju efekat uzročne mutacije. Identifikacija i dokazivanje uloge potencijalnih modifikatora DM1 fenotipa je, kao i kod drugih retkih bolesti, izazovna. Najveću pažnju u polju privukli su varijantni tripleti, za koje danas možemo reći da su priznati modifikatori DM1 fenotipa.

TIPOVI VARIJANTNIH TRIPLETA U *DMPK* EKSPANZIJAMA I KLINIČKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA

Iako se za *DMPK* ekspanzije smatralo da se sastoje isključivo iz CTG tripleta, pre desetak godina opisane su ekspanzije sa prekidima u (CTG)n nizu, koji su označeni kao varijantni ponovljeni motivi [18, 19]. Do danas su identifikovani varijantni CCG, CGG, CAG i CTC tripleti na 3' kraju ekspanzija [18-21] i, znatno ređe, na 5' kraju [22, 23]. Kod najvećeg broja bolesnika opisani su varijantni CCG tripleti, koji su rasuti kao pojedinačni tripleti, prisutni kao delovi CCGCTG heksameru ili formiraju nizove većeg broja uzastopno ponovljenih CCG tripleta [20] (slika 1B). Različiti tipovi i obrasci varijantnih tripleta ukazuju na to da oni najverovatnije nastaju retkim baznim supstitucijama u čistom (CTG)n nizu, a kasnije se umnožavaju duž ekspanzije usled proklizavanja DNK polimeraze tokom različitih procesa uključenih u metabolizam DNK. U prilog ovoj hipotezi govore i retki nalazi *de novo* nastalih CTC [20] i CCG [24, 25] varijantnih tripleta.

U studijama na DM1 bolesnicima iz različitih geografskih regiona, uključujući i region Srbije, procenjena učestalost varijantnih *DMPK* ekspanzija kreće se u opsegu 3-5% [18-21]. Procenat varijantnih ekspanzija bi mogao da bude veći, imajući u vidu da njihovo potencijalno prisustvo u središnjem delu ekspanzije uglavnom ostaje nezapaženo usled metodoloških ograničenja. Posebna modifikacija PCR-a – RP-PCR (eng. *repeat-primed PCR*) se zbog svoje jednostavnosti i visoke specifičnosti danas rutinski koristi u molekularnoj dijagnostici DM1 i može ukazati i na prisustvo prekida na kra-

jevima *DMPK* ekspanzija [26]. Restrikcionalna digestija proizvoda SP-PCR-a enzimom *Acil (Ssil)*, koji prepoznaje restrikciono mesto CCGC, iskorišćena je za detekciju prekida, uključujući i one udaljene od krajeva ekspanzija, ali ograničena je na identifikaciju samo CCG i CGG tripleta prisutnih u vidu dužih uzastopnih nizova [20]. Važna prednost RP-PCR metode u odnosu na *Acil* digestiju je mogućnost određivanja strukture varijantnih *DMPK* ekspanzija Sangerovim sekvenciranjem RP-PCR proizvoda (slika 1B). Potencijal u prevazilaženju metodoloških nedostatka imaju tehnologije sekvenciranja dugih fragmenata DNK, koje su nedavno primenjene za određivanje strukture varijantnih *DMPK* ekspanzija [25] i otkrivanje novih ekspanzija ponovljenih motiva, poput ekspanzija GGC tripleta povezanih sa bolešću neuromuskularnih unutarjedarnih inkluzija (eng. *neuronal intranuclear inclusion disease*) [27].

Klinička prezentacija prvih opisanih bolesnika sa varijantnim ekspanzijama odgovarala je DM1 fenotipu, ali nije promaklo pažnji prisustvo nekih atipičnih simptoma, kao i odsustvo kongenitalne forme bolesti [18, 19]. Među atipičnim simptomima, koji mogu otežati postavljanje pravilne dijagnoze, izdvajaju se hipertrofija listova i izraženija slabost proksimalne muskulature, koji su karakteristični simptomi za miotoničnu distrofiju tip 2 [20]. Upadljiva odlika DM1 bolesnika sa varijantnim tripletima iz nekoliko ispitivanih populacija je relativno kasniji početak simptoma bolesti i blaža klinička prezentacija nego što bi se očekivalo za datu veličinu ekspanzije [19, 20, 22]. Kasniji uzrast početka bolesti, ali i blaži srčani i respiratori simptomi primećeni su i kod bolesnika sa varijantnim tripletima ispitivanim u okviru velike kliničke studije OPTIMISTIC (NCT02118779) [28]. Iako je kognitivno oštećenje prisutno kod približno dve trećine DM1 bolesnika [29], merenje opštег kognitivnog statusa baterijom neuropsiholoških testova nije zabeležilo kognitivna oštećenja [20, 21]. Nedavni rezultati takođe podržavaju protektivni efekat varijantnih tripleta na simptome u centralnom nervnom sistemu, posebno na skor inteligencije na celokupnoj skali (eng. *Full Scale IQ*) i na brzinu obrade podataka [30].

Prva ispitivanja mehanizama kojima bi varijantni tripleti modifikovali fenotip pokazala su da se broj i veličina toksičnih RNK fokusa sa MBNL proteinima ne razlikuju između bolesnika sa varijantnim i čistim *DMPK* ekspanzijama [21]. Ostaje otvoreno pitanje da li molekuli RNK sa velikim brojem varijantnih tripleta mogu stupati u interakciju sa dodatnim RNK-vezivnim proteinima. Sa druge strane, ukazano je na to da bi varijantni tripleti mogli genetički stabilizovati *DMPK* ekspanzije u somatskim i polnim ćelijama, slično kao kod nekih drugih bolesti ekspanzija ponovljenih motiva [31, 32]. Takođe, sve je više dokaza da bi varijantni tripleti mogli uticati na epigenetičku strukturu *DMPK* lokusa, jer je kod nekih bolesnika sa varijantnim CCG tripletima opisana izmenjena DNK metilacija u regionu oko ekspanzije [33-36]. Ovi nalazi su otvorili pitanje povezanosti varijantnih tripleta sa epigenetičkim modifikatorima DM1 fenotipa.

UTICAJ VARIJANTNIH TRIPLETA NA SOMATSKU NESTABILNOST DMPK EKSPANZIJA

DMPK ekspanzije se odlikuju mitotičkom nestabilnošću koja počinje još u ranim fazama embrionalnog razvića i nastavlja se tokom života bolesnika, što za rezultat ima izražen mozaicizam u veličini ekspanzije u pojedinačnim ćelijama bolesnika [37, 38]. Stepen somatske nestabilnosti zavisi od veličine ekspanzije i različit je u različitim tkivima, a razlikuje se i među bolesnicima [14, 15, 39]. Važna osobina kontinuirane somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija tokom života bolesnika je njena nagnutost ka daljem povećanju broja ponovaka, što se smatra molekularnom osnovom progresije bolesti [17].

Mozaicizam u veličini *DMPK* ekspanzije vizuelizuje se kao razmaz na rendgenskom filmu nakon Southern blota. Obično se kao veličina ekspanzije uzima modalna veličina određena kao tačka najvećeg intenziteta na razmazu. Metoda SP-PCR iskorišćena je za konverziju razmaza u diskretne trake koje predstavljaju pojedinačne ekspandovane alele, čime je omogućena preciznija kvantifikacija stepena somatskog mozaicizma [14, 16]. Primenom SP-PCR-a uočeno je da je distribucija učestalosti alela u ćelijama krvi bolesnika nagnuta ka daljim ekspanzijama, kao i da postoji očuvanost donjeg opsega veličine ekspanzije između različitih tkiva, za koju je predloženo da bi mogla odgovarati veličini nasleđene ekspanzije od roditelja, zbog čega je označena kao veličina progenitornog alela [14]. Varijanta metode SP-PCR-a koja podrazumeva umnožavanje ekspandovanih alela iz pojedinačnih molekula DNK (eng. *single-molecule SP-PCR*) omogućila je do sada najprecizniji uvid u stepen somatskog mozaicizma *DMPK* ekspanzija [40, 41] (slika 1C). Primenom navedene metode, studija na grupi od preko 130 DM1 bolesnika pokazala je da se skoro 90% varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti *DMPK* ekspanzije može objasniti dužinom progenitornog alela i starosnim uzrastom bolesnika [17]. Navedeni rezultat potvrđen je u nedavnoj longitudinalnoj studiji na uzorcima krvi bolesnika iz više vremenskih tačaka u razmaku 8-15 godina [42]. Zabeleženo povećanje modalne veličine, kao i stepena somatske nestabilnosti tokom vremena, dodatno potvrđuju ranije zapažanje da je somatski mozaicizam kontinuiran tokom života bolesnika [38]. Neobjašnjen deo varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti *DMPK* ekspanzije govori u prilog postojanju dodatnih individualno-specifičnih modifikujućih faktora [17].

Ubrzo nakon otkrića prekida u (CTG)n nizu, pokazano je da se i varijantne *DMPK* ekspanzije odlikuju somatskim mozaicizmom [18]. Ispitivanja mitotičke nestabilnosti u ćelijama različitih tkiva (bukalna sluznica i krv) ukazala su na tkivnu specifičnost somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija, koja zavisi od tipa i strukture varijantnih

tripleta, ali i dodatnih faktora specifičnih za ispitivane porodice [41]. U cilju ispitivanja da li varijantni tripleti predstavljaju individualno-specifične modifikatore somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija, primjenjeni su različiti pristupi. Jednostavno poređenje profila dobijenih metodom SP-PCR-a ukazalo je na vizuelno manji opseg somatskog mozaicizma kod bolesnika sa varijantnim u odnosu na nekoliko bolesnika sa čistim ekspanzijama, uparenih prema veličini ekspanzije i godinama starosti [23]. Isti pristup primjenjen je u još jednoj studiji, s tim da je stepen somatske nestabilnosti, koji je poreden između grupa bolesnika sa i bez varijantnih tripleta, određivan kao razlika modalne i progenitorne veličine alela [24]. Ilustracije radi, na slici 1C predstavljene su distribucije učestalosti varijantnih i čistih *DMPK* ekspanzija dva bolesnika iz naše kolekcije, približno iste starosti i veličine progenitornog alela, gde se uočava manji stepen mitotičke nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi. Nedostatak ovakvog pristupa ogleda se u činjenici da direktna poređenja pojedinačnih bolesnika ne uzimaju u obzir postojanje dodatnih faktora koji, uz veličinu ekspanzije i starost bolesnika, utiču na varijabilnost somatske nestabilnosti. Alternativni pristup podrazumeva korišćenje velike referentne grupe bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama, na osnovu koje se mogu dobiti modeli koji bolje oslikavaju sveukupnu varijabilnost u stepenu somatskog mozaicizma kod DM1 bolesnika u odnosu na nekoliko uparenih kontrola. Poređenje bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama u odnosu na ovako definisanu referentnu grupu pruža detaljniji uvid u dinamiku somatske nestabilnosti kod ovih bolesnika. Tako je kod nekoliko bolesnika sa varijantnim ekspanzijama iz jedne porodice [18], kao i grupe nesrodnih bolesnika [41], zabeležen statistički značajno niži nivo somatske nestabilnosti u odnosu na očekivani u skladu sa modelom iz referentne grupe. Takođe, karakterizacijom mutacione dinamike somatske nestabilnosti tokom vremena, primećeno je statistički značajno manje povećanje modalne veličine ekspanzije kod bolesnika sa varijantnim ekspanzijama [41]. Navedeni rezultati su pružili verodostojne dokaze da se varijantni tripleti mogu smatrati individualno-specifičnim faktorom koji ima stabilisujući efekat na *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama. Stabilisujući efekat se ispoljava nezavisno od tipa i obrasca varijantnih tripleta, njihove lokacije na 5' ili 3' kraju ekspanzije, kao i od toga da li su nastali *de novo* ili su nasleđeni [18, 23, 24, 41]. Smatra se da varijantni tripleti doprinose genetičkoj stabilizaciji *DMPK* ekspanzija kroz uticaj na formiranje i popravku mutagenih intermedijernih struktura (u vidu malih DNK petlji nestalih usled proklizavanja DNK polimeraze na ponovljenim motivima), što je pokazano u istraživanjima u ćelijskim model sistemima [43].

POVEZANOST VARIJANTNIH TRIPLETA SA METILACIJOM *DMPK* LOKUSA

CTG tripleti u *DMPK* genu nalaze se u okviru CpG ostrva veličine 3,5 kb, koje obuhvata 3' kraj *DMPK* gena, *DM1-AS* gen i 5' kraj nizvodnog *SIX5* gena (slika 1A) i karakteriše se određenim obrascem konstitutivne hiper- i hipometilacije kod zdravih soba. Ovo ostrvo uključuje i dva vezivna mesta za CTCF protein (eng. *CCCTC-binding factor*), koja kod zdravih osoba nisu metilovana [44]. Jedno mesto se nalazi neposredno uzvodno, a drugo neposredno nizvodno u odnosu na CTG triplete (slika 1A). Metilacija CpG ostrva u *DMPK* lokusu, pre svega uzvodno u odnosu na triplete, opisana je još krajem devedesetih godina prošlog veka kod najteže, kongenitalne forme DM1 [45]. Njeno prisustvo dovodi se u vezu sa ekspanzijama dužim od 1000 tripleta i smatra se da verovatno predstavlja dodatni mehanizam patogeneze za kongenitalnu formu čija molekularna osnova nije poznata [46]. Značaj izmenjene metilacije CpG ostrva kao epigenetičkog modifikatora uzročne mutacije DM1 postaje intrigantan nakon njenog opisivanja kod varijantnih *DMPK* ekspanzija, imajući u vidu da je ona prisutna kod bolesnika sa dijametalno suprotnim kliničkim prezentacijama – bolesnika sa najtežom kongenitalnom formom, sa jedne strane, i bolesnika sa varijantnim ekspanzijama i blažim simptomima od očekivanih, sa druge strane.

Metilacija CpG ostrva nizvodno od varijantnih *DMPK* ekspanzija različitih veličina i sa različitim brojem i obrascem CCG triplete opisana je 2015. godine [36]. Polarizovana metilacija je, zatim, potvrđena kod izvesnog broja *DMPK* ekspanzija sa CCG tripletima, bez podataka o njihovoj strukturi i veličini [33, 34]. U našoj grupi bolesnika, metilacija je, u skladu sa rezultatima dotadašnjih istraživanja, detektovana nizvodno od varijantnih ekspanzija različitih veličina i sa različitim brojem i obrascem CCG triplete na 3' kraju ekspanzije. Međutim, prvi put smo opisali metilaciju uzvodno od varijantnih ekspanzija koje su se odlikovale dugim CCG nizovima ili velikim brojem CCGCTG heksamera, takođe na 3' kraju ekspanzije [35]. Okolna metilacija nije zapožena kod bolesnika sa pojedinačnim CAG tripletom ili nekoliko CCG triplete na 5' kraju relativno malih ekspanzija [23], kao ni kod bolesnika sa jednim CTC tripletom na 3' kraju ekspanzije [35]. Ovi rezultati sugerisali su da bi stepen metilacije u regionima oko varijantnih ekspanzija mogao da zavisi od tipa i obrasca varijantnih tripleta, njihove lokacije u okviru ekspanzije, kao i od veličine same ekspanzije.

Kako bismo ispitali navedene pretpostavke, istraživanja smo usmerili ka ispitivanju metilacije samih varijantnih CCG triplete, kao i ka kvantifikaciji metilacije u CpG ostrvu uzvodno i nizvodno od *DMPK* ekspanzije. Dizajniranjem metil-specifičnog RP-PCR-a [47], otkrili smo da su CCG triplete metilovani u ćelijama krvi bolesnika. Primenom različito dizajniranih prajmera, metodu smo učinili semikvantitativnom (slika 1D), a dobijeni rezultati ukazali su na to da su CCG triplete heterogeno metilovani i da je stepen njihove metilacije izraženiji ukoliko su u ekspanzijama prisutni u većem

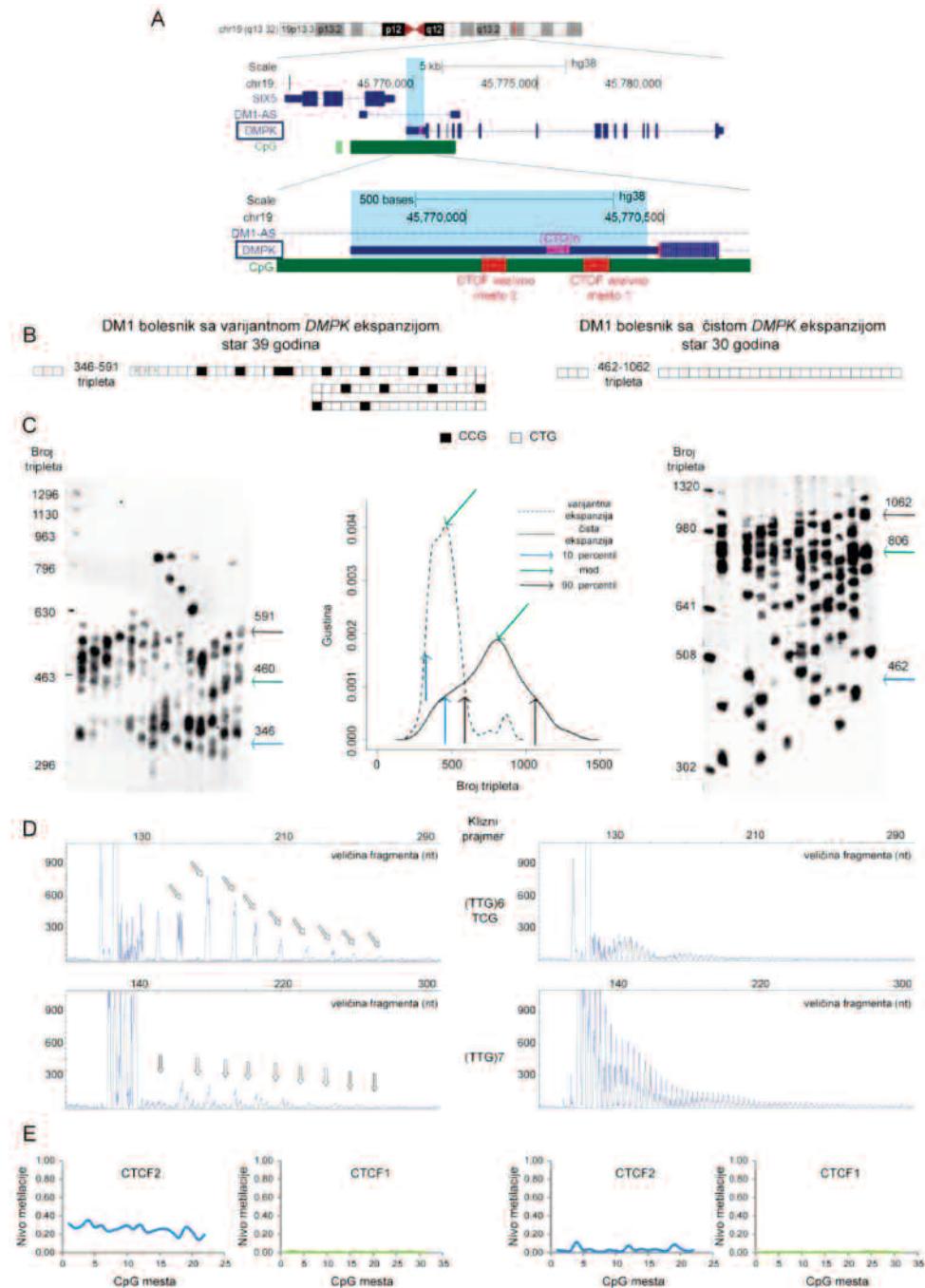
broju. Najveći stepen metilacije detektovan je kod bolesnika sa dugim CCG nizovima [35], velikim brojem CCGCTG heksamera ili velikim brojem pojedinačnih CCG tripleta na 3' kraju *DMPK* ekspanzije (naši neobjavljeni rezultati), kao što je slučaj kod bolesnika prikazanog na slici 1. Kvantifikacija metilacije CpG ostrva uzvodno i nizvodno od *DMPK* ekspanzije, korišćenjem ciljanog bisulfitnog sekvenciranja nove generacije, pokazala je da su izražena metilacija nizvodno od ekspanzije, kao i određeni stepen metilacije uzvodno, prisutni upravo kod bolesnika sa većinskim metilovanim CCG tripletima (slika 1E) (naši neobjavljeni rezultati). Ovi naši nalazi ukazuju na to da je glavni faktor koji utiče na stepen metilacije CCG tripleta, kao i na obrazac okolne metilacije, zastupljenost i struktura CCG tripleta, nezavisno od veličine ekspanzije. Na osnovu opisanih zapažanja, postavili smo hipotezu da bi metilacija DNK mogla da bude inicirana u okviru samih CCG tripleta na 3' kraju ekspanzije, a da se zatim lokalno širi, zahvatajući uzvodne i nizvodne CpG dinukleotide. Hipoteza o iniciranju metilacije DNK u okviru samih ekspanzija postavljena je i za *C9orf72* lokus u kome ekspanzije GGGGCC heksamera uzrokuju najčešći nasledni oblik amiotrofične lateralne skleroze. U *C9orf72* lokusu, metilacija je skoncentrisana na ponovljenim motivima na 5' kraju ekspanzije, a zahvata i uzvodne CpG dinukleotide [47].

Efekat metilacije DNK kao epigenetičkog modifikatora fenotipa DM1 zahteva ispitivanje na većoj grupi bolesnika sa varijantnim ekspanzijama praćenoj detaljnim opisima kliničke prezentacije. Takođe, ostaje otvoreno pitanje molekularnog mehanizma kojim bi metilacija varijantnih *DMPK* ekspanzija mogla da ostvaruje efekat na fenotip. Skloni smo da verujemo da bi varijantni tripleti svoj stabilijući efekat na *DMPK* ekspanzije jednim delom mogli ispoljavati putem metilacije DNK. Takođe, jedinstveni efekat metilacije u *DMPK* lokusu, nezavisno od toga da li je ona povezana sa velikim ekspanzijama koje uzrokuju kongenitalnu formu bolesti ili sa varijantnim ekspanzijama, mogao bi biti genetička stabilizacija lokusa. Naime, metilacija uzvodno i nizvodno od *DMPK* ekspanzije kod bolesnika sa varijantnim CCG tripletima zajedno sa metilacijom nizvodno od ekspanzija povezanih sa kongenitalnom formom DM1, briše jasnu granicu polarizovanosti metilacije DNK kod ovih bolesnika. U skladu sa biološkom ulogom metilacije DNK kao odbrambenog mehanizma od „invazivnih“ ponovljenih sekvenci [48], uključujući i ekspanzije mikrosatelita [49], može se prepostaviti da lokalna metilacija DNK stabilizuje *DMPK* ekspanzije, slično lokalnoj metilaciji povezanoj sa ekspanzijama CGG tripleta u *FMR1* lokusu, koje uzrokuju Fragilni X sindrom. Testiranje ove hipoteze zahteva dalja istraživanja u model sistemima u kojima bi genetičkim i epigenetičkim manipulacijama efekti samih varijantnih tripleta i metilacije DNK mogli nezavisno da se ispituju.

VARIJANTNI TRIPLETI MODIFIKUJU UZRAST POČETKA BOLESTI KROZ STABILIZACIJU DMPK EKSPANZIJA U SOMATSKIM ĆELIJAMA

Imajući u vidu stabilijući efekat varijantnih tripleta u somatskim ćelijama, pažnja je usmerena na ispitivanje povezanosti stabilizacije *DMPK* ekspanzija i uzrasta pojave prvih simptoma bolesti [41]. Najveći deo ukupne varijabilnosti u uzrastu pojave prvih simptoma objašnjava sama veličina ekspanzije, a zatim i individualne razlike u varijabilnosti somatskog mosaicizma među bolesnicima [17]. Drugim rečima, bolesnici kod kojih se ekspanzije brže povećavaju tokom života ispoljavaju bolest ranije od proseka očekivanog za datu veličinu ekspanzije [17]. Sličan rezultat je dođen kod HD bolesnika, kod kojih su individualne razlike u somatskoj nestabilnosti *HTT* ekspanzija bile značajan prediktor uzrasta početka bolesti [50]. Navedeni zaključci podržavaju hipotezu somatskog praga, koji je predložen za HD [51] i DM1 [17], a prema kojoj do ispoljavanja simptoma bolesti dolazi kada dovoljan broj somatskih ćelija akumulira dovoljno duge ekspanzije koje ostvaruju toksičan efekat na nivou molekula RNK i/ili proteina. Naša studija je pokazala da upravo individualne razlike u nivou somatske nestabilnosti ostvaruju statistički značajno veći efekat na uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika sa varijantnim u odnosu na one sa čistim ekspanzijama [41]. Ovaj rezultat ukazuje na to da varijantni tripleti kroz stabilizaciju *DMPK* ekspanzija predisponiraju DM1 bolesnike za kasniji početak bolesti, što ih čini važnim modifikatorima DM1 fenotipa [41].

Zaključak da varijantni tripleti modifikuju uzrast pojave prvih DM1 simptoma kroz stabilizaciju *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama, u skladu je sa nalazom da supresija somatske nestabilnosti u mišjim HD modelima, kako genetičkim manipulacijama gena za reparacione mehanizme DNK [51] tako i farmakološkim agensima, u velikoj meri odlaže početak bolesti [51, 52]. Osim toga, studije asocijacije na nivou čitavih genoma kod HD bolesnika identifikovale su varijante u genima odgovornim za reparaciju DNK kao modifikatore toka bolesti [53, 54]. Sličan rezultat je dođen i u nedavnoj studiji na velikim grupama HD i DM1 bolesnika, u kojoj je pokazano da varijanta u genu *MSH3* značajno modifikuje uzrast početka obe bolesti [55], najverovatnije putem stabilijućeg efekta na dati lokus u somatskim ćelijama [56]. Sveukupno, rezultati istraživanja somatske nestabilnosti ekspanzija povezanih sa različitim bolestima, posebno saznanja stečena na DM1 i HD bolesnicima, učinila su somatsku nestabilnost privlačnom metom za razvoj inovativnih terapija.



Slika 1. Somatska nestabilnost i lokalna epigenetička struktura DMPK ekspanzija slične veličine progenitornog alela i različite strukture kod DM1 bolesnika slične starosne dobi. (A) Prikaz anotacije 19q13.32 regiona genoma preuzet iz UCSC genomskog pretraživača (<https://genome.ucsc.edu/>). CTG tripleti (pink pravougaonik) nalaze se u 3' netranslatirajućem regionu DMPK gena (plavi pravougaonici - egzoni, plave linije - introni). CpG ostro sadrži dva vezivna mesta za CTCF protein (zeleni pravougaonik) obuhvata 3' kraj DMPK gena, DM1-AS gen i 5' kraj SIK5 gena. CpG ostro sadrži dva vezivna mesta za CTCF protein, jedno uzvodno (CTCF1) i jedno nizvodno (CTCF2) u odnosu na CTG triplete. (B) Struktura DMPK ekspanzije sa varijantnim CCG tripletima na 3' kraju (levo) i sa čistim CTG tripletima (desno), utvrđena RP-PCR-om (eng. repeat-primed PCR) i Sangerovim sekvenciranjem [20]. Usled metodoloških ograničenja, nejasnoće u strukturi varijante ekspanzije uzvodno od 3' kraja prikazane su znacima pitanja. (C) Određivanje veličine i kvantifikacija nestabilnosti DMPK ekspanzija u celijama krv primenom SP-PCR-a iz pojedinačnih molekula DNK (eng. single-molecule small-pool PCR). Rendgenski filmovi sa SP-PCR proizvodima vizueliziranim hibridizacijom sa digoksigeninom obeleženom (CAG)12 probom [16, 41]. Svaki signal predstavlja DMPK ekspanziju umnoženu iz pojedinačne celije. Veličine DMPK alela i standarda za dužinu fragmenta izražene su u broju tripleta. Na osnovu >100 analiziranih DMPK ekspanzija po uzorku, dobijene su distribucije učestalosti DMPK ekspanzija (grafik gustine u sredini). Strelice na distribucijama i rendgenskim filmovima označavaju poziciju modalne veličine, kao i veličine 10. i 90. percentila distribucije. Stepen somatske nestabilnosti, predstavljen razlikom između veličine 90. i 10. percentila, niži je kod bolesnika sa varijantnom ekspanzijom, što se ogleda užom distribucijom i bez nagnutosti ka većim veličinama alela. (D) Detekcija metilacije CCG tripleta na 3' kraju DMPK ekspanzije korišćenjem metil-specifičnog RP-PCR-a [35]. U reakciji RP-PCR-a sa bisulfitno konvertovanom DNK i kliznim prajmerom (TTG)6TCG, koji se poslednjim tripletom specifično vezuje za metilovane CCG triplete, dobijeni profil za varijantnu DMPK ekspanziju sadrži specifične signale (označene strelicama) koji odgovaraju pozicijama pojedinačnih metilovanih CCG tripleta (levo). Sa druge strane, dobijeni leštvičast profil za čistu DMPK ekspanziju odlikuje se signalima slabog intenziteta usled smanjene efikasnosti vezivanja ovog kliznog prajmera za nemetilovane CTG triplete (desno). Primenom kliznog prajmera (TTG)7, koji se vezuje za nemetilovane CCG triplete i nemetilovane CTG triplete, za čistu DMPK ekspanziju dobijen je karakterističan leštvičast RP-PCR profil koji ukazuje na odsustvo metilacije, dok se profil dobijen za varijantu DMPK ekspanziju odlikuje padom u intenzitetu signala i prazninama (označene strelicom), što ukazuje na većinsku metilaciju CCG tripleta. (E) Kvantifikacija metilacije DNK u CpG dinukleotidima uzvodno i nizvodno od CTG tripleta korišćenjem ciljanog bisulfitnog sekvenciranja nove generacije (Illumina). Povećan nivo metilacije DNK prisutan je nizvodno od varijantne ekspanzije i zahvata CTCF2 mesto. Izmjenjena metilacija CpG dinukleotida nije detektovana uzvodno od varijantne DMPK ekspanzije, kao ni u okolnim sekvcencama čiste DMPK ekspanzije.

UTICAJ VARIJANTNIH TRIPLETA NA MEĐUGENERACIJSKU PRENOŠENJE DMPK EKSPANZIJA I KLINIČKE IMPLIKACIJE

Molekularna osnova genetičke anticipacije kod DM1 je mejotička nestabilnost uzročne mutacije kod koje pravac i veličina promene u međugeneracijskom prenošenju pokazuju specifičnosti vezane za veličinu same ekspanzije i pol roditelja prenosioца [57]. Ekspanzije veličine 50-100 tripleta odlikuju se relativnom stabilnošću ako ih prenose majke, dok kod očeva gotovo uvek podležu daljoj ekspanziji u narednoj generaciji [58]. Sa druge strane, ekspanzije veličine preko 100 tripleta oba pola prenose izuzetno nestabilno, pri čemu se prilikom prenošenja velikih ekspanzija kod očeva zapaža znatno češći ideo kontrakcija (smanjenje broja tripleta) [59]. To je razlog zbog kojeg se kongenitalna forma bolesti sa ekspanzijama veličine preko 1000 tripleta nasleđuje gotovo isključivo od majke. Navedene osobine mejotičke nestabilnosti DMPK ekspanzije razjasnile su tipičan primer genetičke anticipacije u DM1 porodicama u kojima asimptomatski deda prenosi ekspanziju na čerku koja svom detetu prenosi kongenitalnu formu bolesti. Međutim, već su rane studije na velikom broju DM1 porodica ukazale na odstupanja u navedenim obrascima međugeneracijskog prenošenja DM1 ekspanzije [59]. Intrigantne su bile porodice bez kongenitalne forme bolesti u kojima je prenosilac majka sa adultnom formom bolesti, posebno one kod kojih je opisivana međugeneracijska kontrakcija. Ispostavilo se da su varijantni tripleti, za sada, jedini poznati faktori koji modifikuju efekat veličine ekspanzije i pola roditelja tokom međugeneracijskog prenošenja DMPK ekspanzije.

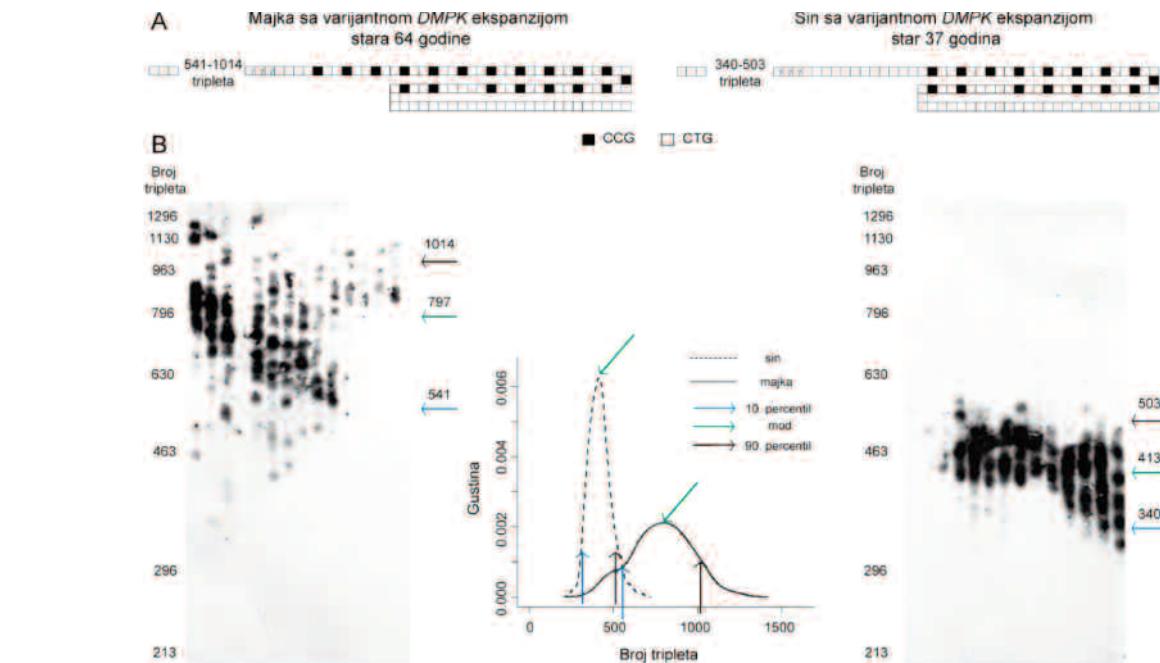
Poređenjem međugeneracijskih prenošenja varijantnih i čistih DMPK ekspanzija, uzimajući u obzir literaturne i spostvrene podatke do 2017. godine, pokazali smo da je ideo kontrakcija ili stabilnih prenošenja statistički značajno veći u porodicama sa varijantnim DM1 ekspanzijama, kao i da u slučaju prenošenja varijantnih DMPK ekspanzija ne postoji specifičnosti vezane za pol roditelja prenosioца [20]. Na slici 2 prikazan je primer DM1 porodice (majke i sina) sa velikim brojem CCG tripleta prisutnih u vidu ponovljenih motiva CCG(CTG)2 na 3' kraju ekspanzije i najverovatnijom međugeneracijskom kontrakcijom. Zapažanje da se ekspanzija sa jednim varijantnim CAG tripletom stabilno prenosi ili podleže kontrakciji u sukcesivnim generacijama ukazuje na to da i pojedinačna zamena u tripletu CTG može uticati na povećanu mejotičku stabilnost DMPK ekspanzije [23]. Smatra se da mejotička stabilnost varijantnih DMPK ekspanzija, posebno u slučajevima kada je majka prenosilac, predstavlja najverovatnije objašnjenje za odsustvo kongenitalnih formi bolesti u ovim DM1 porodicama [18, 23]. Činjenica da prisustvo varijantnih tripleta u DMPK ekspanzijama može uticati na međugeneracijsku promenu veličine ekspanzije, sa direktnim fenotipskim posledicama, u praksi otežava pružanje adekvantog genetičkog saveta DM1 porodicama sa varijantnim ekspanzijama.

Bez obzira na to što pol roditelja prenosioца ne utiče na samo prenošenje varijantnih DMPK ekspanzija, treba istaći da su sve do sada opisane *de novo* nastale varijantne DMPK ekspanzije prenešene sa oca, bilo da je u pitanju ekspanzija sa pojedinačnim CTC triplatom [20], ili sa različitim obrascem CCG tripleta [24, 25]. Osim kod DM1, pokazano je da varijantni ponovljeni motivi utiču na stabilizaciju prenošenja ekspanzija kroz generacije i u nekim drugim bolestima ekspanzija, kao što su različite forme spinocerebelarnih ataksija [31, 32, 60].

Zanimljivo je da su među DM1 porodicama sa varijantnim DMPK ekspanzijama opisane i kontrakcije u međugeneracijskom prenošenju praćene ranijim uzrastom početka bolesti [20, 22]. Ovde treba imati u vidu da je interpretacija međugeneracijske dinamike rezultat kombinacije mejotičke nestabilnosti kod roditelja prenosioца i mitotičke nestabilnosti u ćelijama krvi roditelja i potomaka, koje su kontinuirane tokom života i nagnute ka daljim ekspanzijama (slika 2). Zbog nemogućnosti nedvosmislenog utvrđivanja veličine ekspanzije koju dete nasleđuje, ostaje otvoreno pitanje da li je u navedenim slučajevima zaista reč o kontrakcijama, praćenim ranijim početkom bolesti, ili pseudokontrakcijama u kojima je međugeneracijsko povećanje broja tripleta zamaskirano somatskim mozaicizmom kod roditelja. Međutim, slično zapažanje opisano je kod bolesnika sa spinocerebelarnom ataksijom tip 10, kod kojih je u skoro svim slučajevima kontrakcija varijantnih ekspanzija bila praćena ranijim ispoljavanjem kliničkih simptoma bolesti [60].

ZAKLJUČAK

Detaljna molekularno-genetička i klinička ispitivanja malobrojnih DM1 bolesnika sa varijantnim ekspanzijama je od izuzetnog značaja iz nekoliko razloga. Najpre, trenutni podaci ukazuju na to da se bolesnici sa varijantnim ekspanzijama razlikuju od onih sa čistim, u vidu stabilnijeg prenošenja ekspanzije kroz generacije, zatim da imaju kasniji početak simptoma i sporiju progresiju bolesti. Ova saznanja treba pažljivo interpretirati u cilju pružanja adekvatnog genetičkog saveta. Dodatno, DM1 bolesnici sa varijantnim ekspanzijama bi mogli značajno odstupati u kliničkim studijama za nove terapeutike, koje se obično sprovode na manjem broju bolesnika, što može uticati na tumačenje rezultata i donošenje adekvatnih zaključaka. Na kraju, pokazana uloga varijantnih tripleta u somatskoj stabilizaciji ekspanzija ukazuje na značaj ispitivanja novih farmakoloških agenasa, koji bi suzbijanjem somatske nestabilnosti odložili pojavu i ublažili simptome bolesti.



Slika 2. Primer međugeneracijskog prenošenja varijantne DMPK ekspanzije. (A) Struktura DMPK ekspanzije kod DM1 porodice (majka i sin) koja poseduje varijantne triplete CCG na 3' kraju ekspanzije, utvrđena RP-PCR-om (eng. *repeat-primed PCR*) i Sangerovim sekvenciranjem [20]. Usled metodoloških ograničenja, nejasnoće u strukturi varijantne ekspanzije uzvodno od samog 3' kraja prikazane su znacima pitanja. (B) Određivanje veličine i kvantifikacija nestabilnosti DMPK ekspanzija u ćelijama krvi primenom SP-PCR-a iz pojedinačnih molekula DNK (eng. *single-molecule small-pool PCR*). Rendgenski filmovi sa SP-PCR proizvodima vizuelizovanim hibridizacijom sa digoksigeninom obeleženom (CAG)12 probom [16, 41]. Svaki signal predstavlja DMPK ekspanziju umnoženu iz pojedinačne ćelije. Veličine DMPK alela i standarda za dužinu fragmenata izražene su u broju tripleta. Na osnovu >100 analiziranih DMPK ekspanzija po uzorku, dobijene su distribucije učestalosti DMPK ekspanzija (grafik gustine u sredini). Strelice na distribucijama i rendgenskim filmovima označavaju poziciju modalne veličine, kao i veličine 10. i 90. percentila distribucije. Stepen somatskog mozaicizma zavisi od uzrasta bolesnika pri uzorkovanju, zanimljivo je da se opsezi veličina ekspanzije ne preklapaju između majke i sina, što govori u prilog verovatnoj kontrakciji prilikom međugeneracijskog prenošenja.

ZAHVALNICA

Rad je rezultat istraživanja koja je podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republika Srbija (projekti br. 173016 i 175083). Posebnu zahvalnost dugujemo svim DM1 porodicama iz Srbije za učešće u našim istraživanjima.

LITERATURA

- Hannan AJ. Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):286-98. doi: 10.1038/nrg.2017.115.
- Subramanian S, Mishra RK, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol.* 2003;4(2):R13. doi: 10.1186/gb-2003-4-2-r13.
- Brinkmann B, Klantschar M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet.* 1998;62(6):1408-15. doi: 10.1086/301869.
- Depienne C, Mandel JL. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* 2021;108(5):764-85. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.03.011.
- Paulson H. Repeat expansion diseases. *Handb Clin Neurol.* 2018;147:105-23. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9.
- Meola G, Cardani R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(4):594-606. doi: 10.1016/j.bbadi.2014.05.019.
- Rakocevic-Stojanovic V, Peric S, Basta I, Dobricic V, Ralic V, Kacar A, et al. Variability of multisystemic features in myotonic dystrophy type 1—lessons from Serbian registry. *Neurol Res.* 2015;37(11):939-44. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000068.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell.* 1992;69(2):385.
- Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science.* 2000;289(5485):1769-73.
- Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125.
- Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(1):260-5. doi: 10.1073/pnas.1013343108.
- De Antonio M, Dogan C, Hamroun D, Mati M, Zerrouki S, Eymard B, et al. Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(10):572-80. doi: 10.1016/j.neurol.2016.08.003.

13. Savic Pavicevic D, Miladinovic J, Brkusanin M, Svikovic S, Djurica S, Brajuskovic G, et al. Molecular genetics and genetic testing in myotonic dystrophy type 1. *Biomed Res Int.* 2013;2013:391821. doi: 10.1155/2013/391821.
14. Monckton DG, Wong LJ, Ashizawa T, Caskey CT. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet.* 1995;4(1):1-8.
15. Wong LJ, Ashizawa T, Monckton DG, Caskey CT, Richards CS. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet.* 1995;56(1):114-22.
16. Savic D, Rakocvic-Stojanovic V, Keckarevic D, Culjkovic B, Stojkovic O, Mladenovic J, et al. 250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile-adult DM1. *Hum Mutat.* 2002;19(2):131-9. doi: 10.1002/humu.10027.
17. Morales F, Couto JM, Higham CF, Hogg G, Cuenca P, Braida C, et al. Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum Mol Genet.* 2012;21(16):3558-67. doi: 10.1093/hmg/dds185.
18. Braida C, Stefanatos RK, Adam B, Mahajan N, Smeets HJ, Niel F, et al. Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1399-412. doi: 10.1093/hmg/ddq015.
19. Musova Z, Mazanec R, Krepelova A, Ehler E, Vales J, Jaklova R, et al. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(7):1365-74. doi: 10.1002/ajmg.a.32987.
20. Pesovic J, Peric S, Brkusanin M, Brajuskovic G, Rakocovic-Stojanovic V, Savic-Pavicevic D. Molecular genetic and clinical characterization of myotonic dystrophy type 1 patients carrying variant repeats within DMPK expansions. *Neurogenetics.* 2017;18(4):207-18. doi: 10.1007/s10048-017-0523-7.
21. Santoro M, Masciullo M, Pietrobono R, Conte G, Modoni A, Bianchi ML, et al. Molecular, clinical, and muscle studies in myotonic dystrophy type 1 (DM1) associated with novel variant CCG expansions. *J Neurol.* 2013;260(5):1245-57. doi: 10.1007/s00415-012-6779-9.
22. Botta A, Rossi G, Marcaurelio M, Fontana L, D'Apice MR, Brancati F, et al. Identification and characterization of 5' CCG interruptions in complex DMPK expanded alleles. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(2):257-61. doi: 10.1038/ejhg.2016.148.
23. Tome S, Dandelot E, Dogan C, Bertrand A, Genevieve D, Pereon Y, et al. Unusual association of a unique CAG interruption in 5' of DM1 CTG repeats with intergenerational contractions and low somatic mosaicism. *Hum Mutat.* 2018;39(7):970-82. doi: 10.1002/humu.23531.
24. Cumming SA, Hamilton MJ, Robb Y, Gregory H, McWilliam C, Cooper A, et al. De novo repeat interruptions are associated with reduced somatic instability and mild or absent clinical features in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(11):1635-47. doi: 10.1038/s41431-018-0156-9.
25. Mangin A, de Pontual L, Tsai YC. Robust Detection of Somatic Mosaicism and Repeat Interruptions by Long-Read Targeted Sequencing in Myotonic Dystrophy Type 1. *2021;22(5).* doi: 10.3390/ijms22052616.
26. Radvansky J, Ficek A, Minarik G, Palfy R, Kadasi L. Effect of unexpected sequence interruptions to conventional PCR and repeat primed PCR in myotonic dystrophy type 1 testing. *Diagn Mol Pathol.* 2011;20(1):48-51. doi: 10.1097/PDM.0b013e3181efe290.
27. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, Mizuguchi T, Hamanaka K, Mori K, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1215-21. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y.
28. Wenninger S, Cumming SA, Gutschmidt K, Okkersen K, Jimenez-Moreno AC, Daidj F, et al. Associations Between Variant Repeat Interruptions and Clinical Outcomes in Myotonic Dystrophy Type 1. *Neurol Genet.* 2021;7(2):e572. doi: 10.1212/NXG.0000000000000572.
29. Peric S, Mandic-Stojmenovic G, Stefanova E, Savic-Pavicevic D, Pesovic J, Ilic V, et al. Frontostriatal dysexecutive syndrome: a core cognitive feature of myotonic dystrophy type 2. *J Neurol.* 2015;262(1):142-8. doi: 10.1007/s00415-014-7545-y.
30. Miller JN, van der Plas E. Variant repeats within the DMPK CTG expansion protect function in myotonic dystrophy type 1. *2020;6(5):e504.* doi: 10.1212/nxg.0000000000000504.
31. Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, Zuhlke C, Nakamura K, Rasmussen A, et al. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(2):215-22. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201954.
32. Matsuura T, Fang P, Pearson CE, Jayakar P, Ashizawa T, Roa BB, et al. Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10: repeat purity as a disease modifier? *Am J Hum Genet.* 2006;78(1):125-9. doi: 10.1086/498654.
33. Hildonen M, Knab KL, Duno M, Vissing J, Turner Z. Stable Longitudinal Methylation Levels at the CpG Sites Flanking the CTG Repeat of DMPK in Patients with Myotonic Dystrophy Type 1. *Genes (Basel).* 2020;11(8). doi: 10.3390/genes11080936.
34. Légaré C, Overend G, Guay SP, Monckton DG, Mathieu J, Gagnon C, et al. DMPK gene DNA methylation levels are associated with muscular and respiratory profiles in DM1. *Neurol Genet.* 2019;5(3):e338. doi: 10.1212/NXG.0000000000000338.
35. Pešović J. Mitotička i mejotička nestabilnost DMPK ekspanzija sa varijantnim ponovcima kao genetički modifikator fenotipa miotonične distrofije tipa 1 [Doctoral dissertation]. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet; 2019.
36. Santoro M, Fontana L, Masciullo M, Bianchi ML, Rossi S, Leoncini E, et al. Expansion size and presence of CCG/CTC/CGG sequence interruptions in the expanded CTG array are independently associated to hypermethylation at the DMPK locus in myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(12):2645-52. doi: 10.1016/j.bbadi.2015.09.007.
37. Martorell L, Johnson K, Boucher CA, Baiget M. Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)n repeat during human fetal development. *Hum Mol Genet.* 1997;6(6):877-80.
38. Martorell L, Monckton DG, Gamez J, Johnson KJ, Gich I, Lopez de Munain A, et al. Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet.* 1998;7(2):307-12.
39. Corrales E, Vasquez M, Zhang B, Santamaría-Ulloa C, Cuenca P, Krahe R, et al. Analysis of mutational dynamics at the DMPK (CTG)n locus identifies saliva as a suitable DNA sample source for genetic analysis in myotonic dystrophy type 1. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216407. doi: 10.1371/journal.pone.0216407.
40. Gomes-Pereira M, Bidichandani SI, Monckton DG. Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2004;277:61-76. doi: 10.1385/1-59259-804-8:061.
41. Pesovic J, Peric S, Brkusanin M, Brajuskovic G, Rakocovic-Stojanovic V, Savic-Pavicevic D. Repeat Interruptions Modify Age at Onset in Myotonic Dystrophy Type 1 by Stabilizing DMPK Expansions in Somatic Cells. *Front Genet.* 2018;9:601. doi: 10.3389/fgene.2018.00601.
42. Morales F, Vásquez M, Corrales E, Vindas-Smith R, Santamaría-Ulloa C, Zhang B, et al. Longitudinal increases in somatic mosaicism of the expanded CTG repeat in myotonic dystrophy type 1 are associated with variation in age-at-onset. *Hum Mol Genet.* 2020;29(15):2496-507. doi: 10.1093/hmg/ddaa123.
43. Rolfsmeier ML, Dixon MJ, Lahue RS. Mismatch repair blocks expansions of interrupted trinucleotide repeats in yeast. *Mol Cell.* 2000;6(6):1501-7.
44. Filippova GN, Thienes CP, Penn BH, Cho DH, Hu YJ, Moore JM, et al. CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet.* 2001;28(4):335-43. doi: 10.1038/ng570.

45. Steinbach P, Glaser D, Vogel W, Wolf M, Schwemmle S. The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat. *Am J Hum Genet.* 1998;62(2):278-85. doi: 10.1086/301711.
46. Barbe L, Lanni S, Lopez-Castel A, Franck S, Spits C, Keymolen K, et al. CpG Methylation, a Parent-of-Origin Effect for Maternal-Biased Transmission of Congenital Myotonic Dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2017;100(3):488-505. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.033.
47. Xi Z, Zhang M, Bruni AC, Maletta RG, Colao R, Fratta P, et al. The C9orf72 repeat expansion itself is methylated in ALS and FTLD patients. *Acta Neuropathol.* 2015;129(5):715-27. doi: 10.1007/s00401-015-1401-8.
48. Putiri EL, Robertson KD. Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin Epigenetics.* 2011;2(2):299-314. doi: 10.1007/s13148-010-0017-z.
49. Dion V, Wilson JH. Instability and chromatin structure of expanded trinucleotide repeats. *Trends Genet.* 2009;25(7):288-97. doi: 10.1016/j.tig.2009.04.007.
50. Swami M, Hendricks AE, Gillis T, Massood T, Mysore J, Myers RH, et al. Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Hum Mol Genet.* 2009;18(16):3039-47. doi: 10.1093/hmg/ddp242.
51. Budworth H, Harris FR, Williams P, Lee DY, Holt A, Pahnke J, et al. Suppression of Somatic Expansion Delays the Onset of Pathophysiology in a Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS Genet.* 2015;11(8):e1005267. doi: 10.1371/journal.pgen.1005267.
52. Nakamori M, Panigrahi GB, Lanni S, Gall-Duncan T, Hayakawa H, Tanaka H, et al. A slipped-CAG DNA-binding small molecule induces trinucleotide-repeat contractions in vivo. *Nat Genet.* 2020;52(2):146-59. doi: 10.1038/s41588-019-0575-8.
53. Genetic Modifiers of Huntington's Disease C. Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell.* 2015;162(3):516-26. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.003.
54. Moss DJH, Pardiñas AF, Langbehn D, Lo K, Leavitt BR, Roos R, et al. Identification of genetic variants associated with Huntington's disease progression: a genome-wide association study. *Lancet Neurol.* 2017;16(9):701-11. doi: 10.1016/s1474-4422(17)30161-8.
55. Flower M, Lomeikaite V, Ciosi M, Cumming S, Morales F, Lo K, et al. MSH3 modifies somatic instability and disease severity in Huntington's and myotonic dystrophy type 1. *Brain.* 2019;142(7):1876-86. doi: 10.1093/brain/awz115.
56. Morales F, Vasquez M, Santamaría C, Cuenca P, Corrales E, Monckton DG. A polymorphism in the MSH3 mismatch repair gene is associated with the levels of somatic instability of the expanded CTG repeat in the blood DNA of myotonic dystrophy type 1 patients. *DNA Repair (Amst).* 2016;40:57-66. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.01.001.
57. Rakocevic-Stojanovic V, Savic D, Pavlovic S, Lavrnec D, Stevic Z, Basta I, et al. Intergenerational changes of CTG repeat depending on the sex of the transmitting parent in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Neurol.* 2005;12(3):236-7. doi: 10.1111/j.1468-1331.2004.01075.x.
58. Savic D, Keckarevic D, Brankovic-Sreckovic V, Apostolski S, Todorovic S, Romac S. Clinical case report atypical myopathy in a young girl with 91 CTG repeats in DM1 locus and a positive DM1 family history. *Int J Neurosci.* 2006;116(12):1509-18. doi: 10.1080/00207450600553182.
59. Ashizawa T, Anvret M, Baiget M, Barcelo JM, Brunner H, Cobo AM, et al. Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet.* 1994;54(3):414-23.
60. McFarland KN, Liu J, Landrian I, Gao R, Sarkar PS, Raskin S, et al. Paradoxical effects of repeat interruptions on spinocerebellar ataxia type 10 expansions and repeat instability. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(11):1272-6. doi: 10.1038/ejhg.2013.32.

Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije

Marina Andjelković

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

Kontakt: marina.andjelkovic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Primarna cilijarna diskinezija (PCD) predstavlja redak genetički poremećaj motornih cilija koji se najčešće nasleđuje na autozomno recesivan način, a uočeno je i nasleđivanje vezano za hromozom X i autozomno dominantno nasleđivanje ovog oboljenja. Osnovne karakteristike PCD-a su abnormalnosti pokretnih cilija, koje su posledica patogenih varijanti u genima koji kodiraju za proteine koji su neophodni za pravilnu strukturu i funkciju ovih organeli. PCD predominantno obuhvata respiratorni trakt i reproduktivne organe, a utiče i na lateralnost unutrašnjih organa. Klinička prezentacija nije specifična, već obuhvata simptome različitih respiratornih oboljenja, što često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze, zbog čega je upotreba dijagnostičkih analiza i genetičkog profilisanja neophodna za utvrđivanje PCD-a. Metode sekvenciranja nove generacije omogućile su poslednjih godina detekciju velikog broja novih gena uzročnika i gena kandidata za PCD, pa je do sada opisano 45 gena uzročnika koje su odgovorni za nastanak PCD-a i 200 gena kandidata, a smatra se da je taj broj mnogo veći, s obzirom da 2500 proteina učestvuju u izgradnji i pravilnom funkcionisanju cilija. Nakon detekcije genetičkih varijanti u uzorcima pacijenata suspektnih na PCD, molekularna karakterizacija varijanti, upotrebom *in silico* i/ili eksperimentalnih metoda, omogućava determinaciju njihove patogenosti i uspostavljanje korelacije između genotipa i fenotipa pacijenata. Terapijski protokoli kojima se leče PCD pacijenti nisu specifični za ovo oboljenje već se extrapoliraju iz terapijskih protokola drugih plućnih oboljenja sa sličnom kliničkom prezentacijom bolesti. Stoga su istraživanja terapeutika na animalnim model sistemima od ključnog značaja za razvoj adekvatne terapije za PCD pacijente.

Ključne reči: Primarna cilijarna diskinezija (PCD), dijagnostički testovi, genomsко profilisanje PCD pacijentata, funkcionalna karakterizacija varijanti, model sistemi za PCD, terapija za PCD.

Molecular basis of primary ciliary dyskinesia

Marina Andjelkovic

Laboratory for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: marina.andjelkovic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder that is most often inherited in an autosomal recessive manner, nevertheless X-linked and autosomal dominant inheritance of this disease have been reported. The main characteristics of PCD are abnormalities of motile cilia, which are a consequence of pathogenic variants in genes encoding proteins necessary for the proper structure and function of these organelles. PCD predominantly involves the respiratory tract and reproductive organs, and also affects the laterality of internal organs. The clinical presentation is not specific, and most often includes the symptoms of various respiratory diseases, which leads to the delayed establishment of an accurate diagnosis. Consequently, the use of diagnostic and genetic analyses is necessary for the determination of PCD. Next-generation sequencing methods have enabled the detection of a large number of novel PCD disease-causing and candidate genes in recent years, and so far, 45 PCD disease-causing and 200 candidate genes have been described, and this number is thought to be much higher since 2500 proteins participate in cilia formation. After detection of genetic variants in samples of patients suspected of PCD, molecular characterization of variants, using *in silico* and/or experimental methods, allows determination of their pathogenicity and establishment of genotype-phenotype correlation in patients. Therapeutic protocols for treating PCD patients are not specific for this disease rather, the therapy is extrapolated from other similar lung diseases. Therefore, research on therapeutics on animal model systems is crucial for the development of adequate therapy for PCD patients.

Keywords: Primary ciliary dyskinesia (PCD), diagnostic tests, genomic profiling of PCD patients, functional characterization of variants, model systems for PCD, therapy for PCD.

UVOD

Sindrom koji je obuhvatio trijadu hroničnog sinuzitisa, bronhiektažije i *situs viscerum inversus* (SI), prvi je opisao Kartagener (1). Četrdeset godina kasnije, Afzelius je opisao četiri osobe sa rekurentnim bronhitism i pneumonijom povezanim sa ponovljenim infekcijama gornjih disajnih puteva koji su takođe imali SI u 50% slučajeva, tada poznatom kao Kartagenerov sindrom (2). Kod ovih pacijenata su elektronskom mikroskopijom detektovane nepokretne cilije kao posledica nedostatka dineinskih ručica u respiratornim cilijama i repovima spermatozoida. Ova studija pokazala je da urođeni poremećaj motornih cilija u respiratornom traktu i flagelama spermatozoida može prouzrokovati hroničnu infekciju disajnih puteva i sterilitet kod muškaraca i tada je usvojen termin „sindrom nepokretne cilije“ (Afzelius).

Istraživanja koja su usledila pokazala su da pored cilijarne nepokretljivosti i cilijarna diskinezija (poremećen obrazac kretanja) kao i cilijarna aplazija (odsustvo cilija) dovode do ovog oboljenja, pa je ovaj termin zamenjen terminom „primarna cilijarna diskinezija“ (2, 3). Termin „primarna“ korišćen je za razlikovanje ovog stanja od sekundarnih abnormalnosti cilija izazvanih upalom i infekcijom.

Primarna cilijarna diskinezija (PCD) je vrlo redak poremećaj motornih cilija (OMIM 244400) (3) koji se manifestuje odmah po rođenju. Najčešći tip nasleđivanja ovog oboljenja je autozomno recessivno nasleđivanje (homozigotne varijante, udružene heterozigotne varijante i trans-alelske heterozigotne varijante). Poslednjih godina nasleđivanje vezano za hromozom X se sve češće detektuje kod pacijenata sa PCD-om (4-6), a nedavno su identifikovane i autozomno dominantne genetičke varijante u genu *FOXJ1* koje uzrokuju PCD asociiran sa hidrocefalusom (7). Prevalenca bolesti je veoma promenljiva u celoj Evropi, jer je ovaj poremećaj često nedovoljno dijagnostikovan zbog nepristupačnosti dijagnostičkih i genetičkih testova (8). Procenjena prevalenca je između 1: 4000 i 1:40 000, s pravom prevalencom verovatno oko 1:10 000 (8, 9) i većim stopama u određenim etničkim grupama zbog konsagriniteta (10, 11).

Osnovna ultrastrukturalna karakteristika ovog oboljenja je poremećaj motornih (pokretnih) cilija koji je posledica patogenih genetičkih varijanti u genima koji kodiraju za proteine koji su neophodni za pravilnu strukturu i funkciju ovih organела. Uloga motornih cilija u respiratornom traktu je održavanje prohodnosti disajnih puteva omogućavanjem kretanja mukusa sa inhaliranim bakterijama, virusima i stranim česticama čime se sprečava infekcija gornjih i donjih disajnih puteva. Klinička prezentacija nije specifična, već obuhvata simptome različitih respiratornih oboljenja, što često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze, zbog čega je upotreba dijagnostičkih (biopsija respiratornog epitelja i elektronska mikroskopija, merenje nivoa nazalnog azot oksida (nNO), analiza frekvencije i obrasca kretanja cilija i analiza cilijarnih proteina) i genetičkog profilisanja neophodna za utvrđivanje PCD-a. Primena metoda sekvenciranja nove generacije (eng. *Next-Generation Sequencing*, NGS), kao što su targetovano egzomsko sekvenciranje (eng. *Targeted Exome Sequencing*, TES) i sekvenciranje kompletног egzoma (eng. *Whole Exome Sequencing*, WES) omogućile su poslednjih godina detekciju velikog broja novih gena uzročnika i gena kandidata za PCD. Do danas je opisano 45 gena uzročnika koje su odgovorni za nastanak PCD-a i 200 gena kandidata, a smatra se da je taj broj mnogo veći obzirom da 2500 proteina učestvuje u izgradnji i pravilnom funkcionisanju cilija (10, 12-17). Međutim, identifikacija genetičkih varijanti koje su odgovorne za uočeni fenotip PCD pacijenata je veoma dug i složen proces zbog velike količine genetičkih varijanti dobijenih primenom ovih metoda. Ukoliko su detektovane varijante novootkrivene i o njima ne postoje informacije u bazama podataka, neophodna su dodatna istraživanja koja obuhvataju *in silico* struktturnu i funkcionalnu analizu kao i eksperimentalnu funkcionalnu karakterizaciju genetičkih varijanti (4).

Iz terapijske perspektive ne postoje prospektivna, nasumična klinička ispitivanja praćenja ili lečenja PCD-a. Lekari koji leče PCD prilagođavaju terapijske pristupe koji se koriste za druge hronične respiratorne bolesti, poput cistične fibroze (CF) i bronhiektažija bez CF. Razlike u različitim fenotipskim parametrima između ovih oboljenja sugerisu da ekstrapolirajuće terapije u nekim okolnostima nisu prikladne za lečenje PCD-a (18-20). Stoga su istraživanja terapeutika na model sistemima od ključnog značaja za razvoj adekvatne terapije za PCD pacijente.

2. BIOLOGIJA MOTORNIH CILIJA: STRUKTURA I FUNKCIJA

Naše razumevanje pokretnih cilija i njihove uloge u bolestima izuzetno se povećalo tokom poslednje dve decenije, a ključne informacije i uvidi su proizašli iz analize na model sistemu miša. Pokretne cilije se formiraju na određenim tipovima epitelnih ćelija i obično se kreću na koordinisani način poput biča da bi olakšali protok i čišćenje tečnosti duž ćelijske površine. U novije vreme, primena inovativnih ćelijskih bioloških tehniku na mišjim modelima omogućila je značajan napredak u rasvetljavanju molekularnih i ćelijskih mehanizama u osnovi biogeneze i funkcije pokretnih cilija sisara (21).

Visokokonzervirana cilijarna struktura (aksonema), sastoji se od devet dubleta mikrotubula (tubula A i tubula B) koji okružuju centralni par mikrotubula. Ovakva cilijarna struktura označena je kao 9+2 tip aksoneme (22-24) i poseduju ga motorne cilije kao i kinocilije. Unutrašnje dineinske ručice (eng. *Inner Dynein Arms*, IDAs) i spoljašnje dineinske ručice (eng. *Outer Dynein Arms*, ODAs) sastoje se od dineinskih motornih proteina koji omogućavaju kretanje cilija i re-

guliani su regulatornim kompleksom neksin-dinein (eng. *Nexin-Dynein Regulatory Complex*, N-DRC) i radijalnim strukturama (eng. *Radial Spokes*, RS). Aksonema, čiji poporečni presek iznosi približno 250nm, podeljena je u niz ponavljajućih jedinica od 96 nm, dužinom cilijuma, što je posledica periodične organizacije glavnih aksonemalnih komponenata (21).

Trenutno razumevanje motornih cilija potiče iz studije izvedene na različitim model sistemima, uključujući miševe i druge organizme (25). Najznačajniji među nižim eukariotima je alga *Chlamidomonas reinhardtii*, posebno primenljiv model sistem koji je omogućio detaljnu genetičku, biohemijsku i strukturnu analizu flagela (24, 26). Za razliku od modela nižih kičmenjaka, miš je model sistem sisara čija su anatomija i fiziologija bliži čoveku. Jedini izuzetak je povezanost hidrocefala, koja je češća na mišjim modelima nego kod ljudi, zbog anatomskih razlika u moždanim komorama i dodatnih genetičkih modifikatora koji se izdvajaju u određenim sojevima miševa koji su ukršteni u srodstvu (27). Motorne cilije sisara formiraju se na terminalno diferenciranim tipovima ćelija kao što su epitelne ćelije disajnih puteva, ependimske ćelije diferencirane od radijalne glije i nodalne embrionalne ćelije (28). Pokretne cilije su prostorno orijentisane, a njihova pokretljivost je visoko koordinisana unutar i između ćelija, kako bi se efikasno omogućio mukocilijni klirens i prohodnost (23).

Kao posledica poremećaja u biogenezi i pokretljivosti cilija dolazi do disfunkcije organa ili razvojnih nedostataka, uključujući gubitak prve linije odbrane domaćina, urođenog imuniteta, gubitak funkcije pluća, oštećenje moždanog tkiva i hidrocefalus, kao i poremećaje levo-desne asimetrije tokom embrionalnog razvoja (23, 29).

Razumevanje mehanizama u osnovi formiranja, regulacije i funkcije pokretnih cilija sisara, kao i patogeni proces izazvan aberantnim cilijama, omogućiće razvoj specifičnih terapija za PCD.

3. KLINIČKA PREZENTACIJA PCD-a

Kod većine PCD pacijenata, klinički simptomi predominantno zahvataju čitav respiratorični trakt, reproduktivne organe kao i položaj unutrašnjih organa. Većina simptoma se javlja ubrzo posle rođenja, nakon čega postaju hronični. Najmanje 80% novorođenčadi obolelih od PCD-a razvija neonatalni respiratorični distres (NRD), iako nisu prevremeno rođeni (30). Neonatalni respiratorični distres manifestuje se ubrzanim disanjem (tahipneom), modrilom (cijanozom), uvlačenjem interkostalnih predela, uvlačenjem sternuma, lepršanjem nozdrva i apneom (31). Pored NRDS-a, prisutni su rhinitis, sinuzitis, upala srednjeg uha, kao i česte respiratorične infekcije gornjih i donjih disajnih puteva, koji se nastavljaju kroz detinjstvo i adolescenciju. Bronhiektazije se mogu javiti u detinjstvu, ali je ovaj entitet skoro neizbežan u adolescenciji kao rezultat progresije bolesti. Bronhiektazije predominantno zahvataju donje i srednje lobuse, i predstavljaju abnormalno proširenje bronhija i bronhiola. Kao posledica prisustva bronhiektazija javlja se hroničan kašalj, produkcija sputuma i česta pojava infekcija, što može dovesti do progresivnog gubitka plućne funkcije, koja zahteva transplantaciju pluća ili može imati fatalan ishod.

Kod 50% PCD pacijenata pored *situs solitus* (anatomski normalan položaj unutrašnjih organa) primećena je i inverzija unutrašnjih organa, *situs inversus*, a uočavaju se i druge abnormalnosti položaja visceralnih organa kao što je *situs ambiguous*. Kod većine muškaraca sa PCD-om javlja se sterilitet koji nastaje kao posledica smanjene pokretljivosti spermatozoida usled narušene flagelarne strukture, zabeležen je i veći stepen vanmateričnih trudnoća jer su motorne cilije odgovorne za kretanje jajne ćelije kroz Falopijevu tubu do materice (32).

Klinička prezentacija bolesti nije specifična, već obuhvata simptome različitih respiratoričnih oboljenja, kao što su CF, bronhiektazije bez CF, neonatalni respiratorični distres sindrom, sindromi imunodeficijencije i *Wegener-ova granulomatoza* (8), što često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze. Uspostavljanje precizne dijagnoze PCD-a je u većini slučajeva znatno olakšano ukoliko postoji inverzija viscerálnih organa, *situs inversus*. Međutim, samo 25% pacijenata sa SI ima i Kartagenerov sindrom, a SI može biti asociiran i sa drugim oboljenjima organskih sistema (respiratorični, gastrointestinalni i genitourinarni), kao i sa različitim malformacijama bubrega (displazija, hipoplazija, ekstopija i policistični bubrezi) (33). Stoga je primena dijagnostičkih testova i utvrđivanje genetičkog profila pacijenata suspektnih na PCD ključna za potvrđivanje kliničke dijagnoze ovog oboljenja.

4. PRISTUPI ZA DIJAGNOSTIKOVANJE PCD-a

4.1. Dijagnostički testovi

Biopsija respiratoričnog epitela i elektronska mikroskopija

Biopsija respiratoričnog epitela i upotreba elektorske mikroskopije (EM) za ultrastrukturni pregled cilijarnih aksonema je dokazana tehnika za uspostavljanje PCD dijagnoze (16) i preporučuje se kao deo panela dijagnostičkih testova za PCD. Kada se korišćenjem EM detektuju promene na spoljašnjim dineinskim ručicama (ODA) (34), spoljašnjim i unutrašnjim diineinskim ručicama (ODA i IDA) (35), unutrašnjim dineinskim ručicama sa neorganizovanim mikro-

tubulama (36), radijalnih struktura (37) ili centralnog aparata (38) potvrđuje se dijagnoza PCD-a. Međutim, EM studije sa normalnom cilijarnom ultrastrukturom ne isključuju PCD, jer određene patogene genetičke varijante PCD gena mogu rezultovati normalnom ultrastrukturom (39, 40), ili suptilnim abnormalnostima (posebno onima koje uključuju centralni aparat i radijalne strukture) koje ne mogu lako da se prepozna pomoću EM (41). Pored toga, ponovljene biopsije kojima se ne detektuju respiratorne cilije mogu predstavljati oligocilijarni defekt koji uzrokuje PCD (42).

Za dijagnostičku studiju koja podrazumeva upotrebu EM potrebno je najmanje 20-50 jasnih poprečnih preseka cilia, a dijagnostičke abnormalnosti se moraju konzistentno uočavati na poprečnim presecima više različitih cilia kako bi se ove promene smatrali uzročnicima bolesti. Dalje, od suštinske je važnosti da se biopsije sakupljaju kada su pacijenti zdravi, jer se sekundarne promene u ultrastrukturi cilia mogu desiti tokom pogoršanja stanja njihovih respiratornih organa, zbog čega biopsiju treba ponoviti najmanje 2 nedelje nakon potpunog oporavka od bolesti (43).

Ukoliko se detektuje nedostatak unutrašnjih dineinskih ručica (izolovan, bez drugih promena na aksonemama), uvek su potrebne ponovljene biopsije i EM studije kako bi se potvrdilo da li ova patološka promena traje i stoga je verovatnije genetička (primarna), i nije nastala iz sekundarnih uzroka (17), čime se potvrđuje dijagnoza analiziranog pacijenta. Takođe se mogu razmotriti ponovljene biopsije da bi se potvrdila univerzalnost i trajnost nalaza koji ukazuju na promene centralnog aparata, radijalnih struktura ili unutrašnjih dineinskih ručica sa dezorganizacijom mikrotubula.

Kada se isocene svi neophodni uslovi za upotrebu EM, procenjeno je da se na ovaj način može razjasniti oko 70 % svih PCD pacijenata (3).

Merenje nazalnog azot oksida

Vrednosti azotnog oksida (eng. *Nasal Nitric Oxide*, nNO) u nosu su izuzetno niske kod PCD pacijenata (44). Korišćenjem granične vrednosti nNO < 77 nl/min, detektor će otkriti PCD, koji je rezultat cilijarnih aksonemalnih defekata ili patogenih genetičkih varijanti u genu *DNAH11*, sa osetljivošću i specifičnošću od 98% i > 99%, pod uslovom da je CF isključena kao finalna dijagnoza (45). Vrednosti znatno iznad ovog graničnog nivoa smanjuju verovatnoću PCD-a. Međutim, kliničari i dalje moraju razmotriti PCD kao finalnu dijagnozu kada se suoče sa odgovarajućim kliničkim fenotipom za PCD i vrednostima nNO iznad 77 nl/min, iako su retko prijavljeni oblici PCD sa vrednostima nNO iznad ove granične vrednosti (46). Veoma niski nivoi nNO (ispod 77 nl/min) mogu se javiti tokom akutnih virusnih respiratornih infekcija i kod približno 30% pacijenata sa CF. Stoga se ispitivanje nNO mora izvršiti kada se pacijent potpuno oporavi od virusne infekcije i nakon dijagnostičkog ispitivanja radi isključivanja CF (47). Stanja kao što su HIV (48), pan-bronhiolitis (49) i ne-atopični sinusitis (50) takođe mogu dovesti do nivoa nNO ispod graničnih vrednosti, pa je neopodno primeniti druge dijagnostičke testove kako bi se utvrdila precizna dijagnoza ovih pacijenata.

Merenje nNO se preporučuje kao deo panela dijagnostičkih testova za PCD kod odraslih i dece starije od 5 godina (45). Vrednosti NO u nosu pouzdanije su kod dece školskog uzrasta i odraslih, jer ovi pacijenti mogu da isocene zahtev lekara (pravilno duvanje u otpornik). Trenutno se istražuju tehnike za merenje nNO kod dece mlađe od 5 godina (51), ali granične vrednosti koje bi imale dijagnostički značaj za PCD nisu utvrđene (52).

Analiza frekvencije i obrasca kretanja cilia

Analiza frekvencije obrasca kretanja cilia upotrebom brze video mikroskopije (eng. *High Speed Videomicroscopy analysis*, HSVA) na cilijarnim biopsijama može potvrditi dijagnozu PCD-a, a ovaj test se preporučuje i kao deo panela PCD dijagnostičkih testova (53). Funkcionalna cilijarna analiza se mora izvesti veoma precizno, kako bi se izbegli lažno pozitivni i lažno negativni rezultati. Biopsije treba izvoditi samo kada su pacijenti zdravi. Ponovljene biopsije su potrebne da bi se osiguralo da abnormalni obrasci kretanja nisu posledica sekundarnih procesa, poput virusnih infekcija (54), izloženosti duvanu ili okolini, lošeg uzorkovanja biopsije ili nepravilne obrade biopsije (55). U studiji Roberta Hirst-a i saradnika, potvrđeno je i da kultivacija bioptiranih epitelnih ćelija u ALI sistemu (eng. *Air-Liquide interface*, ALI) dobijenih *nasal-brushing* tehnikom uklanja sekundarne promene na cilijama koje nisu posledica oboljenja i omogućava veću preciznost dobijenih rezultata (43).

Analiza cilijarnih proteina

Imunofluorescentna (IF) analiza cilijarnih proteina upotrebom fluorescentno obeleženih antitela omogućava detekciju proteina dineinskih ručica koji nedostaju duž cilijarne aksoneme. IF analiza je od velikog značaja u potvrđivanju PCD-a i deo je panela dijagnostičkih testova za utvrđivanje PCD-a (56). Bojenjem specifičnih cilijarnih proteina (*DNAH5*, *DNAI2*, *DNALI1* i *RSPH4A / RSPH1 / RSPH9*), koji su od suštinske važnosti za celokupnu strukturu dineinskih ručica i radijalnih struktura, IF može otkriti mnogobrojne alteracije spoljašnjih i unutrašnjih dineinskih ručica i radijalnih struktura čak i kada su u pitanju deficijencije drugih cilijarnih proteina primarni uzrok PCD-a. Heike Olbrich i saradnici su potvrdili da na rezultate IF ne utiče sekundarna cilijarna diskinezija što je prednost u odnosu na HSVA, zbog čega ova metoda ima veliki potencijal kao dijagnostički test za PCD (57).

Genetički testovi i strategije za selekciju genetičkih varijanti

Genomskim profilisanjem PCD pacijenata utvrđeno je da se približno 65-70 % genetičkih varijanti nasleđuje na autozomno recesivnog način (varijante u homozigotnom stanju, udružene heterozigotne varijante, trans alelske genetičke varijante), i da je najveći broj (75%) detektovanih varijanti u PCD genima izolovano, tj prisutno u jednoj porodici (58, 59). Genetičke varijante koje prouzrokuju PCD najčešće (80%) dovode do gubitka funkcije proteina (menjaju okvir čitanja, uvode preveremeni stop kodon, ukidaju stop kodon, menjaju mesto splajsovanja) (58), dok je manji broj varijanti koji dovode do aminokiselinske zamene u polipeptidnom lancu proteina. Prema podacima iz literature, geni u kojima se najčešće detektuju patogene genetičke varijante su *DNAH5*, *DNAH11*, *DNAI1*, *CCDC39* i *CCDC40* (58) i oni su uzročnici bolesti kod 26% analiziranih PCD pacijenata. U populaciji Srbije, patogene genetičke varijante u ovim genima odgovorne su za nastanak PCD-a kod približno 30% pacijenata (59). Grupisanje genetičkih varijanti u specifičnim genskim regionima, kao što je to u slučaju sa drugim genetičkim oboljenjima, je veoma retko. Iz tog razloga, kako je teško odrediti koje genetičke varijante su stvarno uzročnici bolesti, a koje predstavljaju retke polimorfizme (52).

Pored autozomno recesivnog nasleđivanja, genetičke varijante u genima *OFD1* i *RPGR*, koji se nalaze na hromozomu X, prouzrokuju PCD udruženu sa drugim poremećajima. *Retinitis Pigmentosa* (slepilo zbog retinalne cilijarne disfunkcije) kao i orofacioidalni sindrom (mentalna retardacija, kraniofacijalne abnormalnosti, abnormalnosti prstiju, makrocefalija i cistični bubrezi) su oboljenja povezana sa hromozomom X koja obuhvataju cilijarne gene, *RPGR* i *OFD1*, redom (5, 60). Kod pacijenata sa patogenim genetičkim varijantama u ovim genima neophodna je detaljna analiza kliničke prezentacije bolesti jer se radi o udruženim oboljenjima nastalim kao posledica defekata u cilijarnim genima, kako bi se primenila što adekvatnija terapija.

Najnovija istraživanja Adama Shapiro-a i saradnika, pokazala su da autozomno dominantne varijante u genu *FOXJ1* prouzrokuju PCD koji je udružen sa drugim genetičkim oboljenjima. Pojedinačne patogene genetičke varijante u genu *FOXJ1* nastaju *de novo* i asocijirane su sa hidrocefalusom i hroničnim oto-sino-pulmonarnim oboljenjima, pa je detaljna klinička i genetička analiza ovih pacijenata neophodna zbog moguće asocijirane ovih oboljenja sa PCD-om (7).

Genetičko testiranje pacijenata suspektnih na PCD preporučuje se kao deo panela dijagnostičkih PCD testova. Trenutno je poznato 45 gena uzročnika PCD-a (OMIM #244400) (Tabela 1.), a broj gena uzročnika i gena kandidata za nastanak ovog poremećaja rapidno raste sa upotreboom tehnika sekvensiranja nove generacije (TES, WES) obzirom na kompleksnost cilijarne aksoneme (4, 59).

Nakon genomskog profilisanja suspektnih PCD pacijenata količina detektovanih varijanti nekada prelazi 10.000 po jednom pacijentu pa je neophodno izvršiti prioritizaciju gena od interesa za PCD. U ove gene ubrajaju se svi pozitivni geni kandidati i geni uzročnici za PCD, geni koji pripadaju istoj familiji gena kojoj pripadaju geni uzročnici i geni čiji proteini interaguju sa proteinima neophodnim za pravilnu strukturu i funkciju cilija (59). Nakon formiranja jedinstvene liste gena za PCD, broj detektovanih varijanti unutar ovih gena iznosi i preko 100. Stoga se vrši selekcija genetičkih varijanti na sledeći način:

Prema posledicama varijanti na protein: vrše aminokiselinsku zamenu u polipeptidnom lancu, menjaju okvir čitanja aminokiselinske sekvene, uvode prevremen stop kodon, dovode do ukidanja stop kodona, insercije i delekcije koje menjaju okvir čitanja, insercije i delekcije koje ne menjaju okvir čitanja, varijante koje utiču na mesto iskrajanja;

Prema učestalosti varijanti: varijante koje imaju učestalost < 5% (prema podacima iz baza podataka: 1000 Genoma i ExaC);

Prema patogenosti: patogene, potencijalno patogene i varijante nepoznatog značaja (eng. *Variant of Uncertain Significance*, VUS).

Ukoliko se detektuju potencijalno patogene genetičke varijante u uzorcima pacijenata suspektnih na PCD, pristupa se njihovoj validaciji, odnosno utvrđivanju njihove patogenosti upotrebom *in silico* i ili eksperimentalnih metoda.

Za identifikaciju mutacionog profila pacijenata kod kojih nisu detektovane varijante u genima relevantnim za PCD, a klinička prezentacija bolesti ukazuje na ovo oboljenje, pristupa se detaljnjoj pretrazi literature i listi gena (Tabela 1.) dodaju se geni odgovorni za pojedinačne simptome bolesti. Ova proširena lista gena omogućava diferencijalnu dijagnozu pacijenata koji boluju od drugih plućnih pedijatrijskih bolesti, a sa PCD-om dele zajedničku kliničku sliku (61). Za sledeće simptome bolesti: bronhiekstazije bez CF, hroničan kašalj, prekomerna produkcija mukusa, respiratorni distres kod novorođenčadi i metabolizam surfaktanta kod plućnih oboljenja, analiziraju se sledeći geni: *ABCA3*, *ABCA1*, *ABCB1*, *ABCC3*, *ABCA10*, *ABCB11*, *ABCC4*, *ABCA12*, *ABCB4*, *ABCC6*, *ABCA13*, *ABCB6*, *ABCC8*, *ABCA2*, *ABCB7*, *ABCC9*, *ABCC1*, *ABCD1*, *ABCA4*, *ABCC11*, *ABCD4*, *ABCA7*, *ABCC2*, *ABCG1*, *ABCG2*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CFTR*, *MUC1*, *MUC13*, *MUC2*, *MUC3A*, *MUC4*, *MUC5B*, *MUC6*, *MUC7*, *SFTPA1*, *SFTPA2*, *SFTPB*, *SFTPC*, *SFTPD*, *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1Gi*, *SLC26A9*.

Zatim se analiziraju geni asocijirani sa senzornim ciliopatijama: *BBS1*, *BBS2*, *BBS3*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS6*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS9*, *BBIP10*, *KIF3A*, *KIF3B*, *KAP*, *IFTA*, *IFTB*, *IFT43*, *IFT80*, *IFT122* i *TTC21B*.

U populaciji Srbije, proširena lista gena omogućila je uspostavljanje dijagnoze kod još 30% analiziranih pacijenata (61).

Gen	Lokus	Način nasleđivanja	Lokalizacija/funkcija proteina	Ultrastruktурне promene
DNAH5	Hromozom 5	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
DNAI1	Hromozom 9	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
DNAI2	Hromozom 17	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
DNAL1	Hromozom 14	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
NME8	Hromozom 7	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
DNAH8	Hromozom 6	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
DNAH11	Hromozom 7	AR	ODA	Normalna struktura
TTC25	Hromozom 17	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
CCDC114	Hromozom 19	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
ARMC4	Hromozom 10	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
CCDC151	Hromozom 19	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
CCDC103	Hromozom 17	AR	Protein za asempliranje dineinskih ručica	ODA nedostaje
DNAH1	Hromozom 3	AR	IDA	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
LRRC6	Hromozom 8	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
DNAAF1	Hromozom 16	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
DNAAF2	Hromozom 14	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
DNAAF3	Hromozom 19	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
DNAAF4	Hromozom 15	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
DNAAF5	Hromozom 7	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
SPAG1	Hromozom 8	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
ZMYND10	Hromozom 3	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
CFAP298	Hromozom 21	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
CFAP300	Hromozom 11	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
PIH1D3/DNAAF6	Hromozom X	XLR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema

HYDIN	Hromozom 16	AR	Centralni par	Normalna struktura
STK36	Hromozom 2	AR	Centralni par	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH4A	Hromozom 6	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH9	Hromozom 6	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH1	Hromozom 21	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH3	Hromozom 6	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
DNAJB13	Hromozom 11	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
CCDC65	Hromozom 12	AR	Proteini neksina	Normalna struktura
DRC1	Hromozom 2	AR	Proteini neksina	Normalna struktura
GAS8	Hromozom 16	AR	Proteini neksina	Normalna struktura
CCDC39	Hromozom 3	AR	Neksin-dinein regulatorni kompleks	IDA nedostaje i narušena mikrotubularna organizacija
CCDC40	Hromozom 17	AR	Neksin-dinein regulatorni kompleks	IDA nedostaje i narušena mikrotubularna organizacija
CCNO	Hromozom 5	AR	Amplifikacija i sazrevanje cilija	Smanjenje cilija
MCIDAS	Hromozom 5	AR	Jedarni transkripcioni ko-regulator	Smanjen broj cilija
RPGR	Hromozom X	XLR	Tranzitna zona	Normalna struktura
OFD1	Hromozom X	XLR	Centriola	Normalna struktura
DNAH9	Hromozom 17	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
GAS2L2	Hromozom 17	AR	Citoplazma	Normalna struktura
LRRC56	Hromozom 11	AR	Interflagelarni transport	Normalna struktura
SPAG16	Hromozom 2	AR	Uloga u ciliogenezi	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
SPAG17	Hromozom 1	AR	Pravilna funkcija aksoneme	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
TTC12	Hromozom 11	AR	Protein za asempliranje dineinskih ručica	ODA nedostaje
FOXJ1	Hromozom 17	AD	Axonemalna biogeneza	
NEK10	Hromozom 3	AR	Mukoclijarni transport	
CFAP221	Hromozom 2	AR	Regulacija cilijarne i flageralne pokretljivosti	

Tabela 1. Spisak gena uzročnika i gena kandidata asociраних са nastankом PCD-a
AR – аутохромично рецесивно, AD – аутохромично доминантно, ODA – спољашње динеинске руčице, IDA – унутрашње динеинске руčице

5. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA GENETIČKIH VARIJANTI

5.1. *In silico* strukturalna i/ili funkcionalna analiza

Ukoliko se DNK i iRNK sekvenca gena od interesa modifikuje zbog prisustva genetičke varijante, biološka funkcija translatiranog proteina se menja, jer biološka funkcija proteina zavisi od njegove nativne trodimenzionalne strukture (3D). Tehnike određivanja 3D strukture, kao što su XRD (eng. *X-ray diffraction*, XRD) ili NMR (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) (62), su veoma skupe i stoga ograničene. Takođe, postoje tehničke prepreke, jer se svaki protein ponaša drugačije ili ne može da zadrži svoje nativno stanje nakon procesa kristalizacije (63). Stoga je dostupnost različitih *online* i *offline* alata za 3D modelovanje proteina presudna za predviđanje strukture proteina. Korišćenje alata kao što su Raptor X (64), Phire2 (65) i Chimera (66) omogućavaju prediktivne trodimenzionalne modele odabranih proteina i pružaju informacije o tome kako genetička varijanta utiče na savijanje proteina u prostoru.

In silico predikcija patogenosti uključuje predviđanje uticaja otkrivenih varijanti na transkripcionom, translacionom i posttranslacionom nivou. Ukoliko detektovana varijanta promeni otvoreni okvir čitanja (eng. *Open Reading Frame*, ORF) sekvence, za otkrivanje svih mogućih ORF-ova softver Translate Tool je jedan od načina detekcije (67). Dalje, interakcije protein-protein (PPI), kao i posttranslace modifikacije (PTM), igraju centralnu ulogu u regulaciji velikog broja ćelijskih procesa signalizacije, a promena interakcija i PTM mogu dovesti do različitih oboljenja kod ljudi (68). Alati za predviđanje PPI, kao što su STRING (69) i COACH (70), pružaju neophodne informacije o kvaternarnoj strukturi proteina od interesa. Da bi se utvrdilo da li genetička varijanta menja posttranslace modifikacije (PTM) proteina, program PhosphoSitePlus je *in silico* metoda od izbora (71). Ako je region proteina na koji utiče detektovana genetička varijanta visoko evoluciono očuvan, postoji indikacija da je region važan za održavanje strukture i/ili funkcije proteina. Korišćenje softvera Aminode (72) i poravnavanje sekvene proteina među različitim vrstama pružaju dragocene informacije.

5.2. Eksperimentalna funkcionalna analiza detektovanih genetičkih varijanti

Da bi se utvrdio potencijalni efekat varijante koja je označena kao patogena ili varijanta sa nepoznatim značajem i kako bi se gen kandidat uvrstio u listu gena uzročnika za PCD, pored *in silico* analize, eksperimentalna, empirijska analiza, omogućava definitivnu potvrdu uloge detektovane genetičke varijante i gena kandidata na uočen fenotip kod PCD pacijenata.

Genetička varijanta svoje efekte ispoljava na transkripcionom i translacionom nivou što kao rezultat ima gubitak sinteze proteina od interesa, apsolutni i/ili delimični gubitak biološke funkcije koju ostvaruje u interakciji sa drugim proteinima (kvaternarna struktura proteina) ili sintezi okrnjenog proteina.

Mnogobrojne metode su opisane u literaturi za determinaciju patogenosti genetičkih varijanti gena uzročnika za PCD (59, 73). Za analizu uticaja detektovane genetičke varijante na transkripcionom nivou koristi se RT-qPCR metoda (59). Za analizu uticaja efekta varijante na proteinskom nivou koriste se: Western Blot metoda (59) i sekvenciranje aminokiselinske sekvene proteina od interesa (74). Dve najčešće korišćene metode za sekvenciranje proteina su masena spektrometrija i Edmanova degradacija korišćenjem proteinskog sekvencera. Metode masene spektrometrije su sada najčešće korišćene za sekvenciranje i identifikaciju proteina, ali Edmanova degradacija ostaje zlatni standard za karakterizaciju N-terminusa proteina (74).

Tehnologija CRISPR/Cas9 i editovanje gena od interesa na ćelijskom nivou (*in vitro*) i u živom model sistemu (*in vivo/ex vivo*) (21, 75) se koristi kako bi se uspostavila korelacija između genetičkih varijanti i uočenih fenotipova kod PCD pacijenata (76).

6. MODEL SISTEMI I NAČINI LEČENJA PCD-a

6.1. Miš kao model sistem za izučavanje PCD-a i multicilijarnih ćelija

Brojni model sistemi, u rasponu od jednoćelijskih eukariota do sisara, pružili su informacije o genetici, biohemiji i strukturi motornih cilija koje se nalaze u osnovi patogeneze PCD-a. Međutim, zbog izvanrednih resursa koji su na raspolaganju za genetičke manipulacije i razvojnu, patološku i fiziološku analizu fenotipa, miš je izbio u prvi plan razumevanja pokretnih cilija sisara i postao najadekvatniji model sistem za analizu PCD-a (21), o čemu svedoči i veliki broj relevantnih linija miševa.

Tokom poslednje dve decenije, modeli miša pružili su ogromnu količinu informacija o genima, genetičkim mehanizmima i obrascima nasleđivanja koji se nalaze u osnovi PCD-a kao i funkcije motornih cilija. Kao i kod ljudskih PCD pacijenata, modeli miša pokazuju genetičku i fenotipsku heterogenost, a većina pokazuje kombinaciju različitih fenotipova povezanih sa PCD-om, uključujući nakupljanje sluzi u sinusnoj šupljini, otitis media, neplodnost mužjaka i ženki, hidrocefalus i heterotaksiju ili urođenu srčanu manu. Različite genetičke modifikacije miševa omogućile su unapređenje ovog polja istraživanja, što je omogućilo detaljnu histopatološku analizu fenotipa i sveobuhvatnu procenu strukture i funkcije cilja u više tipova ćelija. Ovi modeli su takođe verifikovali gene uzročnike PCD-a identifikovane kod

Ijudskih pacijenata, identifikovali nove gene potrebne za funkciju pokretnih cilija i otkrili efekte velikog broja alela na patogenezu bolesti, multiciliranu diferencijaciju ćelija i strukturu i funkciju cilija.

Pored spektra mišjih modela sa genetičkim varijantama koje rezultuju disfunkcijom cilija i PCD-om, stvoren je nekoliko linija miša koji služe kao moćni alati za obeležavanje, identifikovanje ili manipulaciju cilijarnim ćelijama. Rekombinacija uslovnog alela u motornim cilijarnim ćelijama omogućena je Fokj1-Cre linijom miša i linijom Fokj1-CreERT2 indukovanim tamoksifenom (77, 78). Ovakve linije miševa omogućavaju GFP (eng. *Green Fluorescent Protein*, GFP) obeležavanje svih pokretnih cilijarnih ćelija (79). Pored omogućavanja proučavanja genetičkih *knockout*-a, ove linije miševa su vrlo efikasne prilikom analiziranja ćelijske loze koji prate diferencijaciju cilijarnih ćelija u disajnim putevima i razvoj nervnog sistema (80, 81). Pored toga, transgena linija CiliaGFP omogućava obeležavanje motornih i primarnih cilijarnih ćelija (82). Ovi novi genetički alati se mogu primeniti na modelima PCD-a za procenu patogeneze bolesti ili koristiti za biološku i biohemiju analizu cilijarnih ćelija.

Primarna kultura poreklom iz miša kao model sistem

Primarna kultura cilijarnog epitela, posebno mTEC (eng. *Mouse Tracheal Epithelial Cells*, mTEC), u ALI sistemu, postala je osnovni sistem za analizu motornih cilija sisara (83).

Primarna kultura može biti poreklom od *wild-type* ili mutiranog miša, a genetičke manipulacije na ovim ćelijskim linijama vrše se lentivirusnom transdukcijom čime se omogućava generisanje *knockdown* primarne kulture sa prekomernom egzogenom ekspresijom, pomoću RNK sa strukturom ukosnice, shRNK (eng. *Short Hairpin RNA*, shRNA) ili kratkih interferirajućih siRNK (eng. *Small Interfering RNA*, siRNA) (84-86). Ovako generisane ćelijske linije poreklom iz miševa koriste se za analizu ćelijskih i biohemski procesa, a ekspresija egzogenih proteina omogućava i studije interakcije protein-protein u mTEC ćelijskoj liniji (87). Utisavanje gena transkripcionog faktora Gemc1 ili Mcidas u kulтивisanim radijalnim glijalnim ćelijama sprečilo je diferencijaciju u kolumnarni cilijarni epitel i ekspresiju Foxj1 (88), potvrđujući njihovu ulogu u pokretanju multicilirane diferencijacije ćelija.

Mišji modeli PCD-a kao i ćelijske linije generisane metodama genetičkog inženjerstva mogu poslužiti kao adekvatan model sistem za testiranje terapeutika za lečenje PCD-a i poboljšanje ciljarne funkcije.

7. TERAPIJA PCD-a

Terapijski protokoli kojima se leče PCD pacijenti nisu specifični za ovo oboljenje, već se terapijski pristupi ekstrapoliraju iz drugih plućnih oboljenja sa sličnom kliničkom prezentacijom bolesti. Najčešće se koristi terapija za CF, uprkos očiglednim razlikama u patofiziologiji ova dva poremećaja (89).

Osnovni postupci lečenja PCD-a uključuju čišćenje disajnih puteva, kontrolu i prevenciju infekcije i, ukoliko je moguće, sporevanje izlaganju inflamatornim agensima, uključujući i pasivno udisanje duvanskog dima.

Različite tehnike kao što su ručna fizioterapija grudnog koša, posturalna drenaža, autogena drenaža, aktivno ciklično disanje i fizička aktivnost, omogućavaju klirens disajnih puteva (90).

Korišćenje inhalatora je uobičajena procedura za tretiranje PCD pacijenata koja pomaže vlaženju i razređivanju viskoznog sekreta disajnih puteva, čime se olakšava proces mukocilijarnog klirensa (91). Inhalacioni fiziološki rastvor koristi se u lečenju bronhiekstazija za poboljšanje mukocilijarnog klirensa (92), međutim nedavna studija je pokazala da inhalacija fiziolskog rastvora PCD pacijentima nije poboljšala kvalitet života niti značajno uticala na spirometriju ili smanjenje upale disajnih puteva (93).

Tokom infekcija, DNK i aktin koji se oslobođaju akumulacijom neutrofila povećavaju viskoznost sputuma u disajnim putevima. Udisanjem rekombinantne humane DNaza I (rhDNase) poboljšavaju se rezultati spirometrije, pa se rhDNase vrlo često preporučuju u tretmanu CF (94). Neutrofilno zapaljenje disajnih puteva zabeleženo je i kod PCD pacijenata. Do sada je nekoliko PCD studija pokazalo značajno poboljšanje kliničkih parametara nakon tretmana inhalacionom DNazom (95, 96). Trenutno se rhDNase ne preporučuju rutinski u lečenju PCD-a, stoga su neophodne dodatne studije kako bi se potvrdila njegova efikasnost u smanjenju neutrofilnog zapaljenja kod PCD pacijenata.

Studije na pacijentima sa CF-om i bronhiekstazijama bez CF, uključujući i neke pacijente sa PCD-om, pokazale su da su sistemski antibiotici efikasni u lečenju „pogoršanja“ stanja plućnih bolesti (97, 98). Simptomi respiratornog trakta koji uključuju promene u kašlu, stvaranje sputuma, promene u brzini disanja, ili su spiromerijski testovi loši (opada ekspiratori volumen u 1s, eng. *expiratory volume in 1s*, FEV1), mogu se smatrati pouzdanim markerima pogoršanja stanja respiratornog trakta kod PCD pacijenata. Iako se blaga pogoršanja mogu lečiti oralnim antibiotikom i povećanim agresivnim klirensom disajnih puteva, teška pogoršanja mogu zahtevati intravenske antibiotike i hospitalizaciju. Izbor antibiotika treba izvršiti na osnovu najnovijih rezultata kulture sputuma i uzimati u obzir istoriju kolonizacije disajnih puteva svakog pojedinačnog pacijenta.

Hirurška intervencija (segmentektomija ili lobektomija) može se sa oprezom razmatrati u slučaju difuzne plućne bolesti i može se uzeti u obzir samo kada neproporcionalno opterećeni region pluća nije uspeo da se oporavi nakon

lečenja i postoji značajno pogoršanje pacijentovog zdravlja zbog teške hemoptize. Ako se razvije bolest pluća u završnoj fazi, transplantacija pluća može biti opcija kod PCD pacijenata (99, 100).

Otkrivanje i primena terapije za PCD koja je specifična za ovo oboljenje, odnosno specifična za uočenu genotip-fenotip korelaciju pojedinačnih pacijenata biće omogućena sa sve većim znanjem i razumevanjem ove korelacije kod PCD pacijenata. Veliko očekivanje potiče iz nedavne studije Michele Lai i saradnika koji je prvi primenio tehnologiju „editovanje gena“ za ovu bolest. U ovoj studiji, obnovljena je funkcija gena *DNAH11 ex vivo*, zamenjujući patogenu genetičku varijantu nativnom, neizmenjenom sekvencom u oboleloj ćeliji. Na epitelnoj ćelijskoj liniji dizajniranoj da sadrži ciljno mesto za *DNAH11*, restriktivni enzim je isekao preko 80% mutirane sekvence *DNAH11* i zamenio mutiranu sekvencu originalnom sekvencom u oko 50% ćelija. U cilijskim ćelijama disajnih puteva pacijenata sa PCD-om, rekombinacija i normalizacija cilijskog kretanja i obrazca dogodili su se u 33%, odnosno u 29% ćelija. Rezultat editovanja gena je povratak normalne funkcije cilia (101).

Ova studija pokazuje da editovanje gena može omogućiti ponovnu cilijsku funkciju *ex vivo*, otvarajući nove perspektive za lečenje PCD-a.

8. ZAKLJUČAK

Iako je PCD genetički i klinički vrlo heterogeno oboljenje, pored kliničke prezenacije bolesti koja ukazuje na PCD, upotrebo dijagnostičkih testova i genomske profilisanje suspektnih pacijenata, može se dostići visoka stopa uspostavljanja precizne dijagnoze bolesti na vreme (~70%). Da bi stopa uspostavljanja dijagnoze dostigla svoj maksimum, neophodne su dodatne funkcionalne analize na ćelijskim linijama i model sistemima za PCD.

Napredak u genetičkoj manipulaciji i fenotipskoj analizi PCD-a na modelu miša, zajedno sa primenom inovativnih molekularno bioloških tehnika, doveli su do značajnog napretka u razumevanju pokretnih cilia sisara i patogeneze PCD-a. Širok spektar genetičkih mišljih modela potvrdio je značajnost mnogih cilijskih gena i otkrio nove uloge za brojne gene, čime je klinički fenotip PCD pacijenata razjašnjen. Miš, kao model sistem takođe služi za identifikovanje, razvoj i ispitivanje efikasnosti potencijalnih terapeutika za PCD.

ZAHVALNICA.

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

1. Sader E, Dahan E, Al A. [Triad of Kartagener (situs inversus, bronchiectasis and sinusitis); lobectomy]. Le Journal medical libanais The Lebanese medical journal. 1951;4(3):170-7.
2. Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. Science (New York, NY). 1976;193(4250):317-9.
3. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2013;188(8):913-22.
4. Boaretto F, Snijders D, Salvoro C, Spalletta A, Mostacciulo ML, Collura M, et al. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia by a Targeted Next-Generation Sequencing Panel: Molecular and Clinical Findings in Italian Patients. The Journal of molecular diagnostics : JMD. 2016;18(6):912-22.
5. Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, et al. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. Journal of medical genetics. 2006;43(4):326-33.
6. Paff T, Loges NT, Aprea I, Wu K, Bakey Z, Haarman EG, et al. Mutations in PIH1D3 Cause X-Linked Primary Ciliary Dyskinesia with Outer and Inner Dynein Arm Defects. American journal of human genetics. 2017;100(1):160-8.
7. Shapiro AJ, Kaspy K, Daniels MLA, Stonebraker JR, Nguyen VH, Joyal L, et al. Autosomal dominant variants in FOXJ1 causing primary ciliary dyskinesia in two patients with obstructive hydrocephalus. Molecular genetics & genomic medicine. 2021:e1726.
8. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli MP, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. The European respiratory journal. 2010;36(6):1248-58.
9. Lucas JS, et al., . Orphan Lung Diseases, in Primary ciliary dyskinesia. 2011:201-17.
10. O'Callaghan C, Chetcuti P, Moya E. High prevalence of primary ciliary dyskinesia in a British Asian population. Archives of disease in childhood. 2010;95(1):51-2.
11. Sommer JU, Schäfer K, Omran H, Olbrich H, Wallmeier J, Blum A, et al. ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic co-morbidities. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery. 2011;268(3):383-8.
12. Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, Minnix SL, Carson JL, Hazucha M, et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. American journal of respiratory and critical care medicine. 2004;169(4):459-67.
13. Halbert SA, Patton DL, Zarutskie PW, Soules MR. Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. Human reproduction (Oxford, England). 1997;12(1):55-8.

14. Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, Davis SD, Dell SD, Ferkol TW, et al. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax*. 2012;67(5):433-41.
15. Morillas HN, Zariwala M, Knowles MR. Genetic causes of bronchiectasis: primary ciliary dyskinesia. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2007;74(3):252-63.
16. Olin JT, Burns K, Carson JL, Metjian H, Atkinson JJ, Davis SD, et al. Diagnostic yield of nasal scrape biopsies in primary ciliary dyskinesia: a multicenter experience. *Pediatric pulmonology*. 2011;46(5):483-8.
17. O'Callaghan C, Rutman A, Williams GM, Hirst RA. Inner dynein arm defects causing primary ciliary dyskinesia: repeat testing required. *The European respiratory journal*. 2011;38(3):603-7.
18. Lucas JS, Carroll M. Primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis: different diseases require different treatment. *Chest*. 2014;145(4):674-6.
19. Cohen-Cymberknob M, Simanovsky N, Hiller N, Hillel AG, Shoseyov D, Kerem E. Differences in disease expression between primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis with and without pancreatic insufficiency. *Chest*. 2014;145(4):738-44.
20. Paff T, van der Schee MP, Daniels JM, Pals G, Postmus PE, Sterk PJ, et al. Exhaled molecular profiles in the assessment of cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2013;12(5):454-60.
21. Lee L, Ostrowski LE. Motile cilia genetics and cell biology: big results from little mice. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2021;78(3):769-97.
22. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology*. 2007;69:377-400.
23. Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(4).
24. Ishikawa T. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(1).
25. Poprzeczko M, Bicka M, Farahat H, Bazan R, Osinka A, Fabczak H, et al. Rare Human Diseases: Model Organisms in Deciphering the Molecular Basis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Cells*. 2019;8(12).
26. Loreng TD, Smith EF. The Central Apparatus of Cilia and Eukaryotic Flagella. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(2).
27. Lee L. Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *Journal of neuroscience research*. 2013;91(9):1117-32.
28. Boutin C, Kodjabachian L. Biology of multiciliated cells. *Current opinion in genetics & development*. 2019;56:1-7.
29. Brown JM, Witman GB. Cilia and Diseases. *Bioscience*. 2014;64(12):1126-37.
30. Mullowney T, Manson D, Kim R, Stephens D, Shah V, Dell S. Primary ciliary dyskinesia and neonatal respiratory distress. *Pediatrics*. 2014;134(6):1160-6.
31. Hermansen CL, Lorah KN. Respiratory distress in the newborn. *American family physician*. 2007;76(7):987-94.
32. Bylander A, Lind K, Goksör M, Billig H, Larsson DG. The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2013;11:33.
33. Nardella G CM, Verrotti di Pianella V, Lanzano A, Soldano L, Gorgoglionese S, Calabrese C, Di Gianni AM, Lozupone S, Maffei G, Popolo G, Villani G, Pettoello-Mantovani M, Magaldi R. Situs inversus viscerum and renal agenesis in a newborn. 2017.
34. de Jongh RU, Rutland J. Ciliary defects in healthy subjects, bronchiectasis, and primary ciliary dyskinesia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(5):1559-67.
35. Escudier E, Couprise M, Duriez B, Roudot-Thoraval F, Millepied MC, Prulière-Escabasse V, et al. Computer-assisted analysis helps detect inner dynein arm abnormalities. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(9):1257-62.
36. Antony D, Becker-Heck A, Zariwala MA, Schmidts M, Onoufriadiis A, Forouhan M, et al. Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms. *Human mutation*. 2013;34(3):462-72.
37. Castleman VH, Romio L, Chodhari R, Hirst RA, de Castro SC, Parker KA, et al. Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *American journal of human genetics*. 2009;84(2):197-209.
38. Jeanson L, Copin B, Papon JF, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Montantin G, et al. RSPH3 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex Defects and a Near Absence of Radial Spokes. *American journal of human genetics*. 2015;97(1):153-62.
39. Horani A, Brody SL, Ferkol TW, Shoseyov D, Wasserman MG, Ta-shma A, et al. CCDC65 mutation causes primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure and hyperkinetic cilia. *PLoS one*. 2013;8(8):e72299.
40. Knowles MR, Ostrowski LE, Leigh MW, Sears PR, Davis SD, Wolf WE, et al. Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(6):707-17.
41. Wirschell M, Olbrich H, Werner C, Tritschler D, Bower R, Sale WS, et al. The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nature genetics*. 2013;45(3):262-8.
42. Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, et al. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nature genetics*. 2014;46(6):646-51.
43. Hirst RA, Rutman A, Williams G, O'Callaghan C. Ciliated air-liquid cultures as an aid to diagnostic testing of primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2010;138(6):1441-7.
44. Collins SA, Gove K, Walker W, Lucas JS. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *The European respiratory journal*. 2014;44(6):1589-99.
45. Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, Baker BR, Shapiro AJ, Brown DE, et al. Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Annals of the American Thoracic Society*. 2013;10(6):574-81.
46. Pifferi M, Caramella D, Cangiotti AM, Ragazzo V, Macchia P, Boner AL. Nasal nitric oxide in atypical primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2007;131(3):870-3.
47. Balfour-Lynn IM, Laverty A, Dinwiddie R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood*. 1996;75(4):319-22.
48. Palm J, Lidman C, Graf P, Alving K, Lundberg J. Nasal nitric oxide is reduced in patients with HIV. *Acta oto-laryngologica*. 2000;120(3):420-3.
49. Nakano H, Ide H, Imada M, Osanai S, Takahashi T, Kikuchi K, et al. Reduced nasal nitric oxide in diffuse panbronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(6):2218-20.
50. Arnal JF, Flores P, Rami J, Murris-Espin M, Bremont F, Pasto IAM, et al. Nasal nitric oxide concentration in paranasal sinus inflammatory diseases. *The European respiratory journal*. 1999;13(2):307-12.
51. Mateos-Corral D, Coombs R, Grasemann H, Ratjen F, Dell SD. Diagnostic value of nasal nitric oxide measured with non-velum closure techniques for children with primary ciliary dyskinesia. *The Journal of pediatrics*. 2011;159(3):420-4.
52. Shapiro AJ, Zariwala MA, Ferkol T, Davis SD, Sagel SD, Dell SD, et al. Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCDF foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatric pulmonology*. 2016;51(2):115-32.

53. Stannard WA, Chilvers MA, Rutman AR, Williams CD, O'Callaghan C. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(4):307-14.
54. Chilvers MA, McKean M, Rutman A, Myint BS, Silverman M, O'Callaghan C. The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *The European respiratory journal*. 2001;18(6):965-70.
55. Jackson CL, Goggins PM, Lucas JS. Ciliary beat pattern analysis below 37°C may increase risk of primary ciliary dyskinesia misdiagnosis. *Chest*. 2012;142(2):543-4.
56. Omran H, Loges NT. Immunofluorescence staining of ciliated respiratory epithelial cells. *Methods in cell biology*. 2009;91:123-33.
57. Olbrich H, Horváth J, Fekete A, Loges NT, Storm van's Gravesande K, Blum A, et al. Axonemal localization of the dynein component DNAH5 is not altered in secondary ciliary dyskinesia. *Pediatric research*. 2006;59(3):418-22.
58. Knowles MR, Zariwala M, Leigh M. Primary Ciliary Dyskinesia. *Clinics in chest medicine*. 2016;37(3):449-61.
59. Andjelkovic M, Minic P, Vreća M, Stojiljkovic M, Skakic A, Sovtic A, et al. Genomic profiling supports the diagnosis of primary ciliary dyskinesia and reveals novel candidate genes and genetic variants. *PloS one*. 2018;13(10):e0205422.
60. Budny B, Chen W, Omran H, Fliegauf M, Tschach A, Wisniewska M, et al. A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Human genetics*. 2006;120(2):171-8.
61. Andđelković M, Spasovski V, Vreća M, Sovtić A, Rodić M, Komazec J, et al. The importance of genomic profiling for differential diagnosis of pediatric lung disease patients with suspected ciliopathies. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2019;147(3-4):160-6.
62. Schmidt A, Lamzin VS. Veni, vidi, vici - atomic resolution unravelling the mysteries of protein function. *Current opinion in structural biology*. 2002;12(6):698-703.
63. Aloy P, Russell RB. Structural systems biology: modelling protein interactions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(3):188-97.
64. Ma J, Wang S, Zhao F, Xu J. Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013;29(13):i257-65.
65. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*. 2015;10(6):845-58.
66. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605-12.
67. Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C. Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic acids research*. 2021;49(W1):W216-w27.
68. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *International journal of proteomics*. 2014;2014:147648.
69. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING V11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D607-d13.
70. Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013;29(20):2588-95.
71. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D512-20.
72. Chang KT, Guo J, di Ronza A, Sardiello M. Aminode: Identification of Evolutionary Constraints in the Human Proteome. *Scientific reports*. 2018;8(1):1357.
73. Loges NT, Olbrich H, Becker-Heck A, Häffner K, Heer A, Reinhard C, et al. Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;85(6):883-9.
74. Behal RH, Miller MS, Qin H, Lucker BF, Jones A, Cole DG. Subunit interactions and organization of the *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport complex A proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(15):11689-703.
75. Šedová L, Buková I, Bažantová P, Petrezsélyová S, Prochazka J, Školníková E, et al. Semi-Lethal Primary Ciliary Dyskinesia in Rats Lacking the Nme7 Gene. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(8):3810.
76. Yoke H, Ueno H, Narita A, Sakai T, Horiuchi K, Shingyoji C, et al. Rspn4a is essential for the triplet radial spoke head assembly of the mouse motile cilia. *PLoS genetics*. 2020;16(3):e1008664.
77. Zhang Y, Huang G, Shornick LP, Roswit WT, Shipley JM, Brody SL, et al. A transgenic FOXJ1-Cre system for gene inactivation in ciliated epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;36(5):515-9.
78. Rawlins EL, Ostrowski LE, Randell SH, Hogan BL. Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(2):410-7.
79. Ostrowski LE, Hutchins JR, Zakei K, O'Neal WK. Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2003;8(4):637-45.
80. Li X, Floriddia EM, Toskas K, Chalfouh C, Honore A, Aumont A, et al. FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential. *Experimental cell research*. 2018;368(1):84-100.
81. Rawlins EL, Hogan BL. Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(1):L231-4.
82. Schmitz F, Burtscher I, Stauber M, Gossler A, Lickert H. A novel Cre-inducible knock-in ARL13B-tRFP fusion cilium reporter. *Genesis (New York, NY : 2000)*. 2017;55(11).
83. You Y, Richer EJ, Huang T, Brody SL. Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells: selection of a proliferative population. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283(6):L1315-21.
84. Arbi M, Pefani DE, Kyrousi C, Lalioti ME, Kalogeropoulou A, Papanastasiou AD, et al. GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium. *EMBO reports*. 2016;17(3):400-13.
85. Marshall CB, Mays DJ, Beeler JS, Rosenbluth JM, Boyd KL, Santos Guasch GL, et al. p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell reports*. 2016;14(10):2289-300.
86. Stubbs JL, Vladar EK, Axelrod JD, Kintner C. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nature cell biology*. 2012;14(2):140-7.
87. Cho KJ, Noh SH, Han SM, Choi WI, Kim HY, Yu S, et al. ZMYND10 stabilizes intermediate chain proteins in the cytoplasmic pre-assembly of dynein arms. *PLoS genetics*. 2018;14(3):e1007316.
88. Kyrousi C, Arbi M, Pilz GA, Pefani DE, Lalioti ME, Ninkovic J, et al. Mcidas and GemC1 are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche. *Development (Cambridge, England)*. 2015;142(21):3661-74.

89. Mirra V, Werner C, Santamaria F. Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on Clinical Aspects, Genetics, Diagnosis, and Future Treatment Strategies. *Frontiers in pediatrics*. 2017;5:135.
90. Bradley J, Moran F, Greenstone M. Physical training for bronchiectasis. The Cochrane database of systematic reviews. 2002;2002(3):Cd002166.
91. Boe J, Dennis JH, O'Driscoll BR, Bauer TT, Carone M, Dautzenberg B, et al. European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers. *The European respiratory journal*. 2001;18(1):228-42.
92. Hart A, Sugumar K, Milan SJ, Fowler SJ, Crossingham I. Inhaled hyperosmolar agents for bronchiectasis. The Cochrane database of systematic reviews. 2014(5):Cd002996.
93. Paff T, Daniels JM, Weersink EJ, Lutter R, Vonk Noordegraaf A, Haarman EG. A randomised controlled trial on the effect of inhaled hypertonic saline on quality of life in primary ciliary dyskinesia. *The European respiratory journal*. 2017;49(2).
94. Konstan MW, Ratjen F. Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: potential role in the early treatment of cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2012;11(2):78-83.
95. El-Abiad NM, Clifton S, Nasr SZ. Long-term use of nebulized human recombinant DNase1 in two siblings with primary ciliary dyskinesia. *Respiratory medicine*. 2007;101(10):2224-6.
96. Desai M, Weller PH, Spencer DA. Clinical benefit from nebulized human recombinant DNase in Kartagener's syndrome. *Pediatric pulmonology*. 1995;20(5):307-8.
97. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Jr., Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(10):957-69.
98. King PT, Holmes PW. Use of antibiotics in bronchiectasis. *Reviews on recent clinical trials*. 2012;7(1):24-30.
99. Deuse T, Reitz BA. Heart-lung transplantation in situ versus totalis. *The Annals of thoracic surgery*. 2009;88(3):1002-3.
100. Macchiarini P, Chapelier A, Vouhé P, Cerrina J, Ladurie FL, Parquin F, et al. Double lung transplantation in situ inversus with Kartagener's syndrome. Paris-Sud University Lung Transplant Group. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1994;108(1):86-91.
101. Lai M, Pifferi M, Bush A, Piras M, Michelucci A, Di Cicco M, et al. Gene editing of DNAH11 restores normal cilia motility in primary ciliary dyskinesia. *Journal of medical genetics*. 2016;53(4):242-9.
102. Fulcher AS, Turner MA. Abdominal manifestations of situs anomalies in adults. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2002;22(6):1439-56.

Molekularna osnova monogenskog dijabetesa

Jovana Komazec, Milena Ugrin

Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd, Srbija

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

Apstrakt

Monogenski dijabetes je heterogen oblik dijabetesa u čiji nastanak je uključen veliki broj gena. Promene u genima uzročnicima monogenskog dijabetesa narušavaju funkciju β -ćelije pankreasa dovodeći do smanjene ili oštećene sekrecije insulina i, posledično, hiperglikemije kod pacijenata. Produkte ovih gena uglavnom čine transkripcioni faktori, zatim membranski kanali i proteini sa specifičnom funkcijom u ćeliji. Mnogi transkripcioni faktori monogenskog dijabetesa imaju plejotropno dejstvo, te se kod nosioca promena u ovim genima mogu uočiti ne samo poremećaji u funkcionisanju β -ćelija, već i defekti u drugim organima ili multisistemski poremećaji. Dva glavna oblika monogenskog dijabetesa su neonatalni dijabetes, koji se javlja u prvih 6 meseci života, i mnogo češći, MODY dijabetes koji nastaje u mlađem odrasлом dobu. Najčešći geni uzročnici neonatalnog dijabetesa su geni *KCNJ11*, *ABCC8* i *INS* kao i *lokus 6q24*, dok se u slučaju MODY dijabetesa izdvajaju dva dominantna gena *HNF1A* i *GCK*. Iako je monogenski dijabetes veoma redak, njegovo prepoznavanje među rasprostranjenijim oblicima dijabetesa je od izuzetnog značaja, s obzirom na to da su terapija, klinička prezentacija, subklasifikacija i prognoza toka bolesti specifični prema genu uzročniku. Savremene tehnologije sekvenciranja (NGS) su pronašle svoje mesto u dijagnozi monogenskog dijabetesa, budući da je ova metoda nezamenjiva kada je u pitanju analiza velikog broja gena i heterogen fenotip koji se sreće kod ovog tipa dijabetesa. Rastuća saznanja o genima uzročnicima monogenskog dijabetesa su izdvojila ovaj oblik dijabetesa kao dobrog kandidata za implementaciju relativno novog koncepta, precizne medicine dijabetesa, čiji bi krajnji cilj bio postizanje boljeg kvaliteta života pacijenata.

Ključne reči: Neonatalni dijabetes, MODY dijabetes, geni uzročnici monogenskog dijabetesa, NGS

The Molecular Basis of Monogenic Diabetes

84

Jovana Komazec, 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

Monogenic diabetes is a heterogeneous form of diabetes resulting from defects in a single gene. Defects in monogenic diabetes-related genes disrupt the β -cells function, leading to reduced or impaired insulin secretion and, consequently, hyperglycemia in patients. Products of these genes are mainly transcription factors, followed by membrane channels and proteins with a specific cell function. Most transcription factors involved in monogenic diabetes have a pleiotropic effect expanding the β -cells dysfunction with defects in other organs or multisystem disorders. Two main forms of monogenic diabetes are neonatal diabetes, appearing in the first 6 months of life, and the more common, MODY diabetes, that occurs in young adulthood. The most common genes involved in neonatal diabetes are *KCNJ11*, *ABCC8* and *INS*, followed by the 6q24 locus, while in the case of MODY diabetes the two dominant genes *HNF1A* and *GCK* stand out. Although monogenic diabetes is very rare, its recognition among the more common forms of diabetes is of great importance, since therapy, clinical subclassification and presentation, as well as disease prognosis are gene-specific. Modern sequencing technologies (NGS) have found their place in the diagnosis of monogenic diabetes, as this method is irreplaceable when it comes to the analysis of a large number of genes and the heterogeneous phenotype encountered in these patients. Growing knowledge about monogenic diabetes-related genes has singled out this form of diabetes as a good candidate for the implementation of a relatively new concept, the precision diabetes medicine, whose ultimate goal would be achieving a better quality of life for the patients.

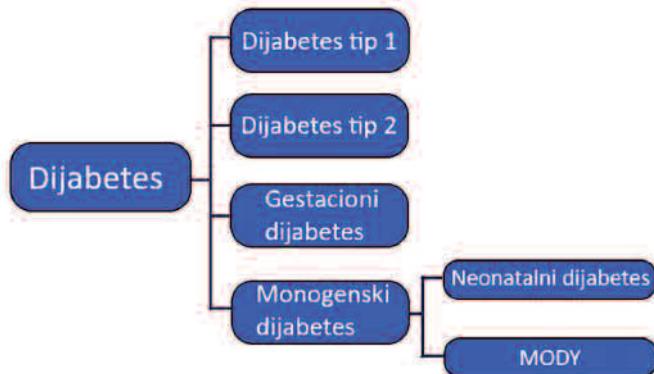
Key words: Neonatal diabetes, MODY diabetes, Monogenic diabetes-related genes, NGS

UVOD

Dijabetes (*Diabetes mellitus*) predstavlja grupu metaboličkih bolesti kojima je zajednički imenitelj hiperglikemija – visok nivo glukoze (šećera) u krvi, nastala zbog deficita u sekreciji insulina ili zbog defekta u njegovom dejstvu ili usled postojanja ova poremećaja [1].

Kada se govori o dijabetesu, uglavnom se pominju dva oblika, dijabetes tipa jedan (*Diabetes mellitus* tip 1, DM1) i dijabetes tipa dva (*Diabetes mellitus* tip 2, DM2). Takođe je poznat i gestacioni dijabetes, dok se za monogenski dijabetes manje zna (Slika 1). Dijabetes tip 1 i dijabetes tip 2 su poligenska obolenja, uzrokovana genskim faktorima, faktorima spoljašnje sredine i načinom života, gestacioni dijabetes specifičan je za stanje trudnoće, dok je monogenski dijabetes izazvan patogenim varijantama u jednom genu [1, 2]. Sam termin monogenski dijabetes nije jedinstven, već opisuje veliki broj poremećaja regulacije metabolizma glukoze koji mogu da nastanu usled promena u velikom broju gena (bar 40) dajući isto toliko različitih podtipova [1, 3]. Svi geni dovedeni u vezu sa monogenskim dijabetesom važni su za diferencijaciju i pravilno funkcionisanje β -ćelija pankreasa. Oni po funkciji koju obavljaju u ćeliji mogu biti transkripcioni faktori, enzimi, proteini sa određenom funkcijom (npr. insulin) ili membranski kanali (Tabela 1). U zavisnosti od gena u kome se desila promena, kao i da li je promena u homozigotnom ili heterozigotnom stanju, fenotip može da varira (Tabela 1) [3].

Monogenski dijabetes je redak i javlja se kod malog procenta pacijenata sa dijabetesom (1-5%) [4]. Prema vremenu pojavljivanja, deli se na neonatalni dijabetes (Neonatalni dijabetes melitus, NDM), ukoliko se javi u prvih 6 meseci života, i dijabetes adultnog tipa kod mlađih (eng. *Maturity-onset diabetes of the Young* - MODY), ukoliko se dijagnostikuje kasnije u adolescentnom dobu (Slika 1) [2].



Slika 1. Uprošćeni šematski prikaz aktuelne klasifikacije dijabetesa. Našemi je uprošćena četvrta kategorija dijabetesa - monogenski dijabetes - koji se nalazi pod opštijim pojmom Specifični oblici dijabetesa u kojoj je monogenski dijabetes njen najbrojniji član. Za detaljniju klasifikaciju dijabetesa pogledati reference [1, 2].

Neonatalni dijabetes i geni uzročnici

Kada se hiperglikemija dijagnostikuje pre 6. meseca života, najčešće je u pitanju neonatalni monogenski dijabetes [5], dok je pojava DM1 u ovom uzrastu retka [6]. U periodu nakon 6. meseca života neonatalni dijabetes se retko dijagnostikuje, jer je tada uglavnom reč o DM1 [3, 6, 7]. Neonatalni monogenski dijabetes je veoma redak i procena je da se javlja kod 1 na 100,000 rođene dece [8]. Deli se na tranzijentni neonatalni dijabetes melitus (TNDM) i permanentni neonatalni dijabetes melitus (PNDM) [5]. Dok permanentni NDM zahteva doživotnu primenu terapije, tranzijentni NDM se spontano povlači do 18. meseca života, s tim što ovi pacijenti kasnije u toku života imaju visok rizik dobijanja dijabetesa sa kliničkim odlikama ranog DM2 tipa [9-11].

Za nastanak TNDM odgovoran je nepravilan imprinting lokusa 6q24. Varijante u genima *KCNJ11* i *ABCC8* takođe mogu dovesti do TNDM, međutim ovi geni su mnogo češće odgovorni za nastanak PNDM [9, 12].

Nepravilan imprinting **lokusa 6q24** je odgovoran za pojavu TNDM u oko 70% slučajeva [9]. U ovom regionu, udaljeni jedan od drugog oko 70kb, nalaze se dva gena, *PLAGL1* (eng. *Pleomorphic adenoma gene-like 1*), koji kodira transkripcioni faktor sa cinkanim prstima, i *HYMA1* (eng. *Hydatidiform mole associated and imprinted transcript*), čiji je produkt dugi nekodirajući RNK molekul (eng. *long non-codingRNA, lncRNA*), sa još uvek, neutvrđenom funkcijom [13]. *PLAGL1*, transkripcioni faktor i ko-faktor brojnih proteina i nuklearnih receptora, ima širok spektar uloga u ćeliji učestvujući u modulaciji ćelijskog ciklusa, procesima proliferacije i diferencijacije ćelija, u apoptozi, acetilaciji histona i kao tumor-supresor [14]. Prekomerna ekspresija *PLAGL1* u fetalnom i neonatalnom periodu dovodi do redukcije pankreasa i β -ćelijske mase, oštećene sekrecije insulinu i insulinske osetljivosti, kao i promenjene regulaciji gena koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata [14]. *PLAGL1* i *HYMA1* geni su imprintovani geni tj, ekspresija se dešava samo

sa paternalnog alela, dok je maternalni alel prirodno utišan kod oba gena. Usled povećane ekspresije paternalnog alela (mehanizma paternalne uniparentalne dizomije (UDP) ili duplikacije paternalnog alela) ili aktivacije ekspresije maternalnog alela (gubitak metilacije promotora na maternalnom alelu) dolazi do prekomerna ekspresija ova dva gena, što se povezuje sa nastankom TNDM [11].

U genima KCNJ11 i ABCC8, koji kodiraju dve subjedinice kalijumovog ATP zavisnog kanala (K_{ATP}) identifikovan je širok spektar varijanti. U zavisnosti od efekta koji imaju na K_{ATP} kanal, varijante u ova dva gena mogu da dovedu do pojave različitih bolesti, od kongenitalne hiperinsulinemije, preko MODY dijabetesa i tranzijentnog NDM do permanentnog NDM [12]. K_{ATP} kanal na membrani β -ćelije pankreasa povezuju glukozni metabolizam sa električnom aktivnošću direktno učestvujući u regulaciji sekrecije insulina u odgovoru na date vrednosti glukoze u krvi [12]. Heterozigotne aktivirajuće varijante u KCNJ11 genu predstavljaju glavni uzrok PNDM [12, 15], a ređe su implikovane u nastanak TNDM [16, 17], dok je obrnuto za varijante u ABCC8 genu [18]. Aktivirajuće varijante u oba gena onemogućavaju zatvaranje pore K_{ATP} kanala pri povećanju intracelularnog ATP-a, što sprečava depolarizaciju membrane β -ćelije i sekreciju insulina dovodeći do hiperglikemije (Slika 2) [12]. U većini slučajeva, varijante u KCNJ11 i ABCC8 nastaju spontano te vrlo često nije prisutna porodična istorija dijabetesa [12]. Budući da se K_{ATP} kanali sa subjedinicama kodiranim KCNJ11 i ABCC8 genima eksprimiraju i u neuronima i mišićnim ćelijama, određene varijante u ovim genima mogu dovesti do mnogo težeg oblika PNDM koji je udružen sa zastojem u neuro-motornom razvoju u kombinaciji sa epilepsijom (DEND sindrom, eng. *Developmental delay-epilepsy-neonatal diabetes syndrome*) ili bez (iDEND, *intermediate DEND*) [15, 19, 20].

Varijante u **INS genu** su drugi po redu uzrok nastanka PNDM [21]. Heterozigotne varijante **INS** gena utiču na strukturu i biosintezu insulina. Najveći broj do sada detektovanih varijanti ukida mesto za formiranje disulfidnih veza ili narušava postojeće usled čega se javlja nepravilno savijanje proteina. Ovako nepravilno savijen protein ne može da se sekretuje, već se nagomilava u endoplazmičnom retikulumu (ER) indukujući stres ER i smrt β -ćelije apoptozom [22-24]. Većina ovih varijanti ima dominantno-negativan efekat na insulinski molekul poreklom od *wild-type* alela, a klinička slika može da varira u zavisnosti od mesta u genu gde se desila promena [23]. Kod pacijenata sa varijantama u **INS** genu, dijabetes se javlja nešto kasnije u odnosu na nosioce KCNJ11 i ABCC8 varijanti. Iako se varijante mogu naslediti autozomno-dominanto, većina je nastala *de novo* [21].

Homozigotne varijante u genima GCK [25], GATA6 [26], EIF2AK3 [27], PDX1 [28], HNF1B [29], NEUROD1 [30] i mnogim drugim [10, 31, 32] odgovorne su za veoma retke oblike PNDM koji je udružen sa drugim sindromima i kod kojih se javljaju poremećaji u strukturi i funkciji drugih organa.

Menadžment pacijenata sa neonatalnim dijabetesom

Geni KCNJ11, ABCC8 i INS su tri najčešća gena odgovorna za nastanak monogenskog neonatalnog dijabetesa i ukoliko se hiperglikemija detektuje u prvih 6 meseci života potrebno je uraditi genetsko testiranje prvenstveno na ove gene [21]. Na osnovu genetičke etiologije određuje se terapija koja je specifična prema genu uzročniku, i predviđa dalji tok bolesti. Tako se u slučaju varijanti u KCNJ11 i ABCC8 genu, daju visoke doze sulfoniluree, umesto insulina, na koju pacijenti veoma dobro reaguju [33, 34]. Usled mutacija, bilo u KCNJ11 ili ABCC8 genu, javlja se nemogućnost zatvaranja K_{ATP} kanala koji reguliše oslobađanje insulina (deficit u sekreciji insulina), dok je endogena produkcija insulina očuvana. Oralno primenjena sulfonilurea prenosti ovaj "problem", zatvarajući K_{ATP} kanale i omogućavajući sekreciju insulina mehanizmom koji je nezavisан od ATP-a (Slika 2) [15]. Suprotno, za nosioce varijanti u **INS** genu, primenjuje se insulin [21]. Pacijenti sa 6q24 TNDM odlikuju se ranjom pojmom dijabetesa u odnosu na pacijente sa KCNJ11 i ABCC8 varijantama (prva nedelja vs. deseta nedelja života) [35], kod kojih se za regulaciju hiperglikemije koristi insulin u ranoj fazi (po rođenju), ili niske doze sulfoniluree u slučaju relapsa [11].

MODY dijabetes

Dijabetes adultnog tipa kod mladih, MODY, je u vreme kada je definisan, predstavlja poseban tip dijabetesa sa odlikama i DM1 i DM2. Javlja se kod dece i adolescenata koji nisu bili gojazni (zajedničko sa DM1), ali nije zahtevao insulin po postavljanju dijagnoze (zajedničko sa DM2) [36].

Klinički, MODY dijabetes predstavlja insulin-nezavisni dijabetes koji nastaje u adolescentnom dobu (pre 25. godine) i koji se nasleđuje na autozomno-dominantan način [36]. Ovim tradicionalnim kriterijumima su dodati i odsustvo autoantitela na β -ćelijske antigene, odsustvo gojaznosti i donekle očuvana endogena produkcija insulina (merljive vrednosti C-peptida). Prisustvo dijabetesa u porodici u dve do tri uzastopne generacije govori u prilog MODY dijabetesu, ali nije nužno budući da promene u genima mogu da nastanu i *de novo* i prvi put se javi kod probanda [37].

Genetički, MODY dijabetes je veoma heterogen što duguje spektru od 14 gena koji su odgovorni za njegov nastanak (Tabela 1B) (OMIM # 606391). U zavisnosti od gena uzročnika, klinička manifestacija, prognoza toka bolesti kao i način lečenja (terapija) variraju, te nije reč o jednom klinički uniformnom tipu dijabetesa, već o četraest različitim

MODY podtipova. Geni najčešće odgovorni za MODY dijabetes su *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, i *HNF1B* (>80% svih MODY slučajeva). Većina studija izdvaja dva gena uzročnika MODY dijabetesa kao izrazito dominantna u populaciji MODY pacijenata. Gen *HNF1A* je vodeći uzročnik MODY dijabetesa u Velikoj Britaniji i Norveškoj detektovan kod, redom, 52% i 45% MODY pacijenata [38, 39], dok je u zemljama južnog regiona Evrope glavni gen uzročnik gen *GCK* detektovan kod bar 50% MODY pacijenata (Španija (80%), Poljska (83%), Grčka (54%), Srbija (50%)) [40-43]. Skorija studija pokazala je da *HNF1B* gen može da bude relativno čest uzročnik MODY dijabetesa, prisutan kod više od 20% MODY pacijenata [43]. Preostali geni predstavljaju retke ili veoma retke uzročnike ovog tipa dijabetesa sa učestalošću koja se kreće oko 1% i manje (Tabela 1B) [4, 44].

Geni asocirani sa čestim oblicima MODY dijabetesa

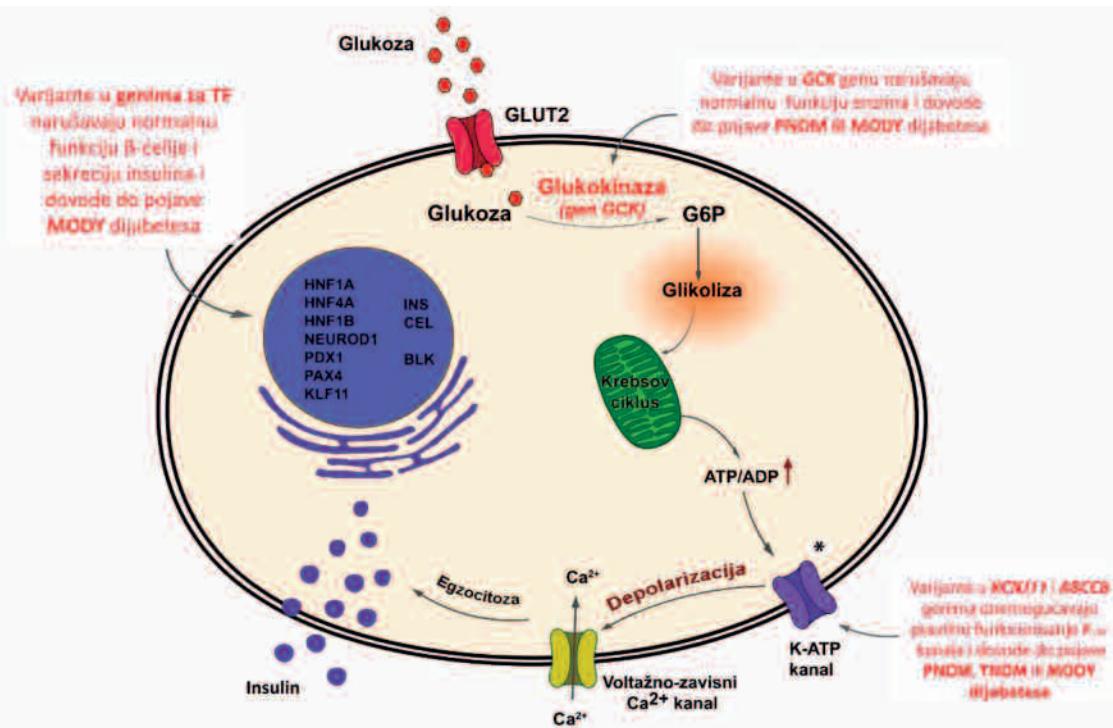
Gen za enzim glukokinazu (*GCK*) nalazi se na 7. hromozomu i čini ga 12 egzona i dva alternativna promotora. Sa takozvanog neuroendokrinog promotora eksprimira se glukokinaza, specifična samo za β-ćelije pankreasa [45]. Glukokinaza je ključni regulatorni enzim metabolizma ugljenih hidrata i katalizuje prvu reakciju glikolitičkog puta, konverziju glukoze u glukozo-6-fosfat (G6P) (Slika 2). Ima presudnu ulogu u regulaciji sekrecije insulina u odnosu na koncentraciju glukoze u krvi (glukozom stimulisana sekrecija insulina, eng. GSIS) i predstavlja svojevrsni senzor za glukozu u β-ćelijama [46]. U ovom genu identifikovano je preko 600 različitih varijanti (*missense*, *nonsense*, *frameshift*, *splice site*), koje se, bez primećenog postojanja „hot spot“ mesta, javljaju u svim egzonima i promotoru. Najučestalije su *missense* varijante, dok su delecije u *GCK* genu, parcijalne ili delecije celog gena, veoma retke [47]. Za razliku od kodirajućeg regiona, u promotorskog regionu identifikovana je samo jedna varijanta označena kao patogena (-71G>C) [48] i jedan polimorfizam koji je asociran sa povećanjem nivoa glukoze (-30G>A) [49]. Najnovija studija je ukazala na postojanje prvog varijantnog seta u promotorskog regionu (-282C>T, -194A>G, 402C>G) koji može aditivno da utiče na povećanje glikemije kada je glikemija kod pacijenata već narušena [50]. Najveći broj kodirajućih varijanti predstavljaju heterozigotne varijante koje dovode do gubitka funkcije enzima („loss-of-function“) i odgovorne su za nastanak GCK-MODY dijabetesa. Ove varijante smanjuju afinitet enzima za supstratom pomerajući glukozni prag na više vrednosti (sa 5mmol/l na 7mmol/l) što dovodi do kasnije aktivacije glukozom stimulisane sekrecije insulina (eng. GSIS – glucose-stimulated insulin secretion) (Slika 2) [51]. Pored pomenutih varijanti, javljaju se heterozigotne aktivirajuće varijante koje povećavaju afinitet enzima (uslovi konstantne sekrecije insulina) dovodeći do pojave hiperinsulinemične hipoglikemije, i homozigotne inaktivirajuće varijante ili dvostruko heterozigotne varijante koje su odgovorne za nastanak PNDM [47].

Fenotip GCK-MODY dijabetesa je veoma homogen uprkos velikom broju genskih varijanti koje različito utiču na aktivnost enzima, što se može pripisati kompenzacijoj regulaciji drugog *wild-type* alela [52]. Kod ovih pacijenata regulacija sekrecije insulina je u potpunosti očuvana, ali se dešava pri višoj vrednosti glukoze (između 5.5mmol/l i 8mmol/l) koja odgovara pomerenom glukoznom pragu [51, 53]. GCK-MODY se razlikuje od ostalih MODY podtipova po asimptomatskoj, blagoj i stabilnoj hiperglikemijom koja je prisutna od rođenja, i koja vrlo često ostaje neotkrivena sve do slučajne ili rutinske analize krvi. Budući da je hiperglikemija neprogresivna, a rizik od mikro- i makrovaskularnih komplikacija veoma mali, nosioci ovih varijanti ne zahtevaju terapiju [54]. Izuzetak su trudnice, koje, u zavisnosti od toga kakav je genetički status majke i fetusa, mogu biti podvrgnute insulinskoj terapiji kako bi se sprečile potencijalne komplikacije kod majke i deteta [53, 55].

*Geni koji kodiraju transkripcione faktore HNF familije (*HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*)*

***HNF1A* gen** je esencijalan transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju velikog broja gena u β-ćelijama. Pokazano je da je u ćelijama pankreasa bar 71 gen regulisan *HNF1A* transkripcionim faktorom [56]. Neki od produkata ovih gena uključeni su u procese regulacije sinteze i sekrecije insulina i odgovora ćelije na povećanje koncentracije glukoze [56, 57] poput gena za insulin (*INS*), *HNF4A* gena (gen uzročnik MODY1 dijabetesa) i *PDX1* gena (gen uzročnik MODY4 dijabetesa) [58]. U bubrežima, gen *HNF1A* reguliše ekspresiju gena *SGLT-2* čiji je produkt natrijumov glukozni transporter u proksimalnim tubulama bubreža [59].

Heterozigotne varijante u genu *HNF1A* dovode do nastanka MODY3 dijabetesa, koji je pored GCK-MODY, jedan od dva najčešća MODY podtipa. U genu *HNF1A* identifikovano je više od 400 različitih varijanti koje su uglavnom svojstvene pojedinačnim familijama. Dominantne su, redom, *missense*, *frameshift* *nonsense*, *splice-site* varijante i *indeli*, a manji postotak čine parcijalne delecije i delecije celog gena. Varijante su pronađene u promotoru i svim egzonima, a egzoni 2 i 4 se izdvajaju kao potencijalna „hot spot“ mesta [60]. Promotorske varijante mogu da imaju dualan efekat na ekspresiju gena. Dok većina varijanti, poput c.-283A>C, c.-218T>C, c.-154-160insTGGGGGT smanjuje ekspresiju gena [50, 61], pojedine dovode do povećane ekspresije, npr. c.-128T>C [62]. Bez obzira na efekat, promenjena ekspresija *HNF1A* gena je asocirana sa nastankom MODY dijabetesa. Kada su u pitanju kodirajuće varijante, *in vitro* analize su pokazale da one mogu da dovodu do odsustva ili oslabljenog vezivanja *HNF1A* transkripcionog faktora za DNK,



Slika2. Ilustracija β-ćelije pankreasa i osnovnih koraka glukozom stimulisane sekrecije insulina (eng. GSIS).

Sa porastom koncentracije glukoze u krvi, iznad bazalnog nivoa (~5mmol/l), glukoza se transportuje u β-ćeliju pankreasa preko glukoznog transportera GLUT2. Ulaskom glukoze u ćeliju glukokinaza (GCK) vrši fosforilaciju glukoze u glukozo-6-fosfat (G6P). U procesima glikolize, Krebsovom ciklusu i oksidativnoj fosforilaciji produkuje se ATP, a povećanje koncentracije ATP-a zatvara kalijumove ATP-zavisne kanale (K-ATP), što dovodi do depolarizacije ćelijske membrane. Depolarizovana membrana je signal za otvaranje voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala (Ca²⁺) i ulaska Ca²⁺ jona u ćeliju. Povećanje intracelularne koncentracije Ca²⁺ stimuliše egzocitozu insulinskih vezikula i sekreciju insulina.

Crveni tekst: Varijante u genima narušavaju normalnu funkciju produkta gena i dovode do različitih oblika monogenskog dijabetesa. Zvezdica (*) – mesto delovanja sulfoniluree. Sulfonilurea se vezuje za SUR1 subjedinicu K-ATP kanala i omogućava zatvaranje kanala, što finalno dovodi do sekrecije insulina.

odsustva ili oslabljene transaktivacije target gena, ili do smanjene stabilnosti HNF1A proteina [57, 63, 64]. Sve ovo ima za posledicu oslabljen odgovor β-ćelije na povećanje koncentracije glukoze, što se manifestuje smanjenom sekrecijom insulina i pojmom hiperglikemije [57, 65].

Priroda ovog dijabetesa je progresivna usled sve većeg propadanja β-ćelija i sve manje sekrecije insulina. Penetrabilnost genskih varijanti u genu *HNF1A* je visoka i do 25. godine života dijabetes će se razviti kod 60% nosilaca varijanti, a do 55. godine skoro kod svih [44]. Inicijalno, usled još uvek dovoljno očuvane endogene produkcije insulina, nosioci genskih varijanti mogu da imaju normalne ili blizu normalne vrednosti glukoze. Vremenom, sve većim propadanjem β-ćelija razviće se hiperglikemija i dijabetes čije je lečenje neophodno kako bi se, sprečile mikro- i makrovaskularne komplikacije svojstvene za ovaj podtip [66].

Nosioci genskih varijanti u genu *HNF1A* su osetljivi na niske doze sulfoniluree. Sulfonilurea se direktno vezuje za svoj receptor (SUR1) koji se nalazi u okviru K-ATP zavisnog kanala i stimuliše sekreciju insulina preko njega. Na ovaj način sulfonilurea zaobilazi sve prethodne korake metabolizma glukoze koji su narušeni usled smanjene funkcije HNF1A transkripcionog faktora [67, 68]. Prelazak sa insulina na sulfonilureu je uglavnom veoma uspešan kod ovih pacijenata [69, 70] međutim, usled sve većeg propadanja β-ćelije pankreasa i smanjenja sekrecije insulina, pacijenti postaju neosetljivi na sulfonilureu, te je na kraju insulin neizbežan [70].

HNF4A gen se, poput *HNF1A* gena, eksprimira rano tokom embriogeneze u ćelijama jetre, pankreasa i bubrega, ali pre njega [71]. Delujući kao homodimer reguliše ekspresiju velikog broja gena u ćelijama pankreasa, 10 puta većeg nego *HNF1A* gen [56], a sam *HNF1A* gen je jedan od njegovih targeta sa kojim formira unakrsnu regulacionu petlju koja je esencijalna za održavanje diferenciranosti β-ćelija pankreasa [56, 71]. Kao i u slučaju *HNF1A* gena, brojne heterozigotne varijante (*missense*, *frameshift nonsense*, *splice-site*, *indels*) dovode do gubitka funkcije proteina i što je povezano sa nastankom HNF4A-MODY oblika dijabetesa [60].

Fenotip HNF4A-MODY dijabetesa je veoma sličan fenotipu HNF1A-MODY dijabetesa, ali se uočavaju i diskretne razlike koje ih odvajaju jedan od drugog [44]. Tako npr. za *HNF1A*-MODY dijabetes specifična je pojava glukozurije (ekskreacija glukoze putem urina) [59], dok je specifičnost HNF4A-MODY dijabetesa je dualna priroda glikemije, odnosno postojanje hiperinsulinemične hipoglikemije u neonatalnom periodu koja prelazi u hiperglikemiju kasnije u životu i

Monogenski dijabetes					
A) Neonatalni dijabetes (1 na 100 000 rođenih)					
Gen	Funkcija gena	Patofiziologija	TN	Fenotip	
Lokus 6q24	Ekspresija sa paternalnog alela	Nepravilan imprinting lokusa 6q24 (ekspresija dva alela)	AD	TNDM: Pojava hiperglikemije u prvim nedeljama života, zastoj u rastu ploda Terapija - Insulin; oralni hipoglikemijski agensi (sulfonilurea)	
KCNJ11	SUR1 Subjedinica K _{ATP} kanala	Poremećaj u sekreciji insulinina (nemogućnost zatvaranja K _{ATP} kanala)	AD, AR, de novo.	PNDM, TNDM: Pojava hiperglikemije u prvim nedeljama života, zastoj u rastu ploda. Terapija - Insulin	
ABCC8	Kir6.2 Subjedinica K _{ATP} kanala	Poremećaj u sekreciji insulinina (nemogućnost zatvaranja K _{ATP} kanala)	AD, AR, de novo.	TNDM, PNDM: Pojava hiperglikemije u prvim nedeljama života, intrauterin zastoj u rastu ploda. Terapija - Insulin	
INS	Insulin	Poremećaj u biosintezi insulinina (nepravilno savijanje proteina)	AD, AR, de novo.	PNDM: Pojava hiperglikemije u prvim nedeljama života, intrauterin zastoj u rastu ploda. Terapija - Insulin	
B) MODY dijabetes					
Najčešći geni uzročnici MODY dijabetesa					
Gen	Funkcija gena	Patofiziologija	TN	Fenotip (% učestalost MODY podtipa)	Raniji naziv
GCK	Glukokinaza (enzim)	Poremećaj u detektovanju glukoze (pomeranje glukoznog praga na više vrednosti)	AD	GCK-MODY (30-50%): blaga, stabilna hiperglikemija, Terapija nije potrebna (ukidanje postojeće)	MODY2
HNF1A	Hepatocitni nuklearni transkripcioni faktor 1A	Progresivno propadanje β-ćelije, smanjena produkcija insulinina	AD	HNF1A-MODY (30-50%): progresivna hiperglikemija, glukozurija, mikro- i makrovaskularne komplikacije; Terapija - niske doze sulfoniluree	MODY3
HNF4A	Hepatocitni nuklearni transkripcioni faktor 4A	Progresivno propadanje β-ćelije, smanjena produkcija insulinina,	AD	HNF4A-MODY (5-10%): progresivna hiperglikemija, mikro- i makrovaskularne komplikacije; dualna glikemija, makrozomija. Terapija - niske doze sulfoniluree	MODY1
HNF1B	Hepatocitni nuklearni transkripcioni faktor 1B	Poremećaj u embrionalnom razviju pankreasa, poremećaj funkcije β-ćelije	AD, de novo.	HNF1B-MODY (1-5%) i RCAD sindrom: dijabetes asociiran sa abnormalnostima pankreasa, urogenitalnog sistema; varijabilan fenotip, hepatična insulininska rezistencija. Terapija - insulin	MODY5
Retki (<1%) i veoma retki (<<1%) geni uzročnici MODY dijabetesa					
PDX1	Transkripcioni faktor	Poremećaj funkcije β-ćelije	AD	PDX1-MODY (<1%): neonatalni dijabetes, pankreasna ageneza. Terapija - dijeta, OHA ili insulin.	MODY4
NEUROD1	Transkripcioni faktor	Poremećaj funkcije β-ćelije	AD	NEUROD1-MODY (<1%): dijabetes u odrasloj dobi, varijabilan fenotip. Terapija - OHA ili insulin.	MODY6
KLF11	Transkripcioni faktor	Poremećaj funkcije β-ćelije	AD	KLF11-MODY (<<1%): fenotip sličan DM2; Terapija - OHA ili insulin.	MODY7
CEL	Karboksil-estar lipaza	Egzokrina i endokrina disfunkcija pankreasa (nepravilno savijanje proteina)	AD	CEL-MODY (<<1%): dijabetes u adultnom dobu, disfunkcija egzokrinog pankreasa, lipomatoza. Terapija - dijeta, OHA ili insulin.	MODY8
PAX4	Transkripcioni faktor	Poremećaj funkcije β-ćelije	AD	PAX4-MODY (<<1%): Terapija - dijeta, OHA ili insulin.	MODY9
INS	Insulin	Poremećaj u biosintezi insulinina (nepravilno savijanje proteina)	AD	INS-MODY (<1%): pojava u mladom dobu. Terapija - insulin, dijeta, sulfonilurea.	MODY10
BLK	B limfocitna kinaza	Poremećaj u sekreciji insulinina	AD	BLK-MODY (<<1%): dijabetes u odrasloj dobi.	MODY11
ABCC8	SUR1 Subjedinica K _{ATP} kanala	Poremećaj u sekreciji insulinina (nemogućnost zatvaranja K _{ATP} kanala)	AD	ABCC8-MODY (<1%): klinički fenotip sličan HNF1A/4A-MODY Terapija - visoke doze sulfoniluree.	MODY12
KCNJ11	Kir6.2 Subjedinica K _{ATP} kanala	Poremećaj u sekreciji insulinina (nemogućnost zatvaranja K _{ATP} kanala)	AD	KCNJ11-MODY (<<1%): pojava dijabetesa u odrasloj dobi. Terapija - visoke doze sulfoniluree;	MODY13
APPL1	Adapterski protein u signalnom putu (interakcija sa AKT2 u signalnom putu insulinina)	Poremećaj u sekreciji insulinina	AD	APPL1-MODY (<<1%): pojava dijabetesa u odrasloj dobi. Terapija - dijeta, OHA ili insulin	MODY 14

TN – tip nasleđivanja (AD -autozomno-dominantno, AR – autozomno-recesivno; OHA – oralni hipoglikemijski agensi (npr. sulfonilurea).

Tabela 1. Geni uzročnici najčešćih oblika monogenskog dijabetesa

rezultuje dijabetesom [72]. Poput pacijenata sa HNF1A-MODY dijabetesom HNF4A-MODY pacijenti su osetljivi na sulfonilureu, te uspešno reaguju na niske doze sulfoniluree [3].

Gen HNF1B, eksprimira se ranim fazama embrionalnog razvića, pre *HNF1A* i *HNF4A* gena, i uključen je u organogenezu pankreasa, jetre, urogenitalnog trakta, bubrega, creva i pluća [71]. Budući da učestvuje u regulaciji diferencijacije pomenutih organa, negativan efekat patogenih varijanti je dalekosežniji zbog čega se kod nosioca ovih promena često javljaju multisistemski poremećaji koji zahvataju te organe [73-75].

Genske promene u *HNF1B* genu obuhvataju nukleotidne zamene, manje delekcije i insercije nukleotida, ali i parcijalne delekcije i delekcije celog gena, koje su podjednako učestale kao i *missense* varijante zastupljene sa 31% [74, 76]. Velike delekcije su specifične za *HNF1B* gen budući da je gen smešten u regionu hromozoma 17 koji je podložan genomskim rearanžmanima i velikim delekcijama koje nastaju nehomologom rekombinacijom [77]. Genske varijante su raspoređene po celom kodirajućem regionu sa dominantnom distribucijom u prva četiri egzona [73].

Varijante u *HNF1B* genu su prvo bitno bile asocijirane sa pojavom HNF1B-MODY dijabetesa, međutim ustanovljeno je da je prisustvo renalnih aberacija različitog tipa, pre svega cisti, primarna odlika često prisutna i pre pojave dijabetesa [74]. Zbog istovremenog prisustva dijabetesa i cisti na bubrežima HNF1B-MODY dijabetes je prepoznatljiv još i kao *RCAD* sindrom (eng. *Renal Cysts and Diabetes Syndrome*). Pojava cisti na bubrežima je u direktnoj vezi sa smanjenom transkripcionom aktivacijom tzv. cističnih gena *PKHD1*, *PKD1* i *UMOD*, koji se nalaze pod kontrolom *HNF1B* gena [75, 78]. *HNF1B* je ključni faktor u transkripcionoj mreži koja reguliše diferencijaciju pankreasa tokom embrionalnog razvića, a aberacije u ovom genu su direktno povezane sa hipoplazijom (smanjena masa) i promenama na pankreasu [77]. Ovakve promene se uočavaju kod heterozigotnih nosilaca genskih varijanti u *HNF1B* genu. Pojava dijabetesa kod nosilaca varijanti je posledica disfunkcije β-ćelija usled čega je smanjena sekrecija insulina, što je verovatno posledica pankreasne hipoplazije [75, 77].

Nije pokazano da fenotip *HNF1B*-MODY pacijenata zavisi od vrste promene u genu, tj. fenotip pacijenata je sličan bez obzira da li se radi o parcijalnoj ili delekciji celog gena ili promeni pojedinačnog nukleotida [76]. Penetrabilnost varijanti je varijabilna te bolest može da nastane rano u detinjstvu ili kasnije u adultnom dobu [78]. *HNF1B*-MODY ima autozomno-dominantni obrazac nasleđivanja, međutim u oko 50% slučajeva ovaj MODY nastaje spontano, zbog čega ne postoji istorija dijabetesa i/ili bolesti asocijirane sa bubrežima u porodici [74]. Nosioci varijanti u *HNF1B* genu, za razliku od nosioca varijanti u *HNF1A/4A* genu nisu osetljivi na sulfonilureu, te se dijabetes reguliše insulinском terapijom, a za poremećaj funkcije bubrega primenjuje se terapija svojstvena za bolesti bubrega [77].

Geni asociirani sa retkim i veoma retkim oblicima MODY dijabetesa

PDX1 gen (eng. *Pancreatic duodenal homeobox gene 1, PDX1*) kodira PDX1 transkripcioni faktor sa homeodomrenom koji je prvo bitno identifikovan kao aktivator gena za insulin i somatostatin. U toku ranog embrionalnog razvića eksprimira se u pankreasu za čiju je diferencijaciju neophodan. U adultnoj ćeliji potreban je za održavanje identiteta β-ćelije pankreasa. Reguliše ekspresiju nekoliko gena (*INS*, *GLUT2*, *GCK*), uključenih u metabolizam glukoze [79]. Heterozigotne varijante identifikovane u *PDX1* genu su asocijirane sa nastankom PDX1-MODY dijabetesa (MODY4), dok su homozigotne i bialelne varijante odgovorne za pojavu neonatalnog dijabetesa [28, 80].

NEUROD1 gen, poznat još i kao *BETA2*, kodira neurogeni faktor diferencijacije (NEUROD1), transkripcioni faktor koji se eksprimira u endokrinih ćelijama pankreasa, crevima i određenim neuronima centralnog i perifernog sistema [81]. Pripada familiji bHLH transkripcionih faktora i vezuje se za E-elemente (E-box sequences) u promotorima gena *INS*, *SUR1* (*ABCC8*), *GCK*, *PAX6*, važnih za održavanje glukozne homeostaze, stimulišući njihovu ekspresiju [82-85]. Heterozigotne varijante identifikovane u *NEUROD1* genu su odgovorne za pojavu retkog oblika monogenskog dijabetesa NEUROD1-MODY (MODY6) podtipa. Najveći broj varijanti, uglavnom *frameshift* i *missense*, asociiran sa NEUROD1-MODY dijabetesom je identifikovan u transaktivacionom domenu [86]. Nosioci varijanti u *NEUROD1* genu odlikuju se varijabilnim fenotipom, a terapija može da varira od dijetе do insulinu [87-89]. Homozigotne varijante u *NEUROD1* genu dovode do pojave PNDM koji može da bude udružen sa neurološkim poremećajima kao što su zastoj u razvoju, sensorineurala gluvoča, oslabljen vid, cerebralna hipoplazija [30].

Krueppel-like factor 11 transkripcioni faktor je produkt **gena KLF11** koji se eksprimira u β-ćelijama pankreasa. Vezuje se za promotor *INS* gena i učestvuje u finoj regulaciji transkripcije gena za insulin (*INS*) delujući i kao represor i kao aktivator transkripcije u zavisnosti od ćelijskih uslova [90, 91]. Reguliše i ekspresiju gena *PDX1* gena, odgovornog za pojavu PDX1-MODY dijabetesa, što ukazuje na postojanje složene interakcije ovih gena putem koje se reguliše sekrecija insulinu u β-ćelijama pankreasa [90, 92]. Heterozigotne varijante u *KLF11* genu dovode do pojave KLF11-MODY (MODY7) dijabetesa. Pokazano je da ove varijante smanjuju transkripcionu aktivnost KLF11 transkripcionog faktora ili utiču na vezivanje kofaktora, što za posledicu ima redukciju promotorske aktivnosti gena za insulin [91, 93]. Na kliničkom nivou nosioci ovih promena ispoljavaju simptome rano nastalog DM2 ili dijabetesa tipa 1 B [91, 93].

Produkt **gena CEL** je enzim karboksil-estar lipaza, glavna komponenta pankreasnog soka, odgovorna za hidrolizu holesterol estara. Eksprimira se u ćelijama egzokrinog pankreasa, ćelijama mlečnih žlezda, ali ne i u β -ćelijama. Gen **CEL** je veoma polimorfan što duguje VNTR ponovcima u poslednjem jedanaestom egzonu, kojih je najčešće 16 u zdravoj populaciji [94]. VNTR ponovci nisu od značaja za obavljanje funkcije enzima (ne utiču na katalitičku aktivnost ili aktivaciju enzima), ali jesu za pravilno savijanje, sekreciju i stabilnost [95]. Delecije pojedinačnog nukleotida u jedanaestom egzonu menjaju sekvencu C-terminusa proteina i dovode do nepravilnog savijanja proteina (mutiran protein) koji ima tendenciju da formira ekstracelularne agregate. Ove promene su povezane sa pojavom sindroma egzokrine disfunkcije i dijabetesa, što je još poznato i kao CEL-MODY (MODY8) dijabetes [94]. *In vitro* studije su pokazale da se nakon egzocitoze javlja re-internalizacija agregata mutiranog proteina u acinusne i β -ćelije pankreasa što ima citotoksično dejstvo na ćeliju [96]. Dijabetes nastaje kao posledica prvo propadanja ćelija egzokrinog pankreasa koje potom zahvata i okolne endokrine ćelije, što objašnjava pojavu prvo egzokrine disfunkcije kod nosilaca ovih promena, pa tek onda dijabetesa kasnije u životu [97].

PAX4 (eng. *Paired box 4*) je transkripcioni faktor, produkt **PAX4 gena**, koji se eksprimira rano tokom embrionalnog razvića i neophodan je za diferencijaciju endokrinih progenitorskih ćelija u β -ćelije pankreasa, dok je u adultnom pankreasu važan za regeneraciju β -ćelija [98]. Heterozigotne varijante u **PAX4** genu dovode do pojave retkog PAX4-MODY (MODY 9) dijabetesa, sa heterogenom kliničkom prezentacijom, opisan kod malog broja pacijenata [99, 100].

INS gen je asociran sa nastankom NDM. Mnogo ređe, varijante u **INS** genu mogu dovesti do pojave autozomno-dominantnog oblika dijabetesa **INS-MODY** (MODY10) koji se javlja kasnije i manifestuje blažim kliničkom slikom u odnosu na NDM [21].

B limfocitna kinaza, produkt **gena BLK**, osim u B limfocitima, eksprimira se u β -ćelijama pankreasa. BLK predstavlja modulator sinteze i sekrecije insulina, povećavajući ekspresiju gena **PDX1** i **Nkx6.1** u uslovima visoke koncentracije glukoze. Do sada je samo jedna promena dovedena u vezu sa MODY dijabetesom (BKL-MODY, MODY11), za koju su *in vitro* analize su pokazale da varijanta skoro potpuno suprimira ekspresiju gena **PDX1** i **Nkx6.1** uključenih u regulaciju sinteze i sekrecije insulina [101].

Heterozigotne varijante u **genima KCNJ11 i ABCC8** retko dovode do autozomno-dominantnog dijabetesa koji se prezentuje u adultnom dobu i dovode do pojave dva MODY podtipova KCNJ11-MODY (MODY12) i ABCC8-MODY (MODY13). Varijante u ovim genima su najčešće odgovorne za nastanak NDM [34, 102, 103].

Gen APPL1 (eng. *Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH domain, and leucine zipper containing 1*) je poslednji gen stavljen na listu gena uzročnika MODY dijabetesa (APPL1-MODY, MODY14). Eksprimira se u jetri, adipoznom tkivu, mišićima i pankreasu. APPL1 je protein koji ima više funkcionalnih domena preko kojih stupa u interakciju sa drugim proteinima, uključujući i ključne proteine insulinskog signalnog puta. Opisane su dve heterozigotne varijante asocirane sa MODY dijabetesom koje dovode do gubitka funkcije proteina i smanjene sekrecije insulina [104].

Menadžment pacijenata sa MODY dijabetesom

Postavljanje dijagnoze MODY dijabetesa je izazov za lekare zbog relativno male učestalosti MODY dijabetesa i preklapanja kliničkih odlika MODY dijabetesa sa DM1 i DM2 [37]. Procena je da 80% pacijenata sa MODY dijabetesom nije prepoznato, već ima dijagnozu jednog od dva najčešća tipa, DM1 ili DM2 [4, 37]. Potraga za MODY dijabetesom među ovim mnogo rasprostranjenijim oblicima je od izuzetnog značaja za pacijente zbog toga što su terapija, dalji klinički tok i prognoza bolesti gen-specifični. Po dobijanju pozitivnog rezultata genetičkog testa, MODY pacijenti najčešće menjaju terapiju. Kod potvrđenih GCK-MODY pacijenata ukida se postojeća terapija, HNF1A/4A-MODY pacijenti mogu da sa egzogenog insulinu pređu na niske doze sulfoniluree, a KCNJ11/ABCC8-MODY na visoke doze sulfoniluree [34, 53, 69]. Sa terapijom koja je postavljena na osnovu gena uzročnika pacijenti postižu bolju regulaciju glikemije. Osim terapije, benefiti genetičke dijagnoze se ogledaju i u mogućnosti da se predvidi dalji tok dijabetesa: da li je stabilan (GCK-MODY) ili progresivan (HNF1A/4A-MODY); da li postoji nizak (GCK-MODY) ili visok rizik od vaskularnih komplikacija (HNF1A/4A-MODY) ili da li je udružen sa poremećajima koji zahvataju druge organe (HNF1B-MODY, CEL-MODY) [53, 54, 74]. S obzirom na to da je reč o dijabetesu koji se nasleđuje sa 50% verovatnoće od roditelja, i drugi članovi porodice mogu da se testiraju [4, 54].

Strategije za genetičku analizu monogenskog dijabetesa

Postavljanje genetičke dijagnoze monogenskog dijabetesa podrazumeva sekvenciranje gena i danas postoje različite strategije, od sekvenciranja pojedinačnog gena ili grupe gena do masovnog sekvenciranja velikog broja gena, bilo targetovano sekvenciranje ili sekvenciranje egzoma [43, 105-107]. Odabir strategije zavisi od više faktora: od kliničke slike pacijenta, tehnoloških mogućnosti i finansijske pristupačnosti. Genetička analiza jednog gena ili grupe gena (eng. *single or multi gene-target approach*) podrazumeva da se prethodno na kliničkom nivou odredi MODY podtip

kod pacijenta. Prednost ove strategije je što može biti ekonomski pristupačnija ako se analiziraju jedan ili dva gena, a mana je što ukoliko se ne pronađu promene u datim genima, može se dobiti lažno negativan rezultat, što pacijenta vraća na početak i zahteva nove laboratorijske analize i troškove [108]. Analiza grupe gena, ako se primenjuje klasično sekvenciranje (npr. samo najčešći geni) generalno je vremenski zahtevnija i može se ispostaviti da je skupa (npr. za analizu GCK, HNF1A i HNF4A gena treba ukupno sekvencirati 31 egzon). S toga treba ispitati isplativost ovakve analize i razmotriti NGS pristup (sekvenciranje nove generacije, eng. *Next generation sequencing, NGS*) i odgovarajući panel gena (npr. svi MODY geni). Sekvenciranje nove generacije je metoda izbora koja sve više nalazi primenu u genetičkim analizama. Ova metoda omogućava sekvenciranje velikog broja gena, reda veličine nekoliko hiljada, za relativno kratko vreme (2-3 dana). Kada se kod pacijenata uoči heterogen fenotip na osnovu kojeg nije moguće prepostaviti o kom genu uzročniku je reč, sekvenciranje egzoma je preporučena metoda [43, 108]. Iako ekonomski još uvek nije svima pristupačna, ona je nezamenjiva kada je u pitanju veliki broj gena, kao i heterogen fenotip bolesti koji se sreće i kod monogenskog dijabetesa.

Premda se NGS tehnologijom može očitati sekvenca svih gena od interesa, propust može da nastane kada su u pitanju geni koji se odlikuju velikim delecijama (parcijalne ili delekcije celog gena kao u slučaju *HNF1B* gena) ili duplikacijama. Velike delekcije nisu isključene ni za *GCK*, *HNF1A/4A* gene, ali su one u njima veoma retke [47, 60]. MLPA (eng. *Multiplex ligation-dependent probe amplification*) metodom mogu da se detektuju velike delekcije u MODY genima, a MS-MLPA (eng. *Methylation-Specific MLPA*) je pogodna za detekciju aberacija lokusa 6q24 kod TNDM. Kombinovana primena ove dve metode, NGS i MLPA, predstavlja najsveobuhvatniji pristup za detekciju varijanti u genima monogenskog dijabetesa kod suspektnih pacijenata [43, 109].

ZAKLJUČAK

Zahvaljujući napretku tehnologije otkriven je veliki broj gena koji se dovodi u vezu sa nastankom monogenskog dijabetesa. Patofiziološki mehanizmi monogenskog dijabetesa su bolje izučeni i shvaćeni nego kod drugih oblika dijabetesa. Ova rastuća saznanja su izdvojila monogenski dijabetes u odnosu na ostale oblike po tome što su klinička slika (fenotip), prognoza toka bolesti i pre svega terapija, gen-specifični, sa minimalnim uticajem spoljašnjih (ne-genetičkih) faktora. Stoga je ovaj tip dijabetesa, monogenski dijabetes, dobar kandidat za implementaciju relativno novog koncepta, precizne medicine dijabetesa [110, 111]. Primena precizne medicine kod monogenskog dijabetesa takođe predstavlja platformu za primenu ovog načina lečenja kod drugih, češćih oblika dijabetesa. Na taj način lečenje svakog pojedinačnog pacijenata prilagođava se njegovim potrebama uzimajući u obzir individualne karakteristike (genetička osnova; sredinski uslovi), što pacijentu obezbeđuje najbolju moguću terapiju i prognozu bolesti, i približava krajnjem cilju, a to je bolji kvalitet života.

ZAHVALNICA.

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

1. World Health O. Classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization; 2019 2019.
2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. Diabetes Care. 2018;41(Suppl 1):S13-s27.
3. Hattersley AT, Greeley SAW, Polak M, Rubio-Cabezas O, Njolstad PR, Mlynarski W, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. Pediatr Diabetes. 2018;19 Suppl 27:47-63.
4. Firdous P, Nissar K, Ali S, Ganai BA, Shabir U, Hassan T, et al. Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:253.
5. Barbetti F, D'Annunzio G. Genetic causes and treatment of neonatal diabetes and early childhood diabetes. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2018;32(4):575-91.
6. Edghill EL, Dix RJ, Flanagan SE, Bingley PJ, Hattersley AT, Ellard S, et al. HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months. Diabetes. 2006;55(6):1895-8.
7. Iafusco D, Stazi MA, Cotichini R, Cotellessa M, Martinucci ME, Mazzella M, et al. Permanent diabetes mellitus in the first year of life. Diabetologia. 2002;45(6):798-804.
8. Iafusco D, Massa O, Pasquino B, Colombo C, Iughetti L, Bizzarri C, et al. Minimal incidence of neonatal/infancy onset diabetes in Italy is 1:90,000 live births. Acta Diabetol. 2012;49(5):405-8.
9. Temple IK, Gardner RJ, Mackay DJ, Barber JC, Robinson DO, Shield JP. Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. Diabetes. 2000;49(8):1359-66.

10. Rubio-Cabezas O, Ellard S. Diabetes mellitus in neonates and infants: genetic heterogeneity, clinical approach to diagnosis, and therapeutic options. *Horm Res Paediatr.* 2013;80(3):137-46.
11. Temple IK, Shield JP. 6q24 transient neonatal diabetes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(3):199-204.
12. Flanagan SE, Clauin S, Bellanné-Chantelot C, de Lonlay P, Harries LW, Glyn AL, et al. Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K(ATP) channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat.* 2009;30(2):170-80.
13. Arima T, DREWELL RA, Oshimura M, Wake N, Surani MA. A novel imprinted gene, HYMAI, is located within an imprinted domain on human chromosome 6 containing ZAC. *Genomics.* 2000;67(3):248-55.
14. Vega-Benedetti AF, Saucedo C, Zavattari P, Vanni R, Zugaza JL, Parada LA. PLAGL1: an important player in diverse pathological processes. *J Appl Genet.* 2017;58(1):71-8.
15. Glyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med.* 2004;350(18):1838-49.
16. Yorifuji T, Nagashima K, Kurokawa K, Kawai M, Oishi M, Akazawa Y, et al. The C42R mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) gene as a cause of transient neonatal diabetes, childhood diabetes, or later-onset, apparently type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(6):3174-8.
17. Liu L, Nagashima K, Yasuda T, Liu Y, Hu HR, He G, et al. Mutations in KCNJ11 are associated with the development of autosomal dominant, early-onset type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2013;56(12):2609-18.
18. Ovsyannikova AK, Rymar OD, Shakhetsneider EV, Klimontov VV, Koroleva EA, Myakina NE, et al. ABCC8-Related Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY12): Clinical Features and Treatment Perspective. *Diabetes Ther.* 2016;7(3):591-600.
19. Masia R, Koster JC, Tumini S, Chiarelli F, Colombo C, Nichols CG, et al. An ATP-binding mutation (G334D) in KCNJ11 is associated with a sulfonylurea-insensitive form of developmental delay, epilepsy, and neonatal diabetes. *Diabetes.* 2007;56(2):328-36.
20. Zwaveling-Soonawala N, Hagebeuk EE, Slingerland AS, Ris-Stalpers C, Vulisma T, van Trotsenburg AS. Successful transfer to sulfonylurea therapy in an infant with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes (DEND) syndrome and a novel ABCC8 gene mutation. *Diabetologia.* 2011;54(2):469-71.
21. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, Boustred C, Parrish A, Shields B, et al. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes.* 2008;57(4):1034-42.
22. Meur G, Simon A, Harun N, Virally M, Dechaume A, Bonnefond A, et al. Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention. *Diabetes.* 2010;59(3):653-61.
23. Støy J, Edghill EL, Flanagan SE, Ye H, Paz VP, Pluzhnikov A, et al. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(38):15040-4.
24. Colombo C, Porzio O, Liu M, Massa O, Vasta M, Salardi S, et al. Seven mutations in the human insulin gene linked to permanent neonatal/infancy-onset diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 2008;118(6):2148-56.
25. Njølstad PR, Søvik O, Cuesta-Muñoz A, Bjørkhaug L, Massa O, Barbetti F, et al. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med.* 2001;344(21):1588-92.
26. Chao CS, McKnight KD, Cox KL, Chang AL, Kim SK, Feldman BJ. Novel GATA6 mutations in patients with pancreatic agenesis and congenital heart malformations. *PLoS One.* 2015;10(2):e0118449.
27. Delépine M, Nicolino M, Barrett T, Golamally M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet.* 2000;25(4):406-9.
28. De Franco E, Shaw-Smith C, Flanagan SE, Edghill EL, Wolf J, Otte V, et al. Biallelic PDX1 (insulin promoter factor 1) mutations causing neonatal diabetes without exocrine pancreatic insufficiency. *Diabet Med.* 2013;30(5):e197-200.
29. Edghill EL, Bingham C, Slingerland AS, Minton JA, Noordam C, Ellard S, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 beta mutations cause neonatal diabetes and intrauterine growth retardation: support for a critical role of HNF-1beta in human pancreatic development. *Diabet Med.* 2006;23(12):1301-6.
30. Rubio-Cabezas O, Minton JA, Kantor I, Williams D, Ellard S, Hattersley AT. Homozygous mutations in NEUROD1 are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities. *Diabetes.* 2010;59(9):2326-31.
31. Lemelman MB, Letourneau L, Greeley SAW. Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management. *Clin Perinatol.* 2018;45(1):41-59.
32. Dahl A, Kumar S. Recent Advances in Neonatal Diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:355-64.
33. Pearson ER, Flechtner I, Njølstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med.* 2006;355(5):467-77.
34. Bowman P, Flanagan SE, Edghill EL, Damhuis A, Shepherd MH, Paisey R, et al. Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY. *Diabetologia.* 2012;55(1):123-7.
35. Letourneau LR, Carmody D, Wroblewski K, Denison AM, Sanyoura M, Naylor RN, et al. Diabetes Presentation in Infancy: High Risk of Diabetic Ketoacidosis. *Diabetes Care.* 2017;40(10):e147-e8.
36. Fajans SS, Bell GI. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care.* 2011;34(8):1878-84.
37. Shields B, Colclough K. Towards a systematic nationwide screening strategy for MODY. *Diabetologia.* 2017;60(4):609-12.
38. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia.* 2010;53(12):2504-8.
39. Søvik O, Irgens HU, Molnes J, Sagena JV, Bjørkhaug L, Ræder H, et al. Monogenic diabetes mellitus in Norway. *Norsk Epidemiologi.* 2013;23(1).
40. Estalella I, Rica I, Perez de Nanclares G, Bilbao JR, Vazquez JA, San Pedro JL, et al. Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(4):538-46.
41. Fendler W, Borowiec M, Baranowska-Jazwiecka A, Szadkowska A, Skala-Zamrowska E, Deja G, et al. Prevalence of monogenic diabetes amongst Polish children after a nationwide genetic screening campaign. *Diabetologia.* 2012;55(10):2631-5.
42. Tatsi C, Kanaka-Gantenbein C, Vazeou-Gerassimidi A, Chrysídis D, Delis D, Tentolouris N, et al. The spectrum of HNF1A gene mutations in Greek patients with MODY3: relative frequency and identification of seven novel germline mutations. *Pediatr Diabetes.* 2013;14(7):526-34.
43. Komazec J, Zdravkovic V, Sajic S, Jesic M, Andjelkovic M, Pavlovic S, et al. The importance of combined NGS and MLPA genetic tests for differential diagnosis of maturity onset diabetes of the young. *Endokrynol Pol.* 2019;70(1):28-36.
44. Lachance CH. Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View. *Can J Diabetes.* 2016;40(5):368-75.

45. Ilyedjian PB. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(1):27-42.
46. Matschinsky FM. Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. *Curr Diab Rep.* 2005;5(3):171-6.
47. Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat.* 2009;30(11):1512-26.
48. Gasperíková D, Tribble ND, Staník J, Hucková M, Misovicová N, van de Bunt M, et al. Identification of a novel beta-cell glucokinase (GCK) promoter mutation (-71G>C) that modulates GCK gene expression through loss of allele-specific Sp1 binding causing mild fasting hyperglycemia in humans. *Diabetes.* 2009;58(8):1929-35.
49. Rose CS, Ek J, Urhammer SA, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, et al. A -30G>A polymorphism of the beta-cell-specific glucokinase promoter associates with hyperglycemia in the general population of whites. *Diabetes.* 2005;54(10):3026-31.
50. Komazec J, Ristivojevic B, Zukic B, Zdravkovic V, Karan-Djurasevic T, Pavlovic S, et al. Analysis of the promoter regions of disease-causing genes in maturity-onset diabetes of the young patients. *Mol Biol Rep.* 2020;47(9):6759-68.
51. Matschinsky FM, Magnuson MA. Glucokinase and glycemic disease: from basics to novel therapeutics. Basel: S Karger AG; 2004. ix + 406 pp. p.
52. Sreenan SK, Cockburn BN, Baldwin AC, Ostrega DM, Levisetti M, Grupe A, et al. Adaptation to hyperglycemia enhances insulin secretion in glucokinase mutant mice. *Diabetes.* 1998;47(12):1881-8.
53. Carmody D, Naylor RN, Bell CD, Berry S, Montgomery JT, Tadie EC, et al. GCK-MODY in the US National Monogenic Diabetes Registry: frequently misdiagnosed and unnecessarily treated. *Acta Diabetol.* 2016;53(5):703-8.
54. McDonald TJ, Ellard S. Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2013;50(Pt 5):403-15.
55. Dickens LT, Letourneau LR, Sanyoura M, Greeley SAW, Philipson LH, Naylor RN. Management and pregnancy outcomes of women with GCK-MODY enrolled in the US Monogenic Diabetes Registry. *Acta Diabetol.* 2019;56(4):405-11.
56. Odom DT, Zilzisperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science.* 2004;303(5662):1378-81.
57. Haliyur R, Tong X, Sanyoura M, Shrestha S, Lindner J, Saunders DC, et al. Human islets expressing HNF1A variant have defective β cell transcriptional regulatory networks. *J Clin Invest.* 2019;129(1):246-51.
58. Yamagata K. Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J.* 2003;50(5):491-9.
59. Pontoglio M, Prié D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, et al. HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 2000;1(4):359-65.
60. Colclough K, Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Flanagan SE, Ellard S. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat.* 2013;34(5):669-85.
61. Godart F, Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Gragnoli C, Abderrahmani A, Blanché H, et al. Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (TCF1) promoter region in MODY patients. *Hum Mutat.* 2000;15(2):173-80.
62. Fang Q, Chen S, Wang Y, Jiang S, Zhang R, Hu C, et al. Functional analyses of the mutation nt-128 T→G in the hepatocyte nuclear factor-1a promoter region in Chinese diabetes pedigrees. *Diabet Med.* 2012;29(11):1456-64.
63. Vaxillaire M, Abderrahmani A, Boutin P, Bailleul B, Froguel P, Yaniv M, et al. Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *J Biol Chem.* 1999;274(50):35639-46.
64. Yamagata K, Yang Q, Yamamoto K, Iwahashi H, Miyagawa J, Okita K, et al. Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1alpha is dominant negative. *Diabetes.* 1998;47(8):1231-5.
65. Valkovicova T, Skopkova M, Stanik J, Gasperikova D. Novel insights into genetics and clinics of the HNF1A-MODY. *Endocr Regul.* 2019;53(2):110-34.
66. Gardner DS, Tai ES. Clinical features and treatment of maturity onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2012;5:101-8.
67. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(4):200-13.
68. Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT. Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet.* 2003;362(9392):1275-81.
69. Bacon S, Kyithar MP, Rizvi SR, Donnelly E, McCarthy A, Burke M, et al. Successful maintenance on sulphonylurea therapy and low diabetes complication rates in a HNF1A-MODY cohort. *Diabet Med.* 2016;33(7):976-84.
70. Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT. A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients. *Diabet Med.* 2009;26(4):437-41.
71. Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. *J Hepatol.* 2018;68(5):1033-48.
72. Kapoor RR, Locke J, Colclough K, Wales J, Conn JJ, Hattersley AT, et al. Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia and maturity-onset diabetes of the young due to heterozygous HNF4A mutations. *Diabetes.* 2008;57(6):1659-63.
73. Alvelos MI, Rodrigues M, Lobo L, Medeira A, Sousa AB, Simão C, et al. A novel mutation of the HNF1B gene associated with hypoplastic glomerulocystic kidney disease and neonatal renal failure: a case report and mutation update. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(7):e469.
74. Edghill EL, Oram RA, Owens M, Stals KL, Harries LW, Hattersley AT, et al. Hepatocyte nuclear factor-1beta gene deletions—a common cause of renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(2):627-35.
75. Clissold RL, Hamilton AJ, Hattersley AT, Ellard S, Bingham C. HNF1B-associated renal and extra-renal disease—an expanding clinical spectrum. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(2):102-12.
76. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, Collin P, Daumont M, Douillard C, et al. Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes.* 2005;54(11):3126-32.
77. El-Khairi R, Vallier L. The role of hepatocyte nuclear factor 1 β in disease and development. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18 Suppl 1:23-32.
78. Bingham C, Hattersley AT. Renal cysts and diabetes syndrome resulting from mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(11):2703-8.
79. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* 1998;12(12):1763-8.
80. Fajans SS, Bell GI, Paz VP, Below JE, Cox NJ, Martin C, et al. Obesity and hyperinsulinemia in a family with pancreatic agenesis and MODY caused by the IPF1 mutation Pro63fsX60. *Transl Res.* 2010;156(1):7-14.
81. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 1997;11(18):2323-34.

82. Moates JM, Nanda S, Cissell MA, Tsai MJ, Stein R. BETA2 activates transcription from the upstream glucokinase gene promoter in islet beta-cells and gut endocrine cells. *Diabetes*. 2003;52(2):403-8.
83. Kim JW, Seghers V, Cho JH, Kang Y, Kim S, Ryu Y, et al. Transactivation of the mouse sulfonylurea receptor I gene by BETA2/NeuroD. *Mol Endocrinol*. 2002;16(5):1097-107.
84. Marsich E, Vetere A, Di Piazza M, Tell G, Paoletti S. The PAX6 gene is activated by the basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD/BETA2. *Biochem J*. 2003;376(Pt 3):707-15.
85. Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev*. 1995;9(8):1009-19.
86. Horikawa Y, Enya M. Genetic Dissection and Clinical Features of MODY6 (NEUROD1-MODY). *Curr Diab Rep*. 2019;19(3):12.
87. Gonsorčíková L, Průhová S, Cinek O, Ek J, Pelikánová T, Jørgensen T, et al. Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in NEUROD1. *Pediatr Diabetes*. 2008;9(4 Pt 2):367-72.
88. Liu L, Furuta H, Minami A, Zheng T, Jia W, Nanjo K, et al. A novel mutation, Ser159Pro in the NeuroD1/BETA2 gene contributes to the development of diabetes in a Chinese potential MODY family. *Mol Cell Biochem*. 2007;303(1-2):115-20.
89. Kristinsson SY, Thorolfsdóttir ET, Talseth B, Steingrimsson E, Thorsson AV, Helgason T, et al. MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1alpha and a novel mutation in NeuroD1. *Diabetologia*. 2001;44(11):2098-103.
90. Perakakis N, Danassi D, Alt M, Tsaroucha E, Mehana AE, Rimmer N, et al. Human Krüppel-like factor 11 differentially regulates human insulin promoter activity in β-cells and non-β-cells via p300 and PDX1 through the regulatory sites A3 and CACCC box. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;363(1-2):20-6.
91. Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, et al. Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4807-12.
92. Fernandez-Zapico ME, van Velkinburgh JC, Gutiérrez-Aguilar R, Neve B, Froguel P, Urrutia R, et al. MODY7 gene, KLF11, is a novel p300-dependent regulator of Pdx-1 (MODY4) transcription in pancreatic islet beta cells. *J Biol Chem*. 2009;284(52):36482-90.
93. Sun Y, Qu J, Wang J, Zhao R, Wang C, Chen L, et al. Clinical and Functional Characteristics of a Novel <i>KLF11</i> Cys354Phe Variant Involved in Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Journal of Diabetes Research*. 2021;2021:7136869.
94. Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, et al. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet*. 2006;38(1):54-62.
95. Torsvik J, Johansson S, Johansen A, Ek J, Minton J, Raeder H, et al. Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (CEL) are a rare cause of monogenic diabetes. *Hum Genet*. 2010;127(1):55-64.
96. Torsvik J, Johansson BB, Dalva M, Marie M, Fjeld K, Johansson S, et al. Endocytosis of secreted carboxyl ester lipase in a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *J Biol Chem*. 2014;289(42):29097-111.
97. Johansson BB, Torsvik J, Bjørkhaug L, Vesterhus M, Ragvin A, Tjora E, et al. Diabetes and pancreatic exocrine dysfunction due to mutations in the carboxyl ester lipase gene-maturity onset diabetes of the young (CEL-MODY): a protein misfolding disease. *J Biol Chem*. 2011;286(40):34593-605.
98. Wang J, Elghazi L, Parker SE, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, et al. The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol*. 2004;266(1):178-89.
99. Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, Doi A, Furuta H, Nishi M, et al. PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2821-6.
100. Jo W, Endo M, Ishizu K, Nakamura A, Tajima T. A novel PAX4 mutation in a Japanese patient with maturity-onset diabetes of the young. *Tohoku J Exp Med*. 2011;223(2):113-8.
101. Borowiec M, Liew CW, Thompson R, Boonyasrisawat W, Hu J, Mlynarski WM, et al. Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(34):14460-5.
102. Breidbart E, Golden L, Gonzaga-Jauregui C, Deng L, Lanzano P, LeDuc C, et al. KCNJ11 Mutation in One Family is Associated with Adult-Onset Rather than Neonatal-Onset Diabetes Mellitus. *AACE Clinical Case Reports*. 2018;4(5):e411-e4.
103. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Dechaume A, Huyvaert M, Montagne L, et al. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One*. 2012;7(6):e37423.
104. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, Ludovico O, Buranasupkajorn P, Mazza T, et al. Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. *Am J Hum Genet*. 2015;97(1):177-85.
105. Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, Davis C, Dolan LM, et al. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):4055-62.
106. Ellard S, Lango Allen H, De Franco E, Flanagan SE, Hysenaj G, Colclough K, et al. Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing. *Diabetologia*. 2013;56(9):1958-63.
107. Szopa M, Ludwig-Gałęzowska A, Radkowski P, Skupień J, Zapala B, Platek T, et al. Genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young. *Pol Arch Med Wewn*. 2015;125(11):845-51.
108. Gao R, Liu Y, Gjesing AP, Hollensted M, Wan X, He S, et al. Evaluation of a target region capture sequencing platform using monogenic diabetes as a study-model. *BMC Genet*. 2014;15:13.
109. Alkorta-Aranburu G, Sukhanova M, Carmody D, Hoffman T, Wysinger L, Keller-Ramey J, et al. Improved molecular diagnosis of patients with neonatal diabetes using a combined next-generation sequencing and MS-MLPA approach. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016;29(5):523-31.
110. Riddle MC, Philipson LH, Rich SS, Carlsson A, Franks PW, Greeley SAW, et al. Monogenic Diabetes: From Genetic Insights to Population-Based Precision in Care. Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes Care*. 2020;43(12):3117-28.
111. Hattersley AT, Patel KA. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(5):769-77.

Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda

Nina Ristić¹, Tijana Išić Denčić², Radmila Janković³

¹ Služba gastroenterohepatologije, Univerzitetska dečja klinika, Beograd, Srbija

² Institut za primenu nuklearne energije - INEP, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

³ Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Kontakt: tijana@inep.co.rs

Apstrakt

Čelije imunskog sistema imaju važnu ulogu u očuvanju barijere gastrointestinalnog trakta. Savremeni način života, izloženost različitim alergenima i genetska predispozicija mogu da dovedu do narušavanja odnosa i broja ćelija imunskog sistema, čime se remeti homeostaza na nivou crevne sluznice i omogućava razvoj bolesti.

Povećanje broja eozinofilnih leukocita u sluznici i narušavanje barijere gastrointestinalnog trakta karakteristika je različitih primarnih i sekundarnih eozinofilnih gastrointestinalnih bolesti (EGIB). Usled čestog preklapanja u histološkom nalazu klinički različitih entiteta (kao što su eozinofilni ezofagitis, gastroeozofagusna refluksna bolest i eozinofilni gastroenteritis) postoji konstantna potreba za otkrivanjem novih markera diferencijacije, kao i veze između kliničkih karakteristika i patofizioloških mehanizama bolesti.

Identifikacija EGIB transkriptoma i razlučivanje imunopatogeneze različitih EGIB oboljenja omogućava identifikaciju novih molekularnih markera. Molekularno profilisanje gena specifičnih za određeno oboljenje poboljšava dijagnozu i kliničko praćenje, omogućava brz odabir adekvatnog terapijskog pristupa, kao i personalizovani medicinski pristup obolelima. Iako postoji značajan broj studija koje se bave validacijom novih lekova kod EGIB obolelih, većina njih je još uvek u vidu preliminarnih istraživanja, te je neophodna dalja verifikacija efekata ispitivanih lekova u kliničkoj praksi.

Ključne reči: eozinofilni ezofagitis, eozinofilni gastroenteritis, gastroeozofagusna refluksna bolest, molekularni markeri, dijagnoza, prognoza, terapija

Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods

Ristić Nina¹, Išić Denčić Tijana², Janković Radmila³

¹ Department of Gastroenterohepatology, University Children's Hospital, Belgrade, Serbia

² Institute for the Application of Nuclear Energy - INEP, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³ Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: tijana@inep.co.rs

Abstract

The cells of the immune system play an important role in preserving the barrier of the gastrointestinal tract. Modern lifestyle, exposure to various allergens and genetic predisposition can lead to a disruption of the relationship and the number of cells of the immune system, which disturb homeostasis at the level of the intestinal mucosa and enables the development of the disease.

An increase in the number of eosinophilic leukocytes in the mucosa and disruption of the gastrointestinal tract barrier is a characteristic of various primary and secondary eosinophilic gastrointestinal diseases (EGIB). Due to the frequent overlap in the histological findings of clinically different entities (such as eosinophilic esophagitis, gastroesophageal reflux disease and eosinophilic gastroenteritis), there is a constant need to discover new markers of differentiation, as well as the relationship between clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of the disease.

Identification of EGIB transcriptoma and differentiation of immunopathogenesis of different EGIB diseases enables identification of new molecular markers. Molecular profiling of disease-specific genes improves diagnosis and clinical monitoring, enables rapid selection of an adequate therapeutic approach, as well as a personalized medical approach to patients. Although there are a significant number of studies regarding the validation of new drugs in EGIB patients, most of them are still in the form of preliminary research, and further verification of the effects of the tested drugs in clinical practice is necessary.

Key words: eosinophilic esophagitis, eosinophilic gastroenteritis, gastroesophageal reflux disease, molecular markers, diagnosis, prognosis, therapy

EOZINOFILNI LEUKOCITI - POREKLO, DIFERENCIJACIJA I MORFOLOGIJA

Eozinofilni leukociti (eozinofili, Eo) su ćelije imunskog sistema koje se kontinuirano stvaraju u kostnoj srži iz pluripotentne CD34+ stem ćelije. Kontrola stvaranja Eo regulisana je transkripcionim faktorima koje stvaraju same ćelije u toku razvoja i citokina koje produkuju ostale ćelije imunskog sistema. Rana faza diferencijacije odvija se pod kontrolom IL33, a zavisni su na ćelijskom nivou od nekoliko transkripcionih faktora, pri čemu se smatra da GATA1 ima ključnu ulogu.

Zreli Eo se odlikuju bilobarnim jedrom i prisustvom specifičnih sekretornih citoplazmatskih granula koje se eozinom boje crveno. Velike granule bez jezgra se smatraju „nezrelim“, dok su male granule povezane sa sekretornom aktivnošću. Granule u Eo sadrže preformirane biološki aktivne supstance - citotoksične katjonske proteine, citokine, faktore rasta, hemokine i enzime. Pored sekretornih granula, za Eo je karakteristično prisustvo lipidnih telašaca ispunjenih lipidnim medijatorima zapaljenja (listenil leukotrijeni, tromboksani i prostanglandini), kao i plejotropnih tubulovezikularnih nosača (eozinofilnih „sombrero“ nosača). Eo, poput drugih somatskih ćelija, poseduju mitohondrije, endoplazmatski retikulum i Goldžijev aparat. Takođe, Eo na površini ćelije poseduju mnoštvo molekula (adhezioni moklukli, citokini, hemokini, faktori rasta, lipidni medijitori, *pattern recognition receptors* (PRR), Fc receptorii) zahvaljujući kojima mogu da učestvuju u velikom broju fizioloških i patofizioloških procesa [1,2].

EOZINOFILNI LEUKOCITI – FUNKCIJE I ULOGA U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU

Funkcije Eo mogu biti klasifikovane u četiri kategorije: terminalne efektorske funkcije, održavanje homeostaze i podrška u reparaciji i remodelovanju tkiva, imunomodulatorna uloga i kooperativne interakcije sa drugim ćelijama imunskog sistema. U većini situacija patoloških procesa preovladava parcijalna degranulacija (PD) ili citoliza Eo praćena degranulacijom celih granula. PD je brza i visokoselektivna i najčešće se na ovaj način iz Eo sekretuju citokini. Ovo je najčešći tip sekrecije u zapaljenju i alergiji kod ljudi. Citoliza Eo predstavlja regulisanu brzu ćelijsku smrt, drugačiju od apoptoze i nekroze, a koju karakteriše dekondenzacija hromatina, razgradnja jedarne i ćelijske membrane, kao i razgradnja specifičnih granula [1].

Zreli Eo dospevaju u cirkulaciju putem koji u toku kasne faze embrionalnog razvoja dospevaju u gastrointestinalni trakt [1,2]. Interleukin IL5 i faktor rasta GM-CSF stimulišu migraciju Eo iz kostne srži u cirkulaciju. Migracija Eo u gastrointestinalni trakt je složena i odvija se kroz nekoliko procesa: vezivanje, kotrljanje, athezija i transendotelna migracija, praćena polarizacijom i ameboidnim kretanjem u intersticijum. U lamini propriji intestinalne sluznice dolazi do vezivanja molekula $\alpha_4\beta_7$ i $\alpha_4\beta_1$ na površini Eo za endotelne adhezione molekule MADCAM1 i VCAM1, što se smatra izuzetno važnim. Interakcija $\alpha_L\beta_2$ i $\alpha_M\beta_2$ sa ICAM1 je značajna za prolazak kroz kapilare. Za dalju migraciju Eo u lamenu propriju značajna je interakcija CCR3 receptora na njihovoj membrani i hemokina eotaksin-1. Drugi hemokini poput eotaksin-2 i eotaksin-3 takođe doprinose u hemotaksi [1].

Eo lamine proprije konstantno prate i moduliraju kompleksan imunski odgovor i tkivno remodelovanje duž celog gastrointestinalnog trakta. Za razliku od cirkulišućih Eo, Eo unutar lamine proprije gastrointestinalnog trakta su permanentno aktivni. Oni učestvuju u održanju barijere gastrointestinalnog trakta, obezbeđuju imunitet na patogene u lumenu creva, interaguju sa enteričkim nervnim sistemom i povezuju urođeni i stečeni imunitet [3].

Eo se u fiziološkim uslovima nalaze u malom broju u lamini propriji želuca i njihov broj se postepeno povećava ka distalnim delovima gastrointestinalnog trakta sa maksimumom u lamini propriji ileocekalne regije i proksimalnom kolonu i značajnim opadanjem ka rektumu. Za razliku od pomenutih delova gastrointestinalnog trakta, prisustvo Eo u sluznici jednjaka je isključivo patološki fenomen, posebno u dečjem uzrastu. Eozinofilne gastrointestinalne bolesti (EGIB) su grupa poremećaja koje karakteriše patološka eozinofilna infiltracija jednjaka, želuca, tankog creva i/ili debeleg creva koja dovodi do disfunkcije organa i kliničkih simptoma [4]. Eozinofilija sluznice različitih segmenata digestivnog trakta se može javiti kao sekundarni fenomen kod različitih infekcija (gljivičnih, parazitarnih i virusnih), gastroezofagusne refluksne bolesti (GERB), ahalazije, hipereozinofilnog sindroma, hipersenzitivne reakcije na lekove, vaskulitisa, pemfigoidea, bolesti vezivnog tkiva i *graft-versus-host* bolesti, ali i kao primarna bolest. Primarne EGIB (PEGIB) uključuju eozinofilni ezofagit (EoE) i eozinofilni gastroenteritis (EGE). EGE obuhvata poremećaje poput eozinofilnog gastritisa, eozinofilnog enteritisa i eozinofilnog kolitisa [5]. Posebno je značajan odnos GERBa i EoE, dve najčešće bolesti jednjaka kod dece. Iako su različiti klinički entiteti, oni se međusobno ne isključuju i mogu da postoje istovremeno sa ili bez međusobne interakcije.

Usled čestog preklapanja u histološkom nalazu klinički različitih bolesti, postoji konstantna potreba za otkrivanjem novih markera diferencijacije, kao i veze između kliničkih karakteristika i patofizioloških mehanizama bolesti. Cilj ovoga rada je da sumira dosadašnje rezultate o patofiziološkoj ulozi eozinofilnih leukocita kod EGIB pacijenata, objasni najnovije metodološke pristupe i prikaže najnovija saznanja vezana za primenu molekularnobioloških markera koji bi bili od koristi prilikom analize biopsija jednjaka sa izraženom eozinofilijom.

EOZINOFILNI EZOFAGITIS

Eozinofilni ezofagititis (EoE) je hronična inflamatorna bolest jednjaka, prvi put opisana 1977. godine [6]. Kao poseban kliničko-patološki entitet je definisan 1993. i 1994. godine [7,8]. Danas je EoE drugi najčešći uzrok hroničnog ezofagitisa posle GERBa, kao i glavni uzrok disfagije i zaglavljena (impakcije) hrane u jednjaku kod dece i mlađih odraslih osoba. Prema smernicama iz 2017. godine, EoE je definisan kao hronična lokalizovana imunoposredovana bolest jednjaka, koja se klinički ispoljava simptomima poremećaja funkcije jednjaka, a histološki inflamacijom jednjaka [9]. U cilju postavljanja dijagnoze potrebno je da se isključe drugi uzroci eozinofilije jednjaka. EoE je povezan sa atopijom, naslednim faktorima i sa faktorima sredine u ranom dobu. Za ovo oboljenje postoji izražena predispozicija muškog pola i u pedijatrijskom i u adultnom dobu.

Patofiziološki mehanizam u EoE još uvek nije shvaćen u potpunosti. Početak EoE je udružen sa Th2-posredovanom inflamacijom i lokalnom ekspresijom tipa 2 citokina IL4, IL5 IL13 i hemoatraktanata kao što je eotaksin-3 (CCL26). Sekrecija tipa 2 citokina (uključujući IL5 i IL13) dovodi do deponovanja kolagena, epitelne hiperplazije i remodelovanja tkiva jednjaka u EoE. Remodelovanje tkiva jednjaka može nastati dejstvom TGF- β koji dovodi do ekspresije profibrotičnih elemenata fibronektina i kolagena [2]. U progresiji EoE ulogu mogu da imaju različiti medijatori, kao što su IL25, IL33 i timični stromalni limfopoietin (TSLP) koga oslobađaju epitelne ćelije usled oštećenja ili u stresu. Međutim, za sada nije nađena jasna veza između ovih medijatora i težine EoE. U pedijatrijskim pacijenata tkivna ekspresija IL33 je direktno proporcionalna nivoima IL5, IL3 i CCL26/eotaksin-3 [10].

Klinička prezentacija EoE je dobno zavisna. Kod odojčadi i male dece javljaju se nespecifični simptomi poput refleksnih simptoma, a kod starijih od 10 godina disfagija i impakcija hrane. Dijagnostička metoda izbora su serijske biopsije jednjaka tokom proksimalne gastrointestinalne endoskopije [9]. Preporučeno je da se uzima najmanje 6 uzoraka sa najmanje dve različite lokalizacije u jednjaku, obično iz distalne i proksimalne polovine jednjaka. Endoskopski znaci koji mogu (ali ne uvek) da se nađu kod pacijenata sa EoE su: edem sluznice, fragilnost sluznice, longitudinalne brazde, koncentrični prstenovi, beličasti plakovi, kao i prisustvo stenoze jednjaka ili jednjaka uskog kalibra. Za postavljanje dijagnoze EoE neophodna je kliničko-patološka korelacija.

U histopatološkom nalazu u EoE dominira infiltracija skvamoznog eptela sluznice jednjaka velikim brojem Eo - više od 15 po velikom polju mikroskopskog uvećanja ($x400$ - high power field, HPF). Eo se dominantno nalaze u gornjoj polovini epitela u uzorcima iz različitih segmenata jednjaka. Takođe, karakteristično je prisustvo eozinofilnih mikroapscesa (grupica od ≥ 4 Eo) koji se nalaze u superficialnom sloju skvamoznog epitela. Degranulacija eozinofilnih leukocita je obično lako uočljiva [11]. Promene postoje i na nivou lamine proprije gde se takođe nalazi eozinofilni infiltrat, a posle dužeg vremenskog perioda moguća je pojava fibroze. Učestalost dijagnostikovanja fibroze lamine proprije u EoE korelira sa brojem biopsijskih uzoraka [12].

U terapijske opcije za EoE od 2017. godine spadaju: inhibitori protonske pumpe (IPP), topikalni steroidi i eliminacione dijete [9]. Fibrostenotične komplikacije rešavaju se endoskopskom dilatacijom jednjaka. Kasno postavljanje dijagnoze i/ili neadekvatno lečenje određuje prevalenciju fibroznih komplikacija (od 46,5% ukoliko se sa dijagnozom zakisni 2 godine do 87,5% kod kašnjenja od preko 20 godina) [13]. Takođe, dijametar jednjaka je u značajnoj negativnoj korelaciji sa dijagnostičkim kašnjenjem. Starost pacijenta je u pozitivnoj korelaciji sa količinom subepitelnih depozita kolagena, kao i sa verovatnoćom za razvoj fibrostenotične forme bolesti [9]. Prema tome, prirodni tok EoE karakteriše progresija od inflamatornog ka fibrostenotičnom fenotipu. Nekoliko studija je pokazalo da kortikosterodi i eliminaciona dijeta imaju sposobnost da preinake remodelovanje jednjaka kod dece, kao i da spreče stvaranje stenoza, reverzijom epitelne mezenhimalne tranzicije [14,15].

Molekularni markeri eozinofilnog ezofagitisa

Kombinacijom različitih pristupa do sada je utvrđen značajan broj markera (proteinskih, DNK i RNK) koji bi bili od velike pomoći za identifikaciju EoE, kao i za odabir najpodesnije terapije. Dodatno, utvrđeno je da je IL13 jedan od glavnih specifičnih faktora koji indukuje razvoj EoE: tokom aktivne faze bolesti kod ljudi IL13 se eksprimira 16 puta više nego u zdravom tkivu, u *ex vivo* eksperimentima IL13 može indukovati transkript karakterističan za EoE [16], prekomerna ekspresija IL13 kod miša indukuje bolest sa molekularnim karakteristikama humanog EoE [17], intra-trachealna aplikacija IL13 indukuje dozno-zavisni EoE [18], ceo proces razvoja EoE može da se zaustavi aplikovanjem IL13 antitela [19]. Zbog svega navedenog, mnoga istraživanja baziraju se na analizi transkriptoma indukovanih aplikacijom IL13. EoE transkriptom podrazumeva seriju kodirajućih i nekodirajućih RNK molekula. Kodirajuća RNK je osnova za sintezu proteina koji mogu da se koriste kao prediktivni faktori i markeri diferencijalne dijagnoze.

Eotaksin-3 (eotaxin-3) je jedan od prvootkrivenih proteina prekomerno eksprimiranih kod EoE pacijenata. Osnovna uloga ovog proteina kodiranog CCL26 genom, jeste da privlači Eo. Istraživanja su pokazala da je nivo CCL26 iRNK izolovane iz parafinskih kalupa EoE pacijenata znatno viši od nivoa ove iRNK kod GERD pacijenata [20]. Primenom kandidat-gen pristupa, identifikovan je polimorfizam (single-gene polymorphism, SNP) u 3'-nekodirajućem delu ovog gena koji značajno utiče na produkciju iRNK, čime se dodatno povećava produkcija eotaksina-3. Štaviše, EoE pacijenti

koji su imali visok nivo eotaksina-3, slabije su reagovali na prepisanu terapiju i češće su imali relaps bolesti. Kod dece sa ezofagusnom eozinofilijom, primenom IPP došlo je do smanjenja nivoa eotaksina-3 u proksimalnim delovima jednjaka, ali ne i u distalnim [21].

ALOX15 je enzim koji reguliše odgovor ćelije na oksidativni stres i inflamaciju, a time je uključen u patogenezu raznih humanih oboljenja [22]. S obzirom da je ALOX15 efikasan supresor inflamacije [23], više studija pokazalo je visoku ekspresiju ALOX15 na iRNK i proteinskom nivou kod obolelih od EoE [24]. Međutim, i subpopulacija GERB pacijenata sa >5 Eo/HPF takođe eksprimira ALOX15 [25].

GWAS studija, koja je obuhvatala oko 2.5 miliona genetičkih varijanti u 736 individua sa EoE, identifikovala je **CAPN14** gen koji se specifično eksprimira u ezofagusu, i to u skladu sa aktivacijom EoE oboljenja [26]. **CAPN14** gen kodira protein **kalpain**, klasičnu kalcijum-zavisnu proteazu koja pripada proteolitičkim sistemima. Istraživanja su pokazala da pod uticajem IL13 u kulturi ezofagusnih epitelnih ćelija dolazi do povećane produkcije kalpaina, i na iRNK i na proteinskom nivou [27]. Sa druge strane, epitel sa utišanim **CAPN14** genom ima 5,5 puta veće međućelijske razmake i lošije organizovanu bazalnu laminu, a proces je takođe regulisan dejstvom IL13 [27]. Pad ekspresije ili gubitak funkcije proteina koji učestvuju u izgradnji basalne membrane vodi povećanju permeabilnosti membrane i sklonosti takvih osoba da razviju razne autoimune bolesti.

Desmoglein 1 (DSG1) je protein čija ekspresija opada u skladu sa pojavom aktivnog EoE, a jedan je od ključnih faktora za održavanje homeostaze epidermalne barijere. Naime, DSG1 pripada familiji dezmozomalnih kadherina sa osnovnom ulogom u održavanju tesnih veza između ćelija epitela. Pad ekspresije i utišavanje ovog gena slabi integritet ćelijske barijere, uzrokuje razdvajanje ćelija, a posledično utiče i na ekspresiju filagrina i drugih epitelnih kadherina [28]. S obzirom da IL13 snažno inhibira produkciju DSG1, moguće je da DSG1 propagira alergijsku ezofagusnu inflamaciju [29], odnosno gubitak DSG1 omogućava povećanu permeabilnost membrane, a time i propagaciju lokalnog inflamatornog procesa, što uključuje preosetljivost na kiselinu i povećano preuzimanje antiga u jednjaku.

Filagrin još jedan od proteina koji učestvuju u izgradnji epidermalne barijere, a čija ekspresija opada u mukozi jednjaka EoE pacijenata [30]. Pad ekspresije ili gubitak njegove funkcije vodi povećanju permeabilnosti membrane i sklonosti pacijenata atopijskim kožnim reakcijama [30]. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je filagrin negativno regulisan od strane IL13 i da je rizik nastanka EoE povećan kod osoba koje su nosioci varijante 2282del4 u genu za filagrin [30].

Receptori označeni kao „**toll-like receptors**“ (TLRs) jesu transmembranski receptori ćelija intestinuma i basalne lamine koji odgovaraju na signale poreklom od mikrobiota i služe za razlikovanje patogenih mikroorganizama od komensalnih bakterija. Sve je više dokaza da postoje promene u mikrobioti jednjaka kod EoE pacijenata, odnosno da su TLRs jedni od glavnih tačaka komunikacije između bakterija i mukoznog imunološkog sistema. Preliminarni rezultati pokazuju pozitivan uticaj dijete na regulaciju nivoa TLRs. Takođe, utvrđeno je da je TLR3 polimorfizam u genu za TLR povezan sa pojavom senzitivnosti na aerozagađenje i alergijom na hranu kod EoE pacijenata [31]. Primarne ćelije jednjaka produkuju citokin TSLP kao odgovor na signal prenet putem TLR3 receptora [31].

TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) jako stimuliše Th2 alergijski imuni odgovor, što ga čini glavnim okidačem atopijske inflamacije i tkivnog remodelovanja. TSLP iRNK kod pacijenata sa aktivnim EoE je povišen u odnosu na kontrolu [32,33]. Štaviše, utvrđeno je da je jedna varijanta gena koja kodira receptor za TSLP (*Cytokine Receptor-like Factor 2, CRLF-2*) takođe asocirana sa pojавom EoE kod muškaraca [33]. Novije terapijske strategije koje se baziraju na regulaciji ekspresije TSLP za sada daju dobre rezultate [32].

Fibrostenotične komplikacije nastaju procesom remodelovanja ekstraćelijskog matriksa, koji je uzrokovan dejstvom matriksnih proteinaza, prisustvom periostina u većoj količini, kao i procesom koji je povezan sa produkcijom TGF-β u eozinofilima. **Periostin** je protein ekstraćelijskog matriksa koji reguliše eozinofiliju (utiče na privlačenje eozinofila na mesto inflamacije i njihovu adheziju za epitel) i učestvuje u remodelovanju tkiva [34]. Jedan od glavnih puteva razvoja EoE indukovanih aplikacijom IL13 jeste upravo preko produkcije periostina [34]. Eozinofili koji se nakupljaju kod obolelih od EoE izvor su **TGF-β** koji utiče na rast epitelnih ćelija, razvoj fibroze i na remodelovanje [35]. Nivo TGF-β koreliše sa stepenom fibroze kod EoE pacijenata [36]. Prisustvo varijante u promotorskom delu gena za TGF-β asociran je sa povećanim bojem Eo u jednjaku i uzrok je odsustva reakcije na terapiju kortikosteroidima [37]. **Matriksne metaloproteinaze (MMP)** su enzimi koji putem razlaganja želatina i kolagena remodeluju ekstraćelijski matriks, a takođe mogu aktivirati i druge MMP ili faktore rasta kao što je TGF-β [38]. S obzirom na njihovu ulogu, promena ekspresije MMP najviše je izučavana kod različitih tumora, pogotovo prilikom nastanka i razvoja malignih tumora epitelnog porekla [39,40] što uključuje i karcinome jednjaka [41,42]. Do sada, postoje samo dve studije koje su ispitivale promenu ekspresije MMP kod obolelih od EoE [43,44]. Prva studija bazirala se na analizi tkivne ekspresije MMP. Utvrđena je povišena ekspresija MMP-2 i MMP-14 kod dece obolele od EoE koja može da se reguliše topikalnom aplikacijom kortikosteroidnih lekova i pokazala je da se pod uticajem TGF-β povećava produkcija MMP-2 *in vitro* [43]. Druga studija, analizirala je promenu ekspresije više biomarkera izolovanih iz seruma i urina (uključujući i MMP-9) radi validacije neinvazivnog diagnostikovanja EoE kod dece i predikcije efekata terapije [44]. Po rezultatima njihove studije

utvrđeni panel markera izolovanih iz plazme zajedno sa brojem eozinofila najpodesnija je opcija za identifikaciju EoE i predikciju terapijskog odgovora.

Kao što je već pomenuto, EoE transkriptom sadrži i seriju nekodirajućih RNK molekula, što uključuje mikroRNK i duge-nekodirajuće RNK, molekule sa osnovnom ulogom u regulaciji transkripcije i translacije [45,46].

Duge nekodirajuće RNK (*long non-coding RNA*) (dnRNK) jesu klasa RNK molekula, dužine preko 200 nukleotida, koje ne kodiraju proteine već regulišu ekspresiju pratećih gena. Do danas je otkriven veliki broj dnRNK koje se povezuju sa nastankom i progresijom raznih obolenja. Duga nekodirajuća RNK koju aktivira BRAF somatska mutacija (BRAF-activated lncRNA, BANCR), prvi put je identifikovana 2012. godine metodom sekvenciranja i definisana je kao 693 bazna para dug transkript od četiri egzona kodiranih na 9. hromozomu koji se aktivira usled prisustva BRAFV600E mutacije, a utiče na redukciju migracije ćelija melanoma [47]. Nakon inicijalnog ispitivanja, objavljeno je više radova koji ukazuju na izmenjenu ekspresiju BANCR, prvenstveno u različitim karcinomima epitelnog porekla [48,49]. Na osnovu jedne preliminarne studije, nivo BANCR je povećan u tkivu jednjaka EoE pacijenata u odnosu na zdrave kontrole i na GERB pacijente [45]. Ista grupa je pokazala da nivo BANCR utiče i na nivo IL13-indukovanih gena koji promovišu inflamaciju, kao i da nivo ekspresije BANCR koreliše sa nivoom iRNK za ALOX15 protein.

MikroRNK (miR) jesu male nekodirajuće RNK, dužine 19-25 nukleotida, koje predstavljaju glavne regulatore ekspresije asociranih gena [46]. Osnovni mehanizam njihovog dejstva je putem RNK interferencije na posttranskripcionom nivou, koja vodi degradaciji ciljane iRNK, i posledično inhibira translaciju. MiR učestvuju u regulaciji velikog broja fizioloških i patoloških procesa koji uključuju rast i razvoj, odgovor na stres i inflamaciju. Takođe, miR su potentni modulatori inflamatornih signalnih puteva i neophodne su za održavanje homeostaze intestinalnog trakta. U telu siseara postoji nekoliko stotina miR, a jedna miR može da reguliše više iRNK, isto kao što jedna iRNK može da bude regulisana od strane više miR. Karakterizacija miR i njihovih ciljanih iRNK jesu danas jedna od najintenzivnije izučavanih tema. Promene u **ezofagusnoj miR** ekspresiji primećene su i kod EoE pacijenata. Primenom kvantitativne RT-PCR metode (qRT-PCR) utvrđeno je da kod pedijatrijskih EoE pacijenata postoji porast ekspresije 21 miR i pad ekspresije 11 miR, pri čemu su miR-21 i miR-223 bile najjače tkivno eksprimirane miR kod EoE pacijenata [50]. Naime, miR-21 stimuliše Th2-asociranu hipersenzitivnost putem inhibiranja iRNK za IL12p35 u dendritičnim ćelijama, sposobna je da samostalno indukuje EoE kod miševa, a nivo miR-21 u korelaciji je sa brojem eozinofila, kao i nivoima ključnih faktora EoE transkriptoma (eotaksin-3, periostin) [51]. Suprotno tome, produkcija miR-375 je redukovana u ezofagusnim epitelnim ćelijama EoE pacijenata [50], a utiče na IL13 indukovano auto-inflamaciju [52]. Povratak miR-21, miR-223 i miR-375 na normalne vrednosti utvrđen je kod EoE obolelih koji su reagovali na terapiju kortikosteroidima [53]. Do sada, utvrđen je tkivni porast i miR-214, miR-146b-5b, miR-146a, miR-145, miR-142-3p, miR-21, miR-203 kod EoE pacijenata [54]. Nedavno je pokazano da miR-146a selektivno suprimira Th1 ćelijski imuni odgovor [55], dok se za miR-203 zna da smanjuje proliferaciju epitelnih ćelija, a pospešuje njihovu diferencijaciju [56], što delimično objašnjava uzrok nastanka hiperplazije kod EoE pacijenata. Zajedno, ova saznanja sugerisu model u kome sinergističkim delovanjem više različitih miR dolazi do polarizacije Th odgovora od Th0 ka Th2, i do razvoja patohistološke slike karakteristične za EoE. Promena ekspresije pokazana je i za mnoge druge miR (npr. miR-223, miR-27, miR-7, miR-29b, miR-642....), ali još uvek se ne zna mnogo o posledicama njihove izmenjene ekspresije.

Pored tkivnih, otkriveno je da postoje i **cirkulišuće miR** kod EoE pacijenata, koje mogu da se koriste kao potencijalni neinvazivni biomarkeri. Iako još uvek nije od kliničkog značaja, preliminarni rezultati su pokazali da bi nivoi nekih cirkulišućih miR (miR-146a, miR-146b, miR-223) mogli da se koriste za identifikaciju EoE pacijenata [50]. Dodatno, pokazano je da su se u periodu EoE remisije nivoi miR-146a i miR-223 vratili na bazalne vrednosti, dok je nivo cirkulišuće miR-146b i u remisiji zadržao visoke vrednosti [50]. Identifikovan je set od 4 miR koji mogu da budu izolovani iz pljuvačke (miR-570-3p, miR-3613-5p, miR-4668-5p i miR-30a-5p), a sposobnih da razlikuju EoE uzorce od kontrola [57]. Ekspresija miR-3613-5p i miR-4668-5p opala je u pljuvački EoE pacijenata koji su reagovali na kortikosteroidnu terapiju (fluticasone). Nedavno, ista grupa je *in-silico* analizom pokušala da predvidi funkciju miR-4668-5p i pokazalo se da ova miR targetuje gene koji su uključeni u signalizaciju koja se prenosi preko TFG-β i gena koji su uključeni u održavanje homeostaze epitelne barijere [58].

Smatra se da eliminaciona dijeta utiče na adaptivni imunitet, verovatno putem supresije antigenom-indukovanog T ćelijskog odgovora. Sa druge strane, anti-inflamatorni lekovi u značajnom broju slučajeva nisu efikasni, ili, veoma često uprkos tome što tkivo histološki pokazuje znakove izlečenja, ostaje abnormalna ekspresija gena koji regulišu epitelnu diferencijaciju, što daje osnovu za razvoj bolesti i/ili njen relaps. Zapravo, standardnim metodama, veoma često vidimo razliku između kliničkih simptoma i patohistološkog nalaza, što znači da pacijenti mogu i dalje osećati simptome bolesti uprkos tome što je histopatološki nalaz isti kao kod zdravog tkiva, i obrnuto. Identifikacija EoE transkriptoma i razlučivanje EoE imunopatogeneze omogućava razvoj lekova koji bi delovali ciljano na mesto „greške“. Npr. aplikacijom antitela na IL13 (QAX576) ili IL5 (mepolizumab, reslizumab) redukuje se broj eozinofila u jednjaku, doduše ne tako intezivno kao primenom dijete i glukokortikoida, ali bez neželjenih efekata standardnih terapija [59].

Analizom EoE transkriptoma, pokazano je da aplikacijom IL13 antitela kod EoE pacijenata dolazi do poboljšanja strukture i funkcije bazalne membrane, kao i smanjenja inflamacije [59]. Iako su potrebna dodatna istraživanja, obećavajuće rezultate daje lek poznat kao CRTH2 koji je zapravo molekul koji inhibira eozinofile i istovremeno je hemoatraktant Th2 ćelija [60]. Takođe, postoje i inhibitori za TSLP (AMG157), eotaksin-3 (bertilimumab), inhibitori receptora za IL4 i IL13 (duplibumab), kao i mnogi drugi lektini koji liče na imunoglobuline [61].

GASTROEZOFAGUSNA REFLUKSNA BOLEST

Gastroezofagusni refluks, tj. nevoljno vraćanje želučačnog sadržaja u jednjak, je fiziološka pojava koja se javlja više puta dnevno kod svake bebe, deteta, i odraslog čoveka, posebno nakon obroka [62]. Gastroezofagusna refluksna bolest (GERB) je gastroezofagusni refluks koji uzrokuje značajne simptome i/ili komplikacije. Refluksni ezofagitis je definisan makroskopski vidljivim lezijama sluznice jednjaka, i najčešće je posledica kiselog refluksa [63]. GERB se često dijagnostikuje kod odojčadi i dece na osnovu simptoma. Najčešći simptomi GERBa kod odojčadi su regurgitacija sa ili bez povraćanja i uznemirenost, a kod dece i adolescenata gorušica, regurgitacija i epigastrični bol. Disfagija i odinofagija mogu biti simptomi refluksnog ezofagitisa, ali se češće viđaju kod eozinofilnog ezofagitisa, ahalazije i striktura jednjaka. Koriste se mnogi dijagnostički testovi: upitnici, empirički dijagnostički test sa inhibitorima protonske pumpe, pH monitoring, pH-MII (multikanalna intraluminalna impedansa) monitoring, ezofagogastroduodenoskopija (EGDS), pasaž jednjaka i gastroduodenuma, manometrija jednjaka itd. Na osnovu endoskopskog nalaza GERB se deli na refluksni ezofagitis (RE) i ne-erozivnu refluksnu bolest (NERB). Učestalost RE kod dece kreće se od 12,4%-34,6% i raste sa uzrastom [64,65]. Histopatološki RE odlikuje basalna hiperplazija koja čini više od 15% debljine skvamoznog epitela. Međućelijski prostori u skvamoznom epitelu su prošireni. Vaskularne papile su elongirane i dosežu do gornje polovine debljine epitela. Unutar epitela se nalazi inflamatorni infiltrat dominantno sačinjen od Eo. Broj Eo varira i često nije veliki, najčešće je manji od 15/HPF (7/HPF). U slučaju kada je broj Eo veći od 15/HPF, glavna diferencijalna dijagnoza je EoE. Za razliku od EoE, inflamatorni infiltrat u RE se dominantno nalazi u basalnoj polovini epitela. Takođe je povećan broj intraepitelnih T limfocita, a često se nalaze i neutrofili. U epitelu se mogu videti i balonirane ćelije (uvećane epitelne ćelije sa svetlom citoplazmom) [11]. Histološki nalaz refluks karditisa u biopsiji gastroezofagusnog prelaza može pomoći u diferencijalnoj dijagnozi u odnosu na EoE. Iako pojedini autori dovode u pitanje postojanje kardijačnog tipa sluznice kao normalne histološke varijante, analizom autopsijskog materijala je pokazano da ovaj tip sluznice postoji nezavisno od GERB [66]. Histopatološki nalaz u ezofagitisu sa dominantno eozinofilnim infiltratom nije dovoljno specifičan. U Tabeli 1 su prikazane histopatološke karakteristike u EoE, GERB i EGE. Svakako, za definitivnu dijagnozu, praćenje bolesti i efekta terapije neophodna je kliničko-patološka korelacija [11].

Lečenje GERBa kod odojčadi i dece može biti ne-farmakološko, farmakološko i hirurško. Antisekretorna terapija (inhibitori protonske pumpe, H2 blokatori) je terapija izbora kod dece i adolescenata sa GERBom i retko je indikovana kod odojčadi [63].

HP karakteristika/oboljenje	EoE	GERB	EGE
Bazalna hiperplazija (>15% debljine skvamoznog epitela)	Prisutna, obično izražena	Prisutna, obično laka	Moguća
Povećan međućelijski prostor u skvamoznom epitelu sluznice jednjaka	Moguć	Moguć	Moguć
Elongacija vaskularnih papila (>2/3 debljine skvamoznog epitela)	Prisutna	Prisutna	Moguća
Distribucija eozinofilnih leukocita duž jednjaka	U svim segmentima jednjaka	U distalnoj trećini jednjaka	U svim segmentima jednjaka
Prisustvo eozinofilnih leukocita u različitim segmentima gastrointestinalnog trakta	Samo u jednjaku	Samo u jednjaku	Moguća u svim segmentima gastrointestinalnog trakta
Gustina eozinofilnih leukocita u sluznici jednjaka	≥15/HPF, prema definiciji	Najčešće ≥15/HPF, ali može biti i veći	Varijabilna
Ezinofilni mikroapscesi (klasteri ≥4 ezinofilnih leukocita) u sluznici jednjaka	Često	Retko	Retko
Degranulacija eozinofilnih leukocita	Često	Retko	Varijabilno
Superficialna lokalizacija ezinofilnih leukocita	Često	Retko	Moguća
Fibroza lamine proprie sluznice jednjaka	Često	Retko	Ne

Tabela 1. Histopatološke karakteristike najčešćih eozinofilnih bolesti jednjaka

Molekularni markeri gastroezofagusne refluksne bolesti

Potraga za markerima koji bi bili od koristi prilikom dijagnostikovanja **GERBa** nije bila toliko obimna kao za EoE, a većina dosadašnjih istraživanja bazira se na upotrebljivosti imunohistohemijskih markera prilikom identifikacije GERBa.

Proteinazom aktivirani receptor 2 (*Proteinase-activated Receptor-2*, PAR-2), receptor koji aktivacijom indukuje proinflamatorne i neuroinflamatorne efekte, pokazao se kao dobar marker za identifikaciju RE i NERB, odnosno visoka ekspresija PAR2 asocira sa hiperplazijom basalne membrane i povećanjem broja inflamatornih ćelija [67]. Takođe, ustanovaljeno je da aktivacija PAR2 vodi ka povećanoj produkciji IL8 i na taj način doprinosi inflamaciji i razaranju mukoze jednjaka [68].

TRPV1 (*Capsaicin-sensitive Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1*) i **PGP9.5** (*Protein Gene Product 9.5*) jesu markeri hipersenzitivnosti. Utvrđeno je da dužina izlaganja ćelija kiselini koreliše sa povećanom produkcijom TRPV1 i PGP9.5 [69], dok je odsustvo reakcije na IPP tretman povezan sa nedostatkom PGP9.5 [70].

Animalni i *in vitro* modeli GERBa pokazali su da postoje promene u ekspresiji i lokalizaciji **klaudin-3 i -4** [71], proteina bitnih za stvaranje i održavanje tesnih veza („*tight junctions*“) među ćelijama epitela. Međutim, iako je i kod ljudi obolelih od GERBa uočena promena u ekspresiji klaudin-1,-2 i -4, ZO-1, filagrina i okludina, izmenjeni nivoi ekspresije pomenutih markera nisu korelisali sa povećanjem interćelijskog prostora, kao ni sa hiperplazijom basalne membrane [72]. U studiji koja je obuhvatila 95 GERB pacijenata, pokazana je znatno povećana ekspresija seta gena uključenih u formiranje dezmozoma između ćelija basalne membrane, što može da bude značajno prilikom identifikacije oštećenja mukoze [73]. Neka novija ispitivanja, koja preliminarno daju obećavajuće rezultate, baziraju se na ispitivanju aktivacije **TREM-1 receptora** [74] kao markera dijagnoze i potencijalnih targeta terapije.

Gastrin 17 (G-17) je predložen kao neinvazivni marker GERBa, s obzirom na njegovu negativnu spregu sa pojavom kiseline i produkcijom hormona. S obzirom na razlike u nivou G-17 kod kiselog i nekiselog refluksa [75] razvijen je i ELISA detekcioni kit [GastroPanel® Gastrin-17] uz pomoć koga je moguća verifikacija gastrina-17 kao ne-invazivnog serumskog markera GERBa kod simptomatskih i asimptomatskih pacijenata.

Uloga i upotrebljivost navedenih, kao i identifikacija novih markera GERBa se nastavlja i neophodna su dalja istraživanja.

Diferencijalna dijagnostika gastroezofagusne refluksne bolesti i eozinofilnog ezofagitisa

Interakcija između GERBa i EoE je dvosmerna i složena [9]. GERB može da dovede do oštećenja sluznice jednjaka što rezultira blagom eozinofilnom infiltracijom sluznice. GERB i EoE mogu da koegzistiraju, ali da ne budu povezani. EoE može da bude uzrok GERBa ili da mu doprinosi. Takođe, GERB može da uzrokuje EoE ili da mu doprinosi. Prema jednoj hipotezi, GERB doprinosi nastanku EoE time što dovodi do oštećenja integriteta sluznice jednjaka, i omogućava lakši transepitelni prolazak alergena sa posledičnom aktivacijom alergijskog imunološkog odgovora [76]. S druge strane, dokazano je postojanje hipersenzitivnosti jednjaka kod pacijenata sa EoE [77]. Integritet sluznice jednjaka meren bazalnom impedansom je značajno smanjen kod pacijenata sa EoE u poređenju sa zdravim kontrolama [76]. Hipersenzitivnost jednjaka može da bude posledica mikroskopskih promena integriteta sluznice jednjaka i da objasni simptomatsko poboljšanje na IPP uprkos održavanju inflamacije jednjaka [78]. Isto tako, EoE može da dovede do morfoloških i funkcionalnih promena jednjaka, koje mogu da indukuju GERB.

Pojam eozinofilije jednjaka koja reaguje na inhibitore protonskе pumpe (*PPI-responsive esophageal eosinophilia - PPI-REE*) uveden je 2011. godine. Do tada se smatralo da se EoE i GERB međusobno isključuju, te da samo pacijenti sa GERBom mogu da daju klinički odgovor na IPP. Prema definiciji PPI-REE ima kliničke, endoskopske i histološke karakteristike EoE, a primena IPP dovodi do kliničke i histološke remisije, i u odsustvu GERBa [79]. Međutim, novija istraživanja su pokazala da se PPI-REE i EoE ne razlikuju po pitanju kliničke slike, endoskpskog nalaza, nalaza pH monitoringa, histološkog nalaza i molekularne osnove [80]. Pacijenti sa EoE i GERBom koji su na terapiji IPP na isti način reaguju na ovu terapiju – supresijom stimulatornog efekta IL4 i IL13. Kod ovih pacijenata omeprazol inhibira vezivanje STAT6 za promoter eotaksina-3 [2]. Analizom transkriptoma otkriven je sličan obrazac genske regulacije (*up- i down-*) koji je specifičan za pacijente sa EoE i PPI-REE, ali ne i za pacijente sa GERBom [81]. Sposobnost IPP da dovede do gotovo potpune reverzije ekspresije gena povezanih sa PPI-REE, naročito onim što se povezuje sa klasičnom alergijskom inflamacijom, pružio je uvid u moguću etiologiju bolesti i nove terapijske opcije kod pacijenata sa značajnom eozinofilijom jednjaka. Klinička ispitivanja su pokazala da IPP (kao monoterapija) smanjuje alergijsku Th2 upalu kod pacijenta sa PPI-REE [78], na sličan način kao što to čine topikalni steroidi kod EoE. Pored toga, IPP kod pacijenata sa PPI-REE mogu gotovo potpuno da normalizuju genetski potpis, koji je sličan onom koji se nalazi kod pacijenata sa EoE [81]. Takođe, pacijenti sa EoE koji pokazuju odgovor na eliminacionu dijetu ili topikalne steroide, mogu da odgovore i na monoterapiji sa IPP [82]. Ovi rezultati ističu ulogu kiselog refluksa kod jedne podgrupe pacijenata sa EoE, iako prisustvo GERBa ne mora obavezno da isključi antigen-posredovani Th2 inflamatorni odgovor. Prema tome, PPI-REE predstavlja podfenotip EoE i ne koristi se kao poseban entitet od 2017. godine [9]. Takođe, IPP su postali terapijska opcija za lečenje EoE. S obzirom na laku primenu, dobru komplijansu i bezbednosni profil, kao i visoku stopu odgovora, IPP se može smatrati terapijom

prvog izbora [9]. Potrebno je pacijenta i/ili roditelje/staratelje prethodno upoznati sa prednostima i nedostacima svih modaliteta lečenja, kao i sa činjenicom da se način lečenja može menjati tokom vremena.

EOZINOFILNI GASTROENTERITIS

Eozinofilni gastroenteritis (EGE) (sinonimi: idiopatski eozinofilni enteritis, idiopatski eozinofilni kolitis) spada u retke primarne EGIB, čija prevalencija je manja od 10 na 100 000 ljudi. Eozinofilni infiltrat se nalazi dominantno u mukozi želuca, tankog i/ili debelog creva [4,5]. Patogeneza EGE nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da je u osnovi reakcija na inhalatorne ili nutritivne alergene, a da značajnu ulogu ima i crevna disbioza. U ovim bolestima može postojati genetska deplecija uloge eotaksina, ali ne i IL5 [2].

Eo mogu da se nađu u različitim slojevima zida creva, a klinički simptomi zavise od zahvaćenosti sloja u zidu organa koji je infiltriran. Najčešće su zahvaćeni želudac i tanko crevo. Ukoliko je zahvaćena samo sluzokoža bolest će se manifestovati enteropatijom sa gubitkom proteina i malapsorpcijom. Ukoliko je zahvaćen i mišićni sloj javiće se bol u trbuhu, povraćanje, dispeptični simptomi i poremećaj motiliteta creva. Subserozno zahvatljivanje uglavnom uzrokuje ascites sa izrazitom eozinofiljom. Dijagnoza se postavlja patohistološkom analizom endoskopskih biopsijalnih uzoraka sluznice različitih delova gastrointestinalnog trakta ili hirurški resekovanih uzoraka. U endoskopskim biopsijama se odlikuje povećanim brojem Eo u lamihi sluznice želuca, tankog i/ili debelog creva (>20/HPF) i njihovim prisustvom u pokrovnom i foveolarnom/kriptnom epitelu. Eozinofilni infiltrat u ovom oboljenju se može videti i u jednjaku. Kao i u ostalim slučajevima primarne eozinofilije jednjaka, eozinofilni infiltrat je neravnomerno zastupljen. Diferencijska dijagnoza u odnosu na EoE nije u potpunosti jasna, posebno kada se za EoE zna da je takođe provočiran izlaganju antigenima [11]. Za postavljanje dijagnoze EoE u okviru EGE neophodna je kliničko-patološka korelacija.

Značajan broj pacijenata ima samo jednu epizodu bez relapsa, dok manji broj ima relapsno-remitentnu ili hroničnu bolest. Dokazi vezani za lečenje ovih poremećaja potiču iz prikaza slučajeva i serija slučajeva. Prva terapijska linija jesu empirijske eliminacione dijete i kortikosteroidi. Sistemski kortikosteroidi, kao i budesonid, su često efikasni za indukciju remisije. U slučaju čestih relapsa ili refraktornosti na primenu steroida može da se pokuša sa imunosupresivima ili biološkom terapijom. U slučajevima opstrukcije indikovana je hirurška intervencija.

Molekularni markeri eozinofilnog gastroenteritisa

S obzirom da je EGE retka bolest, nema mnogo istraživanja na temu genetičkih identifikacionih markera, već se većina ispitivanja zasnivaju na utvrđivanju efikasnosti lekova koji već postoje i koriste se za terapiju drugih oboljenja sličnih simptoma. Lako danas postoji značajan broj studija koje se bave validacijom novih lekova kod EGE obolelih, većina njih je još uvek u vidu preliminarnih istraživanja, te je neophodna dalja verifikacija efekata ispitivanih lekova u kliničkoj praksi. Najnovija ispitivanja, rađena na malom broju uzoraka, ispitivala su efekat inhibitora leukotrijena (LT), imunomodulatora i biološke terapije.

LT inhibitori su antagonisti receptora za leukotriene. Primenom ovih lekova koji se obično koriste za terapiju obolelih od astme, dolazi do inhibiranja inflamatornih procesa koji se prenose preko leukotriena. Dosadašnja ispitivanja pokazala su pozitivne efekte kod svih osoba kod kojih su primećene eozinofilne infiltracije, uključujući EGE. Najčešće ispitivani LT inhibitor je montelukast [83]. Većina dosadašnjih studija pokazala su pozitivne efekte montelukasta, primjenjenog samog ili u kombinaciji sa steroidima, na indukciju regeneracije epitela i održavanje remisije kod EGE obolelih [84]. Međutim, većina dosadašnjih ispitivanja bazirala je svoje rezultate na brzom odgovoru pacijenta na dejstvo leka. Stoga, neophodne su studije koje bi utvrdile dugotrajne efekte LT inhibitora, njihovu efikanost i bezbednost.

Imunomodulatori su ispitivani kao alternativa za EGE pacijente koji su zavisni od terapije steroidima ili su na njih rezistentni. To su molekuli koji inhibiraju sintezu purina (što posledično smanjuje sintezu DNK/RNK molekula) i negativno utiču na proliferaciju T i B limfocita (što posledično smanjuje produkciju citotoksičnih T limfocita, odnosno smanjuje se inflamacija). Do sada ispitivani imunomodulatori su 6-merkaptopurin i azatioprin koji su dali diskutabilne rezultate kod EDE obolelih [85].

Biološka terapija podrazumeva upotrebu lekova koji utiču na polarizaciju imunog odgovora, odnosno na mehanizme dejstva Th2 alergijskog odgovora. Antitela na inflamatorne citokine (IL5, TNFa, i IgE), adaptirana za primenu kod obolelih od EGE, testirana u kliničkim studijama, dala su obećavajuće rezultate u smislu efikasnosti i bezbednosti primene. Pokazano je da pod uticajem ovih lekova dolazi do pada ukupnog broja eozinofila, inhibicije njihove aktivacije i smanjenja njihovog preživljavanja. Do sada dobre ili delimično dobre rezultate dali su reslizumab (neutrališuće antitelo na IL5) [86], infliximab (neutrališuće antitelo na TNFa) [87], omalizumab (humanizovano anti-IgE monoklonsko antitelo koje redukuje nivo IgE) [88] i interferon-a [89].

EGE je retka bolest, koja se često kasno ili pogrešno dijagnostikuje. Nedostaju studije u široj populaciji koje bi poredile efikasnost i bezbednost različitih lekova, kao i selektovale dobre prognostičke prediktore, u cilju sinteze terapijskog algoritma.

ZAKLJUČAK

Identifikacija EGIB transkriptoma i razlučivanje imunopatogeneze različitih EGIB oboljenja omogućava identifikaciju novih molekularnih markera. Primena novoidentifikovanih i validiranih markera poboljšava dijagnozu, omogućava prognozu, kao i brz odabir adekvatnog terapijskog pristupa. Prednost analize transkriptoma jeste predikcija odgovora pacijenta na prepisani lek, što omogućava predikciju kliničkog ishoda. Dodatno, identifikacijom gena koji se eksprimiraju nakon inicijalne terapije („*residual gene expression*“) omogućava se sekundarna korektivna terapija za gene koji su i dalje aktivni. Bolja briga o pacijentima mogla bi biti postignuta i uvođenjem neinvazivnih biomarkera, dovoljno senzitivnih i specifičnih da omoguće brzu i tačnu dijagnozu, ili praćenje toka bolesti. Iako postoji značajan broj studija koje se bave validacijom novih lekova kod EGIB obolelih, većina njih je još uvek u vidu preliminarnih istraživanja, te je neophodna dalja verifikacija efekata ispitivanih lekova u kliničkoj praksi. Svakako, molekularno profilisanje gena specifičnih za određeno oboljenje olakšava dijagnozu, poboljšava kliničko praćenje i omogućava brz odabir terapije prilagođene pacijentu, odnosno personalizovani medicinski pristup obolelima.

LITERATURA

1. Lekutonov A. Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders. *World J Gastroenterol* 2019; 25(27):3503-26.
2. Coakley G, Wang H, Harris NL. Intestinal eosinophils: multifaceted roles in tissue homeostasis and disease. *Semin Immunopathol* 2021. doi: 10.1007/s00281-021-00851-2. Epub ahead of print.
3. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res* 2011; 343(1):57-83.
4. Spergel JM, Book WM, Mays E, Song L, Shah SS, Talley NJ, Bonis PA. Variation in prevalence, diagnostic criteria, and initial management options for eosinophilic gastrointestinal diseases in the United States. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52(3):300-6.
5. Gonsalves N. Eosinophilic Gastrointestinal Disorders. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019; 57(2):272-85.
6. Dobbins JW, Sheahan DG, Behar J. Eosinophilic gastroenteritis with esophageal involvement. *Gastroenterology* 1977; 72(6):1312-6.
7. Attwood SE, Smyrk TC, Demeester TR, Jones JB. Esophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathologic syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38(1):109-16.
8. Straumann A, Spichtin HP, Bernoulli R, Loosli J, Vögtilin J. Idiopathic eosinophilic esophagitis: a frequently overlooked disease with typical clinical aspects and discrete endoscopic findings. *Schweiz Med Wochenschr* 1994; 124(33):1419-29.
9. Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias Á, von Arnim U, Bredenoord AJ, Bussmann C, et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United Eur Gastroenterol J* 2017; 5(3):335-58.
10. Judd LM, Heine RG, Menheniot TR, Buzzelli J, O'Brien-Simpson N, Pavlic D, et al. Elevated IL-33 expression is associated with pediatric eosinophilic esophagitis, and exogenous IL-33 promotes eosinophilic esophagitis development in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 310(1):G13-25.
11. Arnold CA, Lam-Himlin DM, Montgomery EM. *Atlas of Gastrointestinal Pathology A Pattern Based Approach to Non- Neoplastic Biopsies*. Wolters Kluwer 2015; pp 30-40.
12. Ristic N, Jankovic R, Dragutinovic N, Atanaskovic-Markovic M, Radusinovic M, Stevic M, et al. Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis in Children: A Serbian Single-Center Experience from 2010 to 2017. *Med Princ Pract* 2019; 28(5):449-56.
13. Lipka S, Kumar A, Richter JE. Impact of Diagnostic Delay and Other Risk Factors on Eosinophilic Esophagitis Phenotype and Esophageal Diameter. *J Clin Gastroenterol* 2016; 50(2):134-40.
14. Nielsen JA, Lager DJ, Lewin M, Rendon G, Roberts CA. The optimal number of biopsy fragments to establish a morphologic diagnosis of eosinophilic esophagitis. *Am J Gastroenterol* 2014; 109(4):515-20.
15. Salek J, Clayton F, Vinson L, Saffari H, Pease LF, Boynton K, et al. Endoscopic appearance and location dictate diagnostic yield of biopsies in eosinophilic oesophagitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 41(12):1288-95.
16. Blanchard C, Mingler MK, Vicario M, Abonia JP, Wu YY, Lu TX, et al. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(6):1292-300.
17. Zuo L, Fulkerson PC, Finkelman FD, Mingler M, Fischetti CA, Blanchard C, et al. IL-13 induces esophageal remodeling and gene expression by an eosinophil-independent, IL-13R alpha 2-inhibited pathway. *J Immunol* 2010; 185(1):660-9.
18. Mishra A, Rothenberg ME. Intratracheal IL-13 induces eosinophilic esophagitis by an IL-5, eotaxin-1, and STAT6-dependent mechanism. *Gastroenterology* 2003; 125(5):1419-27.
19. Blanchard C, Mishra A, Saito-Akei H, Monk P, Anderson I, Rothenberg ME. Inhibition of human interleukin-13-induced respiratory and oesophageal inflammation by anti-human-interleukin-13 antibody (CAT-354). *Clin Exp Allergy* 2005; 35(8):1096-103.
20. Bhattacharya B, Carlsten J, Sabo E, Kethu S, Meitner P, Tavares R, et al. Increased expression of eotaxin-3 distinguishes between eosinophilic esophagitis and gastroesophageal reflux disease. *Hum Pathol* 2007; 38(12):1744-53.
21. Park JY, Zhang X, Nguyen N, Souza RF, Spechler SJ, Cheng E. Proton pump inhibitors decrease eotaxin-3 expression in the proximal esophagus of children with esophageal eosinophilia. *PLoS One* 2014; 9(7):e101391.
22. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Prog Lipid Res* 2019; 73:28-45.
23. Tian R, Zuo X, Jaoude J, Mao F, Colby J, Shureiqi I. ALOX15 as a suppressor of inflammation and cancer: Lost in the link. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2017; 132:77-83.
24. Dellon ES, Selitsky SR, Genta RM, Lash RH, Parker JS. Gene expression-phenotype associations in adults with eosinophilic esophagitis. *Dig Liver Dis* 2018; 50(8):804-11.
25. Matoso A, Allen D, Herzlinger M, Ferreira J, Chen S, Lu S, et al. Correlation of ALOX15 expression with eosinophilic or reflux esophagitis in a cohort of pediatric patients with esophageal eosinophilia. *Hum Pathol* 2014; 45(6):1205-12.
26. Sleiman PM, Wang ML, Cianferoni A, Aceves S, Gonsalves N, Nadeau K, et al. GWAS identifies four novel eosinophilic esophagitis loci. *Nat Commun* 2014; 5:5593.
27. Kottyan LC, Davis BP, Sherrill JD, Liu K, Rochman M, Kaufman K, et al. Genome-wide association analysis of eosinophilic esophagitis provides insight into the tissue specificity of this allergic disease. *Nat Genet* 2014; 46(8):895-900.

28. Sherrill JD, Kc K, Wu D, Djukic Z, Caldwell JM, Stucke EM, et al. Desmoglein-1 regulates esophageal epithelial barrier function and immune responses in eosinophilic esophagitis. *Mucosal Immunol* 2014; 7(3):718-29.
29. Samuelov L, Sarig O, Harmon RM, Rapaport D, Ishida-Yamamoto A, Isakov O, et al. Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. *Nat Genet* 2013; 45(10):1244-8.
30. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WHI, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(4):689-93.
31. Ávila-Castellano R, García-Lozano JR, Cimballek S, Lucendo AJ, Bozada JM, Quiralte J. Genetic variations in the TLR3 locus are associated with eosinophilic esophagitis. *United European Gastroenterol J* 2018; 6(3):349-57.
32. Noti M, Wojno ED, Kim BS, Siracusa MC, Giacomini PR, Nair MG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. *Nat Med* 2013; 19(8):1005-13.
33. Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM, Blanchard C, Collins MH, Putnam PE, et al. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126(1):160-5.e3.
34. Blanchard C, Mingler MK, McBride M, Putnam PE, Collins MH, Chang G, et al. Periostin facilitates eosinophil tissue infiltration in allergic lung and esophageal responses. *Mucosal Immunol* 2008; 1(4):289-96.
35. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128(1):3-20.e6; quiz 21-2.
36. Aceves SS, Newbury RO, Dohil R, Bastian JF, Broide DH. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(1):206-12.
37. Aceves SS, Newbury RO, Chen D, Mueller J, Dohil R, Hoffman H, et al. Resolution of remodeling in eosinophilic esophagitis correlates with epithelial response to topical corticosteroids. *Allergy* 2010; 65(1):109-16.
38. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3):221-33.
39. Roncevic J, Djoric I, Selemetjev S, Jankovic J, Dencic TI, Bozic V, Cvejic D. 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.
40. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 1999; 35(3):227-33.
41. Palumbo A Jr, Meireles Da Costa N, Pontes B, Leite de Oliveira F, Lohan Codeço M, Ribeiro Pinto LF, Nasciutti LE. Esophageal Cancer Development: Crucial Clues Arising from the Extracellular Matrix. *Cells* 2020; 9(2):455.
42. Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmikowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50(1):12-9.
43. Beppu L, Yang T, Luk M, Newbury RO, Palmquist J, Dohil R, et al. MMPs-2 and -14 Are Elevated in Eosinophilic Esophagitis and Reduced Following Topical Corticosteroid Therapy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 61(2):194-9.
44. Wechsler JB, Ackerman SJ, Chehade M, Amsden K, Riffle ME, Wang MY, et al. Noninvasive biomarkers identify eosinophilic esophagitis: A prospective longitudinal study in children. *Allergy* 2021; doi: 10.1111/all.14874.
45. Sherrill JD, Kiran KC, Blanchard C, Stucke EM, Kemme KA, Collins MH, et al. Analysis and expansion of the eosinophilic esophagitis transcriptome by RNA sequencing. *Genes Immun* 2014; 15(6):361-9.
46. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2):281-97.
47. Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, Mascarenhas N, Kovalski J, Kretz M, Khavari PA. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration. *Genome Res* 2012; 22(6):1006-14.
48. Stojanović S, Šelemetjev S, Đorić I, Rončević J, Janković Miljuš J, Živaljević V, Išić Denčić T. Elevated BANCR expression levels have different effects on papillary thyroid carcinoma progression depending on the presence of the BRAFV600E mutation. *Eur J Surg Oncol* 2020; 46(10PtA):1835-42.
49. Liu XF, Hao JL, Xie T, Pant OP, Lu CB, Lu CW, Zhou DD. The BRAF activated non-coding RNA: A pivotal long non-coding RNA in human malignancies. *Cell Prolif* 2018; 51(4):e12449.
50. Lu TX, Sherrill JD, Wen T, Plassard AJ, Besse JA, Abonia JP, et al. MicroRNA signature in patients with eosinophilic esophagitis, reversibility with glucocorticoids, and assessment as disease biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129(4):1064-75.e9.
51. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol* 2009; 182(8):4994-5002.
52. Lu TX, Lim EJ, Itskovich S, Besse JA, Plassard AJ, Mingler MK, et al. Targeted ablation of miR-21 decreases murine eosinophil progenitor cell growth. *PLoS One* 2013; 8(3):e59397.
53. Lu TX, Lim EJ, Wen T, Plassard AJ, Hogan SP, Martin LJ, Aronow BJ, Rothenberg ME. MiR-375 is downregulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13-induced epithelial transcriptome. *Mucosal Immunol*. 2012; 5(4):388-96.
54. Lu S, Mukkada VA, Mangray S, Cleveland K, Shillingford N, Schorl C, et al. MicroRNA profiling in mucosal biopsies of eosinophilic esophagitis patients pre and post treatment with steroids and relationship with mRNA targets. *PLoS One* 2012; 7(7):e40676.
55. Torri A, Carpi D, Bulgheroni E, Crosti MC, Moro M, Guarin P, et al. Extracellular MicroRNA Signature of Human Helper T Cell Subsets in Health and Autoimmunity. *J Biol Chem* 2017; 292(7):2903-15.
56. Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 2008; 452(7184):225-9.
57. Kelbel TE, Ghaffari G, Sena M, Ishmael FT. Salivary microRNA as a biomarker for monitoring response to treatment in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135:AB78.
58. Bhardwaj N, Sena M, Ghaffari G, Ishmael F. MiR-4668 as a Novel Potential Biomarker for Eosinophilic Esophagitis. *Allergy Rhinol (Providence)* 2020; 11:2152656720953378.
59. Rothenberg ME, Wen T, Greenberg A, Alpan O, Enav B, Hirano I, et al. Intravenous anti-IL-13 mAb QAX576 for the treatment of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(2):500-7.
60. Straumann A, Hoesli S, Bussmann Ch, Stuck M, Perkins M, Collins LP, et al. Anti-eosinophil activity and clinical efficacy of the CRTH2 antagonist OC000459 in eosinophilic esophagitis. *Allergy* 2013; 68(3):375-85.
61. Guarino MP, Cicala M, Behar J. Eosinophilic esophagitis: New insights in pathogenesis and therapy. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016; 7(1):66-77.
62. Rosen R, Vandenplas Y, Singendonk M, Cabana M, DiLorenzo C, Gottrand F, et al. Pediatric Gastroesophageal Reflux Clinical Practice Guidelines: Joint Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018; 66(3):516-54.
63. Ristic N. Procena validnosti merenja gasterozofagealnog refluksa kod dece različitim dijagnostičkim metodama [doktorska disertacija]. Medicinski fakultet

- Univerziteta u Beogradu; 2017.
64. Gilger MA, El-Serag HB, Gold BD, Dietrich CL, Tsou V, McDuffie A, et al. Prevalence of endoscopic findings of erosive esophagitis in children: a population-based study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47(2):141–6.
 65. Ristic N, Milovanovic I, Radusinovic M, Stevic M, Ristic M, Ristic M, et al. The comparative analyses of different diagnostic approaches in detection of gastroesophageal reflux disease in children. *PLoS One* 2017; 12(11):e0187081.
 66. Stojacic ZM, Stevanovic RM, Stojanovic MM, Stanojevic AD, Bacetic DT. Histological features of gastric cardia in adults: an autopsy study. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; 20:13–8.
 67. Abd El-Rehim DM, Fath El-Bab HK, Kamal EM. Expression of Proteinase-activated Receptor-2 in the Esophageal Mucosa of Gastroesophageal Reflux Disease Patients: A Histomorphologic and Immunohistochemical Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015; 23(9):646–52.
 68. Kandulski A, Wex T, Mönkemüller K, Kuester D, Fry LC, Roessner A, Malfertheiner P. Proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105(9):1934–43.
 69. Bhat YM, Bielefeldt K. Capsaicin receptor (TRPV1) and non-erosive reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18(3):263–70.
 70. Miwa H, Takubo K, Shimatani T, Furuta T, Oshima T, Tanaka J, et al. Histology of symptomatic gastroesophageal reflux disease: is it predictive of response to proton pump inhibitors? *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28(3):479–87.
 71. Oshima T, Koseki J, Chen X, Matsumoto T, Miwa H. Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers. *Lab Invest* 2012; 92(1):22–31.
 72. Mönkemüller K, Wex T, Kuester D, Fry LC, Kandulski A, Kropf S, et al. Role of tight junction proteins in gastroesophageal reflux disease. *BMC Gastroenterol* 2012; 12:128.
 73. Wex T, Mönkemüller K, Stahr A, Kuester D, Fry LC, Völkel S, et al. Gastro-oesophageal reflux disease is associated with up-regulation of desmosomal components in oesophageal mucosa. *Histopathology* 2012; 60(3):405–15.
 74. Abdel-Aziz H, Schneider M, Neuhuber W, Meguid Kassem A, Khalilah S, Müller J, et al. GPR84 and TREM-1 Signaling Contribute to the Pathogenesis of Reflux Esophagitis. *Mol Med* 2016; 21(1):1011–24.
 75. Cesario S, Scida S, Miraglia C, Barchi A, Nouvenne A, Leandro G, et al. Diagnosis of GERD in typical and atypical manifestations. *Acta Biomed* 2018; 89(8-S):33–9.
 76. van Rhijn BD, Weijenborg PW, Verheij J, van den Bergh Weerman MA, Verseijden C, van den Wijngaard RMJGJ, et al. Proton pump inhibitors partially restore mucosal integrity in patients with proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia but not eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 2014; 12(11):1815–23.
 77. Krarup AL, Villadsen GE, Melgaard E, Olesen SS, Drewes AM, Funch-Jensen P. Acid hypersensitivity in patients with eosinophilic oesophagitis. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45(3):273–81.
 78. Molina-Infante J, Rivas MD, Hernandez-Alonso M, Vinagre-Rodríguez G, Mateos-Rodríguez JM, Dueñas-Sadornil C, et al. Proton pump inhibitor-responsive oesophageal eosinophilia correlates with downregulation of eotaxin-3 and Th2 cytokines overexpression. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40(8):955–65.
 79. Molina-Infante J, Ferrando-Lamana L, Ripoll C, Hernandez-Alonso M, Mateos JM, Fernandez-Bermejo M, et al. Esophageal eosinophilic infiltration responds to proton pump inhibition in most adults. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2011; 9(2):110–7.
 80. Molina-Infante J, Bredenoord AJ, Cheng E, Dellon ES, Furuta GT, Gupta SK, et al. Proton pump inhibitor-responsive oesophageal eosinophilia: an entity challenging current diagnostic criteria for eosinophilic oesophagitis. *Gut* 2016; 65(3):524–31.
 81. Wen T, Dellon ES, Moawad FJ, Furuta GT, Aceves SS, Rothenberg ME. Transcriptome analysis of proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia reveals proton pump inhibitor-reversible allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(1):187–97.
 82. Lucendo AJ, Arias Á, González-Cervera J, Olalla JM, Molina-Infante J. Dual response to dietary/topical steroid and proton pump inhibitor therapy in adult patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137(3):931–4.e2.
 83. Friesen CA, Kearns GL, Andre L, Neustrom M, Roberts CC, Abdel-Rahman SM. Clinical efficacy and pharmacokinetics of montelukast in dyspeptic children with duodenal eosinophilia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38(3):343–51.
 84. Neustrom MR, Friesen C. Treatment of eosinophilic gastroenteritis with montelukast. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(2 Pt 1):506.
 85. Netzer P, Gschossmann JM, Straumann A, Sendensky A, Weimann R, Schoepfer AM. Corticosteroid-dependent eosinophilic oesophagitis: azathioprine and 6-mercaptopurine can induce and maintain long-term remission. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19(10):865–9.
 86. Simon D, Braathen LR, Simon HU. Anti-interleukin-5 antibody therapy in eosinophilic diseases. *Pathobiology* 2005; 72(6):287–92.
 87. Turner D, Wolters VM, Russell RK, Shakhnovich V, Muise AM, Ledder O, et al. Anti-TNF, infliximab, and adalimumab can be effective in eosinophilic bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56(5):492–7.
 88. Holgate S, Casale T, Wenzel S, Bousquet J, Deniz Y, Reisner C. The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(3):459–65.
 89. Krishnaswamy G, Smith JK, Srikanth S, Chi DS, Kalbfleisch JH, Huang SK. Lymphoblastoid interferon-alpha inhibits T cell proliferation and expression of eosinophil-activating cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16(10):819–27.

Molekularni markeri u sistemskoj sklerozi: geni kandidati i terapijski modaliteti

Vesna Spasovski, Miša Vreća

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

Kontakt: vesna.spasovski@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Sistemska skleroza je izuzetno složeno i heterogeno oboljenje u pogledu kliničke prezentacije, progresije bolesti, zahvaćenosti organa i ishodu. Na individualnom nivou, ova složenost predstavlja izazov u predviđanju progresije bolesti i lečenju. U ovom radu će biti prikazana dosadašnja saznanja o molekularnim markerima u sistemskoj sklerozi, signalnim putevima koji su uključeni u patogenezu, kao i njihova uloga u kliničkoj prezentaciji bolesti. Biće predstavljeni novi terapijski pristupi u lečenju, sa posebnim osvrtom na biološku terapiju zasnovanu na genima kandidatima, kao i mogućnosti koje regenerativna medicina nudi u lečenju ove autoimmune sistemske bolesti.

Ključne reči: sistemska skleroza, molekularni markeri, biološka terapija, regenerativna medicina

Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities

Vesna Spasovski, Misa Vreća

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: vesna.spasovski@imgge.bg.ac.rs

Abstract

Systemic sclerosis is an extremely complex and heterogeneous disease in terms of clinical presentation, disease progression, organ involvement, and outcome. At the individual level, this complexity presents a challenge in predicting disease progression and treatment. This paper will present the current knowledge about molecular markers in systemic sclerosis, signaling pathways involved in pathogenesis, as well as their role in the clinical presentation of the disease. New therapeutic approaches in treatment will be presented, with special emphasis on biological therapy based on candidate genes, as well as the possibilities that regenerative medicine offers in the treatment of this autoimmune systemic disease.

Keywords: systemic sclerosis, molecular markers, biological therapy, regenerative medicine

UVOD

Sistemska skleroza (SSc) je retka sistemska bolest vezivnog tkiva čiji je klinički tok heterogen i često nepredvidiv, a u nekim slučajevima i letalan. Incidencija varira, a kod evropskog stanovništva se javlja 0,6-19 novih slučajeva obolelih na milion stanovnika godišnje [1,2]. Uzrok bolesti ostao je i do danas nepoznat, uprkos sve intenzivnijim naučnim istraživanjima i savremenim kliničkim dijagnostičkim procedurama. Brojna istraživanja molekularnih markera koji su faktori predispozicije ili markeri uključeni u patogenezu ove bolesti ponudila su gene kandidate za dijagnozu, prognozu i stratifikaciju pacijenata, a neki od njih bi mogli da budu i paradigma za ciljanu terapiju.

Osnovne karakteristike SSc su aktivacija imunskog sistema i inflamacija, koje se javljaju prvenstveno u vaskularnom sistemu dovodeći do mikroangiopatija, koje zahvataju kožu i unutrašnje organe. Kao posledica oštećenja malih krvnih sudova i pojačane produkcije komponenti vančelijskog matriksa dolazi do taloženja vezivnih vlakana u koži i unutrašnjim organima, što dovodi do progresivne fibroze kože i viscerálnih organa, a prvenstveno pluća, bubrega i srca [3,4]. Promene na koži mogu biti difuzne (dcSSc) i lokalizovane (lcSSc), što predstavlja osnovni parametar u razvrstavanju bolesnika. Kod lcSSc, zadebljanje kože ograničeno je na područja distalno od laktova i/ili kolena, poput ruku i prstiju. Ovi pacijenti imaju manju zahvaćenost unutrašnjih organa i bolju prognozu. Kožne promene kod difuznog tipa bolesti obuhvataju veći deo kože i obično su praćene intenzivnijim promenama na unutrašnjim organima, tako da oni imaju lošiju prognozu [5-9]. Ukupna stopa preživljavanja kod SSc pacijenata je varijabilna i zavisi od težine zahvaćenosti viscerálnih organa, ali se može reći da u grupi bolesti vezivnih tkiva difuzni oblik SSc nosi najveći rizik od prerane smrti, gde na period praćenja od 10 godina preživljava 55% pacijenata [10].

Što se tiče promena na unutrašnjim organima, promene u krvnim sudovima pluća mogu dovesti do zapaljenja i fibroze intersticijuma, uz razvoj intersticijumske bolesti pluća (IBP) ili plućne arterijske hipertenzije (PAH), koji predstavljaju najčešći uzrok smrti kod ovih bolesnika [11,12]. Oštećenje srca se kod više od 60% pacijenata ispoljava kao mikrovaskularna bolest koronarnih arterija, dok se kod ostalih bolesnika javlja disfunkcija desne ili leve komore, dijastolna disfunkcija, perikardni izliv i sistolna disfunkcija leve komore. Takođe se može razviti i fibroza miokarda, koja se ispoljava poremećajima ritma i sprovodjenja usled postojanja ožiljnog tkiva [9,12]. Bubrežne promene nastaju usled oštećenja arteriola bubrege, što dovodi do smanjenja protoka krvi kroz bubrege i razvoja sklerodermijske renalne krize sa razvojem bubrežne slabosti. Kao najteži oblik ispoljavanja SSc može se razviti i renalna fibroza, uz gubitak funkcionalnog parenhima bubrege i stvaranja bubrežne insuficijencije, što zahteva dializu i u najtežim slučajevima transplantaciju bubrega [13].

IMUNSKA DISREGULACIJA I NJENA ULOGA U SSc

Brojna istraživanja su pokazala da aktivacija imunskog sistema predstavlja ključni događaj u nastanku SSc [14,15] i da predhodi vaskulopatiji i fibrozi [16]. Fiziološka ravnoteža između proinflamatornih CD4⁺ i supresorskih T-efektorskih ćelija, osnova su za postojanje imunske homeostaze [17]. Na njeno narušavanje imaju uticaj kako genetski faktori, tako i faktori sredine. Patogenetski mehanizmi koji dovode do prevalencije T-efektorskih CD4⁺ ćelija nisu još uvek rasvetljeni, ali se smatra da upravo oni leže u osnovi autoimunosti, zapaljenja i oštećenja tkiva koji se javljaju u SSc [18–20]. Signalni putevi koji uključuju gene *IL-6*, *IL-23*, *TGF-β*, *RORγt* i *STAT-3* ključni su za diferencijaciju T helper 17 (Th17) ćelija. Pokazano je da se upravo ova vrsta T-efektorskih ćelija, koje predstavljaju podvrstu CD4⁺ T ćelija [21,22], značajno povećava kod SSc pacijenata, kao i kod nekih drugih autoimunih bolesti [22].

Fino mapiranje genetskih i epigenetskih varijanti kod autoimunih bolesti pokazalo je da uzročne varijante imaju tendenciju da se javljaju u blizini mesta vezivanja glavnih regulatora imunske diferencijacije i stimulus-zavisne aktivacije gena, ali samo 10–20% njih direktno menja mesta vezivanja faktora transkripcije. Umesto toga, većina varijanti pogadaju nekodirajuće regije, uključujući one koji menjaju ekspresiju gena, kao što je slučaj sa promotorskim varijantom u *IL-6* [23], kao i varijante koje pogadaju nekanonske sekvene koje nisu dobro objašnjene važećim modelima za regulaciju ekspresije gena [24]. Stoga istraživanja signalnih puteva koji uključuju ove gene, kao i mehanizama regulacije njihove ekspresije, predstavljaju novu perspektivu u pronalaženju gena kandidata u SSc.

Među faktorima koji regulišu gensku ekspresiju mikro RNK (miR) predstavljaju vrlo interesantan i značajan aspekt, obzirom da je pokazano da regulišu gene koji utiču na signalnu transdukciju, razviće, ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju, metabolizam i apoptozu [25–28]. Zbog njihove sposobnosti da regulišu širok spektar transkriptata i signalnih puteva u različitim vrstama imunskih ćelija tokom različitih faza njihovog razvoja, miR imaju terapijski potencijal [29]. miR se eksprimiraju u različitim ćelijama urođenog imunskog sistema, kao što su monociti, makrofagi, dendritske ćelije, granulociti i NK ćelije, kao i tokom diferencijacije B i T limfocita, igrajući na taj način ulogu u bolestima koje su posledica poremećaja urođenog i stečenog imuniteta [30]. U autoimunim bolestima pokazana je njihova izmenjena ekspresija kao i postojanje SNV u genima koji kodiraju za miR [31–33].

GENETIČKI MARKERI

Nastanak SSc je multifaktorijski, gde genetički činioci imaju uticaj kako na predispoziciju, tako i na kliničku formu bolesti [24]. Činioci povezani sa polom takođe igraju značajnu ulogu, obzirom na činjenicu da je bolest češća kod osoba ženskog pola (odnos ženski: muški pol= 4:1) [34,35].

GWAS studije su potvrdile da aktivacija imunskog sistema praćena inflamacijom prethodi ostalim poremećajima u SSc [36]. U tom smislu GWAS studije su među genima kandidatima koji imaju patogenetski uticaj otkrile gene koji utiču na diferencijaciju, proliferaciju i aktivaciju T ćelija (*HLA*, *STAT4*, *CD247*, *TBX21*, *PTPN22*, *TNFSF4*, *IL23R*, *IL2RA*, *IL-21*, *SCHIP1/IL12A*, *CD226*), gene koji utiču na aktivaciju B ćelija (*BANK1*, *C8orf13-BLK*), kao i gene urođenog imuniteta (*PLD4*, *TLR-2*, *NLRP1*, *ATG5*) [37]. Među genima koji su uključeni u inflamatorični odgovor su geni koji učestvuju u regulaciji interferona (*IRF5*, *IRF8*), NF-κB signalnom putu (*TNFAIP3*, *IRAK1*, *NFKB1*, *TNIP1*), citokini i hemokini (*FAS*, *MIF*, *HGF*, *OPN*, *IL-6*, *CXCL8*, *CCR6*, *CTGF*), geni koji regulišu monocyte i citokine (*ITGAM*, *CAV1*). Osim toga, GWAS studije pokazale su vezu sa genima koji regulišu transkripciju (*MECP2*, *SOX5*, *JAZF1*), DNK otvaranje (*DNASEIL3*, *XRCC1*, *XRCC4*), kinaznu aktivnost (*PXK*, *CSK*, *GRB10*), ćelijsku diferencijaciju (*NOTCH4*, *RHOB*), i drugim (*KIAA0319*, *PSD3*, *PSOR1C1*) [37].

Nedavno urađena meta-analiza dosadašnjih GWAS studija koja je obuhvatila 26679 pacijenata [38] otkrila je nove gene kandidate uključene u signalne puteve vezane za vaskulopatije (*DDX6*), autofagiju (*RAB2A*), gene koji su uključeni u procesovanje mRNK (*ARHGAP31*, *BLK*, *CD247*, *TNIP1*, *CSK*, *STAT4-a*, *DGKQ*, *NUP85-GRB2*, *STAT4-b*, *IL12RB1*), kao i gene uključene u signalni put TGF-β (*ANKRD12* i *TWSG1*) [38].

BIOMARKERI ZA STRATIFIKACIJU PACIJENATA U SSC

Usled velike heterogenosti u pogledu kliničke prezentacije, progresije bolesti i zahvaćenosti organa, stratifikacija pacijenata je od suštinskog značaja kako bi se umanjile dvosmislenosti u efektima lečenja i pokazala efikasnost tretmana za SSc. Pronalaženje dijagnostičkih markera, zatim markera koji bi utvrđivali aktivnost bolesti, njenu ozbiljnost i imali prediktivni i prognostički značaj je od velikog značaja i brojne studije usmerene su u ovom pravcu.

U smislu stratifikacije pacijenata značajno je korišćenje SSc-specifičnih autoantitela (anticentromerna (ACA), anti-topoizomeraza I (ATA), anti-topoizomeraznih I (Scl-70) i anti-RNK polimeraznih antitela). Ova autoantitela prisutna su kod više od 95% bolesnika i visoko korelišu sa kožnim promenama [39,40]. Njihov nedostatak je što se ne povezuju sa ostalim kliničkim manifestacijama bolesti.

BIOMARKERI ZA DIJAGNOZU BOLESTI

Do danas je otkriveno preko 1000 miR, od kojih je svaka sposobna da reguliše ekspresiju više stotina gena [29]. U sistemskoj sklerozi pronađena je izmenjena ekspresija više desetina miR, s tim što je pokazano da nivo ekspresije u različitim tkivima najčešće nije u međusobnoj korelaciji [41]. Za dijagnostiku bolesti najjednostavniji način bilo bi utvrđivanje određene miR u krvi pacijenata, te su stoga studije koje prate serumski nivo miR ili nivo u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNČPK) imaju veliki značaj. U tom smislu pokazan je izmenjen nivo ekspresije miR-21 u krvi [41], let-7a [41], miR-483-5p [42], miR-92a [43], miR-30b [44], let-7g i 125b [45] u serumu, miR-146a [33], miR-618 [46], miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-155-5p i miR-16-5p [47] u MNČPK kod pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike. Njihova ekspresija se potencijalno može koristiti u dijagnostici SSc.

BIOMARKERI ZA AKTIVNOST BOLESTI

Postoje dve faze u razvoju bolesti, koje se mogu definisati kao potencijalno reverzibilna faza, u kojoj aktivirane ćelije direktno ili indirektno aktiviraju ili oštećuju endotelne ćelije i stimulišu fibroblaste da prekomerno eksprimiraju gene koji kodiraju za komponente ekstracelularnog matriksa; i druga, definitivno nepovratna faza, u kojoj se javlja vaskularna okluzija i intersticijska fibroza [48]. Faze nisu jasno odvojene, ne isključuju se međusobno i teško ih je prepoznati naročito kod lcSSc [49].

Na osnovu laboratorijskih i kliničkih parametara kod pacijentata obolelih od SSc se određuje aktivnost bolesti i naziva se Valentini skor. Aktivnost bolesti je rangirana od 0 (odsustvo aktivnosti) do 10 (maksimalna aktivnost bolesti) [49]. Mnogi ispitivani molekularni biomarkeri su pokazali asocijaciju sa aktivnošću bolesti. U radu Vreca i sar. povećana ekspresija gena *TLR7* u MNČPK bila je asociрана sa aktivnom formom bolesti [50], dok je u studiji Fang i sar. pokazano značajno povećanje nivoa ekspresije *TLR-9* gena u koži SSc pacijenata [51].

Pokazano je da ekspresije različitih miR korelišu sa zahvaćenošću organa koji ulaze u Valentini skor. Tako su miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-26a-5p i let-7d-5p povezane sa fibrozom pluća [52], miR-20a-5p i miR-203a-3p su povezane sa PAH [53], dok je miR-29b povezana sa vaskularnim i fibroznim promenama u bubrežima [54]. Merenje ekspresije ovih molekula moglo bi da posluže za stratifikaciju pacijenata na osnovu aktivnosti bolesti.

TERAPIJSKI POTENCIJAL ODABRANIH MOLEKULARNIH MARKERA

S obzirom na vaskularnu i inflamatornu komponentu bolesti, postojeći terapijski pristupi razvijeni za druge bolesti sa sličnim kliničkim manifestacijama se koriste i u lečenju SSc, sa ograničenim učinkom. Bolest se kod nekih pacijenata drži pod kontrolom duži niz godina, ali kod pacijenata sa težom formom bolesti i većom zahvaćenošću unutrašnjih organa nedostaju efikasne imunomodulatorne i antifibrotske terapije. Brojni ključni molekularni medijatori koji uključuju TGF-β, endotelin-1, faktor rasta vezivnog tkiva, hemokine, članove familije interleukina i druge, imaju potencijal da promene imunološke, vaskularne i fibrotične procese. Ovi medijatori predstavljaju atraktivne molekule za inovativne terapijske strategije. Ipak, studije koje su ispitivale biološku terapiju uključujući imatinib, rituximab, IFN-γ, IFN-α, relaxin, anti-TGF β1 antitelo i kolagen tipa I, nisu pokazale značajno poboljšanje simptoma kod ispitanih pacijenata, a pojedini tretmani su imali teške neželjene efekte [55]. Jedino su studije koje su ispitivale etanercept i infliximab pokazale poboljšanje određenih kliničkih parametara, kao što je pokretljivost zglobova [55].

Ključni posrednici, kao što je IL-6 i drugi, mogu se blokirati korišćenjem antitela, solubilnih receptora, endogenih inhibitora ili malih molekula, antagonista liganda, receptora ili signalnih intermedijera. Biološka terapija u vidu antitela za IL-6 (tocilizumab) je primenjena u lečenju SSc sa dobrom tolerancijom i uspehom, naročito u ranoj fazi bolesti [56].

Nove smernice u lečenju SSc iz 2017 koje je predložio EULAR [57] uključuju inhibitore fosfodiesteraze tipa 5 (PDE-5) za tretman Raynaudovog fenomena, digitalnih ulceri i PAH. Preporučena je upotreba ACE inhibitora kod renalne

krize kod SSc pacijenata, kao i metotreksata kod pacijenata sa ranom difuznom formom bolesti. Eksperti EULAR-a su preporučili i transplantaciju hematopoetskih matičnih ćelija u tretmanu selektovanih pacijenata sa brzom i progresivnom SSc koji su pod rizikom za otkazivanje organa [57]. Kliničke studije u kojima je korišćena stromalna vaskularna frakcija (SVF) poreklom iz autolognog masnog tkiva pokazale su dobru toleranciju i efikasnost u lečenju digitalnih ulcera kod SSc pacijenata [58–61].

ZAKLJUČAK

Uprkos intenzivnim istraživanjima molekularne osnove sistemske skleroze, efikasan i siguran lek još nije pronađen. Inovativni terapijski pristupi se izučavaju u kliničkim ispitivanjima i napredak se postiže uporedo sa poboljšanim razumevanja molekularne i biohemiske osnove bolesti. Na širem nivou, biomarkeri koji bi omogućili bolju stratifikaciju pacijenata su od suštinske važnosti, jer bi oni trebali da osiguraju da pacijenti imaju blagovremen pristup najefikasnijim tretmanima pre nego što se dogodi nepovratno oštećenje organa. Posebno važan terapijski potencijal imaju miR mimetici i molekuli koji ciluju miR (antimiRs) koji još nisu ispitani u lečenju SSc. U tretmanu drugih bolesti oni su pokazali dobru toleranciju i bezbednost u prekliničkom razvoju. Nekoliko miR-baziranih terapeutika stigli su do kliničkih ispitivanja, kao što je mimetik tumor supresorske miR-34, koja je u fazi I kliničkih ispitivanja u lečenju kancera, i anti-miR na miR-122, koja je sada u fazi II za tretman hepatitisa [62]. S obzirom na težinu kliničke prezentacije kod pojedinih SSc pacijenata, ovaj potencijal bi mogao da se koristi i u lečenju ove teške bolesti.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

1. Denton CP, Black CM. Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends Immunol.* 2005;26(11):596–602.
2. Kanecki K, Goryński P, Tarka P, Wierzba W, Tyszko P. Incidence and prevalence of Systemic Sclerosis (SSc) in Poland – Differences between rural and urban regions. *Ann Agric Environ Med.* 2017;24(2):240–4.
3. Makino T, Jinnin M. Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2016;43(1):10–8.
4. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: A prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007;117(3):557–67.
5. Affandi AJ, Radstake TRDJ, Marut W. Update on biomarkers in systemic sclerosis: tools for diagnosis and treatment. *Semin Immunopathol.* 2015;37(5):475–87.
6. Hachulla E, Launay D. Diagnosis and classification of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;40(2):78–83.
7. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: Predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol.* 2010;37(1):42–53.
8. Steen VD. The Many Faces of Scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008;34(1):1–15.
9. Steen, Virginia D;Medsger T. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2000;2437–44.
10. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 2003;48(8):2246–55.
11. Steen Virginia D, Lucas Mary, Fertig Noreen, Medsger Thomas A J. Pulmonary arterial hypertension and severe pulmonary fibrosis in systemic sclerosis patients with a nucleolar antibody [Internet]. *J Rheumatol.* 2007. p. 2230–5.
12. Steen VD, Medsger Thomas A J. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(7):940–4.
13. Huebener P, Schwabe RF. Regulation of wound healing and organ fibrosis by toll-like receptors. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013;1832(7):1005–17.
14. Lafyatis R, York M. Innate immunity and inflammation in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21(6):617–22.
15. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJP, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol.* 1992;166(3):255–63.
16. Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015;37(5):543–57.
17. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity.* 2009;30(5):646–55.
18. Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Kuznar-Kaminska B, Gornowicz-Porowska J, Katulska K, Trzybulska D, et al. Interleukin-17 and interleukin-23: Importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis.* 2014;17(6):664–70.
19. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ERM, Elkholy M, Fatehy NA, Abd Elmoniem AEA, et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1 β , and tumour necrosis factor α in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol.* 2005;58(2):178–84.
20. Gustafsson R, Totterman TH, Klareskog L, Hallgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(1):40–5.
21. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133–41.
22. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24(2):179–89.

23. Zekovic A, Vreca M, Spasovski V, Andjelkovic M, Pavlovic S, Damjanov N. Association between the -174 C/G polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene and gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2018;37(9):2447–54.
24. Farh KKH, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature.* 2015;518(7539):337–43.
25. Kapsimali M, Kloosterman WP, de Brujin E, Rosa F, Plasterk RHA, Wilson SW. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol.* 2007;8(8).
26. Ke XS, Liu CM, Liu DP, Liang CC. MicroRNAs: Key participants in gene regulatory networks. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7(4):516–23.
27. Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(5 SPEC. ISS.):563–8.
28. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(4):189–97.
29. Schell SL, Rahman ZSM. miRNA-Mediated Control of B Cell Responses in Immunity and SLE. *Front Immunol.* 2021;0:1854.
30. Momen-Heravi F, Bala S. miRNA regulation of innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2018;103(6):1205–17.
31. Morel L, Pignata C, Wang Y, Zhang H, Jin F, Hu H, et al. Serum microRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2381.
32. Jin F, Hu H, Xu M, Zhan S, Wang Y, Zhang H, et al. Serum microRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2018;0(OCT):2381.
33. Vreca M, Andjelkovic M, Tasic N, Zekovic A, Damjanov N, Pavlovic S, et al. Impact of alterations in X-linked IRAK1gene and miR-146a on susceptibility and clinical manifestations in patients with systemic sclerosis. *Immunol Lett.* 2018;204:1–8.
34. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2005;35(1):35–42.
35. VD S, TA M. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990;16(1):1–10.
36. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Mechanisms of Disease Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009;360:1989–2003.
37. Jin J, Chou C, Lima M, Zhou D, Zhou X. Systemic Sclerosis is a Complex Disease Associated Mainly with Immune Regulatory and Inflammatory Genes. *Open Rheumatol J.* 2014;8(1):29–42.
38. López-Isac E, Acosta-Herrera M, Kerick M, Assassi S, Satpathy AT, Granja J, et al. GWAS for systemic sclerosis identifies multiple risk loci and highlights fibrotic and vasculopathy pathways. *Nat Commun.* 2019;10(1).
39. LeRoy EC, Medsger J. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001;28(7):1573–6.
40. Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(11):1747–55.
41. Zhang L, Wu H, Zhao M, Lu Q. Meta-analysis of differentially expressed microRNAs in systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis.* 2020;23(10):1297–304.
42. Chouri E, Servaas NH, Bekker CPJ, Affandi AJ, Cossu M, Hillen MR, et al. Serum microRNA screening and functional studies reveal miR-483-5p as a potential driver of fibrosis in systemic sclerosis. *J Autoimmun.* 2018;89:162–70.
43. Sing T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Makino K, Kajihara I, et al. MicroRNA-92a expression in the sera and dermal fibroblasts increases in patients with scleroderma. *Rheumatol (United Kingdom).* 2012;51(9):1550–6.
44. Tanaka S, Suto A, Ikeda K, Sanayama Y, Nakagomi D, Iwamoto T, et al. Alteration of circulating miRNAs in SSc: MiR-30b regulates the expression of PDGF receptor β. *Rheumatol (United Kingdom).* 2013;52(11):1963–72.
45. Koba S, Jinnin M, Inoue K, Nakayama W, Honda N, Makino K, et al. Expression analysis of multiple microRNAs in each patient with scleroderma. *Exp Dermatol.* 2013;22(7):489–91.
46. Rossato M, Affandi AJ, Thordardottir S, Wijchers CGK, Cossu M, Broen JCA, et al. Association of MicroRNA-618 Expression With Altered Frequency and Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(9):1891–902.
47. Dolcino M, Pelosi A, Fiore PF, Patuzzo G, Tinazzi E, Lunardi C, et al. Gene Profiling in Patients with Systemic Sclerosis Reveals the Presence of Oncogenic Gene Signatures. *Front Immunol.* 2018;0(MAR):449.
48. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996;22(4):675–94.
49. Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S, et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(6):592–8.
50. Vreća M, Zeković A, Damjanov N, Andjelković M, Ugrin M, Pavlović S, et al. Expression of TLR7, TLR9, JAK2, and STAT3 genes in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *J Appl Genet.* 2018;59(1):59–66.
51. Fang F, Goncalves Marangoni R, Zhou X, Yang Y, Ye B, Shangguang A, et al. Toll-like Receptor 9 Signaling Is Augmented in Systemic Sclerosis and Elicits Transforming Growth Factor β-Dependent Fibroblast Activation. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(8):1989–2002.
52. Bagnato G, Roberts WN, Roman J, Gangemi S. A systematic review of overlapping microRNA patterns in systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev.* 2017;26(144).
53. Wuttge DM, Carlsen AL, Teku G, Wildt M, Rådegran G, Vihinen M, et al. Circulating plasma microRNAs in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology.* 2021;
54. Zhu H, Luo H, Zuo X. MicroRNAs: their involvement in fibrosis pathogenesis and use as diagnostic biomarkers in scleroderma. 2013;
55. Phumethum V, Jamal S, Johnson SR. Biologic Therapy for Systemic Sclerosis: A Systematic Review. *J Rheumatol.* 2011;38(2):289–96.
56. Zacy G, Levy Y. Outcomes of patients with systemic sclerosis treated with tocilizumab: Case series and review of the literature. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2018;32(4):563–71.
57. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(8):1327–39.
58. Granel B, Daumas A, Jouve E, Harlé JR, Nguyen PS, Chabannon C, et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: An open-label phase I trial. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(12):2175–82.
59. Del Papa N, Di Luca G, Andracco R, Zaccara E, Maglione W, Pignataro F, et al. Regional grafting of autologous adipose tissue is effective in inducing prompt healing of indolent digital ulcers in patients with systemic sclerosis: Results of a monocentric randomized controlled study. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1).
60. Daumas A, Magalon J, Jouve E, Truillet R, Casanova D, Giraudo L, et al. Long-term follow-up after autologous adipose-derived stromal vascular fraction injection into fingers in systemic sclerosis patients. *Curr Res Transl Med.* 2017;65(1):40–3.
61. Park Y, Lee YJ, Koh JH, Lee J, Min H-K, Kim MY, et al. Clinical Efficacy and Safety of Injection of Stromal Vascular Fraction Derived from Autologous Adipose Tissues in Systemic Sclerosis Patients with Hand Disability: A Proof-Of-Concept Trial. *J Clin Med.* 2020;9(9):3023.
62. Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, Fabbri E. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology (Review). *Int J Oncol.* 2016;49(1):5–32.

BIOMEDICINA
KOMPLEKSNE BOLESTI

BIOMEDICINE
NON-COMMUNICABLE DISEASES



Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji

Vladimir Gašić, Nataša Tošić

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

Kontakt: natasa.tosic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Growth arrest specific 5 (GAS5) je duga nekodirajuća RNK koja zaustavlja ćelijski ciklus i promoviše apoptozu. Ponašajući se kao signalni protein, kao mamac za druge molekule ili kao transportni molekul, ova regulatorna RNK utiče na niz puteva i molekula koji su bitni za rast ćelije i apoptozu, među kojima se ističu p53 mreža, mTOR signalni put, AKT signalni put, kao i molekuli mikro RNK, PTEN i slični. Brojne studije na različitim tipovima karcinoma su pokazale da nivo ekspresije GAS5 utiče na razvoj i tok bolesti kod hematoloških maligniteta, ginekoloških karcinoma, glioma, karcinoma dojke, karcinoma gastrointestinalnog trakta, bubrega, bešike, prostate i pluća. Shodno tome, GAS5 je novi biomarker u onkologiji, koji ima dijagnostički i prognostički značaj.

Ključne reči: Duga nekodirajuća RNK, GAS5, biomarker, karcinomi

Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology

Vladimir Gasic, Natasa Tasic

Laboratory for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: natasa.tosic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

Growth arrest specific 5 (GAS5) is a long noncoding RNA which halts the cell cycle and promotes apoptosis. Acting as a signal protein, as a decoy for other molecules or as a transport molecule, this regulatory RNA influences a number of pathways and molecules relevant for the growth of the cell and apoptosis, among them the most important being the p53 network, the mTOR signal pathway, the AKT signal pathway, as well as molecules of microRNA, PTEN and others.

Numerous studies on diverse cancer types have confirmed that the expression of GAS5 influences the development and the course of hematological malignancies, gynecologic carcinoma, gliomas, breast cancer, gastrointestinal cancer, kidney cancer, bladder cancer, prostate cancer and lung cancer. Therefore, GAS5 is a promising new diagnostic and prognostic biomarker in oncology,

Key words: Long noncoding RNA, GAS5, biomarkers, cancers

DUGE NEKODIRAJUĆE RNK

Danas se shvatanje centralne dogme molekularne biologije, po kojoj je molekul RNK posrednik između DNK, koja nosi genetsku informaciju, i proteina koji učestvuju u biološke procesima u ćeliji, drastično promenilo. Veliki međunarodni konzorcijumi kao što je ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements), su pokazali da se 80% genoma transkribuje, dok samo 1,5% ovog transkribovanog materijala kodira proteine [1]. Ovim je pokazano da su nekodirajuće RNK mnogo zastupljenije nego što se očekivalo.

Na osnovu dužine transkriptata, nekodirajuće RNK su podeljene u dve grupe: kratke i duge nekodirajuće RNK. Prva grupa uključuje klase kao što su transportne RNK, male nuklearne RNK, male nukleolarne RNK, mikro RNK i druge. Druga grupa uključuje rRNK i duge nekodirajuće RNK (dnkRNK) čije funkcije nisu dovoljno dobro poznate.

dnkRNK se definišu kao transkripti duži od 200 baznih parova koji ne sadrže produženi otvoreni okvir čitanja. Osvrćući se na anotacije FANTOM5 projekta, dolazi se do podatka da ljudski genom sadrži skoro 28 000 gena za dnkRNK, što se može porebiti sa brojem gena koji kodiraju proteine [2]. One su jako slične iRNK, pošto često imaju kapu, poliadenilisane su i podležu splajsovanju. Međutim, postoje razlike [3]. Prosečno, dnkRNK imaju manje egzona u svojoj strukturi i kraće su. Oko 42% dnkRNK sadrže dve egzona u poređenju sa samo 6% među iRNK. Prosečna dužina dnkRNK je 592 nukleotida, dok je kod iRNK 2453 nukleotida. Generalno, dnkRNK imaju niže nivoje ekspresije, njihova ekspresija je tkivno-specifična i većina dnkRNK ima nuklearnu lokalizaciju. Između ostalog, dnkRNK su manje konzervirane od iRNK, ali konzervacije sekvene nije uvek u korelaciji sa njihovom funkcijom.

Do sada, mali broj dnkRNK je funkcionalno anotiran [4,5]. Međutim, razne studije su pokazale da dnkRNK mogu da učestvuju u mnogim ćelijskim procesima, uključujući regulaciju genske ekspresije na transkripcionom [6–8] i post transkripcionim nivoima [9–11]. Štaviše, poznato je da mnoge dnkRNK mogu da doprinesu razvoju bolesti kod ljudi. Trenutno, nekoliko baza podataka sadrži podatke o asocijacijama između dnkRNK i bolesti, kao što su Lnc2Cancer, MNDR, LncRNADisease. Za neke dnkRNK, asociacija sa humanim patologijama je ustanovljena u GWAS studijama (eng. genome-wide association study) ili u istraživanjima transkriptoma. Pojedine od ovih RNK, eksperimentalno su ispitivane *in vitro*. Na kraju, neke dnkRNK i njihove uloge u razvoju bolesti su utvrđene tokom *in vivo* eksperimentata na mišjim modelima, te su u nekim slučajevima predložene kao osnova za ciljanu terapiju.

DUGA NEKODIRAJUĆA RNK GAS5

Growth arrest specific 5 (eng. GAS5) je dnkRNK, koja je u skorije vreme postala jedna od temeljnije izučavanih RNK ove vrste. Gen za GAS5 se nalazi na 1q25 lokusu. Sastoji se od 12 egzona, koji alternativnim splajsovanjem daju forme GAS5a i GAS5b. Razlika između ova dva transkripta je u egzonu 7. Kod GAS5a, nije transkribovan ceo egzon 7, dok je kod GAS5b transkribovan ceo. Intri, kojih ima 11 u GAS5 genu, se transkribuju u male nukleolarne RNK (mnRNK) [12].

Na 5' kraju, GAS5 sadrži oligopirimidinski trakt dugačak 6 nukleotida [13]. Zbog kratkog otvorenog okvira čitanja, GAS5 sadrži više stop kodona, što dovodi do degradacije transkripta [14].

dnkRNK GAS5 inhibira ćelijski ciklus, dok, u isto vreme, stimuliše apoptozu [12]. Ovaj dvostruki efekat je pokazan kod T-limfocita [15] i utvrđeno je da je GAS5 dovoljna za zaustavljanje ćelijskog ciklusa.

MEHANIZMI DELOVANJA GAS5

Postoje tri načina na koji GAS5 učestvuje u signalnim putevima.

Prvo, GAS5 može da funkcioniše kao signalni protein. U ovom slučaju je transkribovan po delovanju određenih signala, pa učestvuje u prenosu signala kao čvor [16]. Na primer, eksperimenti su utvrđili da, po oštećenju DNK u ljudskim kolorektalnim ćelijama, GAS5 povećava ekspresiju mnRNK, te GAS5 mnRNK aktivira p53 signalni put i odgovora na oštećenje DNK. GAS5 služi kao signalni protein u ovom procesu i direktno učestvuje u regulaciji p53 signalnog puta [17].

Dруго, GAS5 može da se ponaša kao mamac, pa deluje kao molekularni sunđer koji se vezuje direktno za ciljanu RNK ili za proteine, time blokirajući njihovo nishodno funkcionisanje [18]. Na primer, GAS5 vezuje miR-21, sprečavajući njeno inhibitorno delovanje na *PTEN* i *PDCD4*, pospešujući povećanu ekspresiju *PTEN* i *PDCD4* [19].

Treće, GAS5 može da služi kao transportni molekul. Po vezivanju može da vodi protein do specifične DNK sekvene gde reguliše transkripciju nishodnih molekula [20]. Prethodno je prijavljeno da GAS5 promoviše vezivanje E2F transkripcionog faktora 1 (E2F1) za promotor gena za ciklin-zavisni kinazni inhibitor 1B (*P27kip1*) navodeći ga da aktiviра *P27kip1* [21].

Od do sada izučavanih interakcija između GAS5 i drugih signalnih mreža i molekula izdvajaju se p53 mreža, mTOR signalni put, glukokortikoidni signalni put, AKT i mikro RNK.

dnkRNK mogu direktno da interaguju sa promotorima kako bi modulisali transkripciju [22]. GAS5 se vezuje za regulatorne elemente, dovodeći do aktivacije ili inhibicije genske ekspresije [22]. GAS5 može indirektno da aktivira *P27kip1* transkripciju tako što pospešuje vezivanje E2F1 za *p27kip1* promotor, što postiže direktnim vezivanjem za E2F1 [23]. Takođe je zabeleženo da GAS5 inhibira translaciju c-Myc iRNK tako što interaguje sa eukariotskim translacionim inicijacionim faktorom 4E, bez uticanja na transkripcionu ili proteinsku stabilnost c-Myc iRNK [24].

Pokazano je i da GAS5 povećava apoptozu ćelija karcinoma pluća, indukovani gefitinibom, selektivnim inhibitorm tirozin kinaznog receptora epidermalnog faktora rasta, tako što inhibira epidermalni faktor rasta i nishodno reguliše ekspresiju receptora faktora rasta nalik insulinu 1 [25]. Dodatno, povišena ekspresija GAS5 u ćelijama, koja je posledica ishemijske povrede miokarda, dovodi do aktivacije p38 MAPK signalnog puta i do povećanja ekspresije LAS1, što dovodi do apoptoze [26].

GAS5 je takođe uključen u PTEN regulaciju kroz niz mehanizama. PTEN je važan tumor supresor koji ima značajnu ulogu u ćelijskom rastu, apoptizi i migraciji [27]. GAS5 može indirektno da pospešuje translaciju PTENA tako što su primira miR-21a-5p [28]. Dodatno, u papilarnom tiroidnom karcinomu, GAS5 može da služi kao molekularni sunđer za miR-222-3p, koji aktivira PTEN/AKT put [29]. Slično tome, GAS5 se pokazao i kao sunđer za miR-222, te indirektno su primira PTEN ekspresiju u karcinomu dojke [30].

TP53 je detaljno izučavan tumor supresorski gen koji kodira protein p53 koji reguliše ćelijski ciklus i sprečava karcinogenezu [30]. Stoga se p53 naziva „zaštitnikom genoma“ [31]. Predominantna uloga p53 je da održava genomsku stabilnost i da izbegne nastanak mutacija. Pokazano je da više dnkRNK reguliše p53 mrežu [32,33]. Ranije studije su ukazale na to da je smanjena ekspresija GAS5 asocirana sa zaustavljanjem ćelijskog ciklusa preko povećane p53 ekspresije [32–34]. Kod ćelijske linije kolorektalnog karcinoma pokazano je da je p53 povezan sa nivoima mnRNK koje su nastale iz GAS5 [17]. Stoga, GAS5 možda reguliše p53 ekspresiju preko povratne sprege. Povratna sprega je aktivirana posle DNK oštećenja, pošto GAS5 produkuje mnRNK koje direktno promovišu ekspresiju p53 i inhibiraju G1 fazu ćelijskog ciklusa, što inhibira DNK oštećenje u ćelijama koje prolaze kroz mitozu.

mTOR je uključen u niz signalnih puteva, uključujući ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, autofagiju i apoptozu [35]. Potvrđeno je da GAS5 reguliše mTOR [36,37]. Kada je GAS5 preterano eksprimiran, pokazano je da inhibiše proliferaciju ćelija želuca tako što smanjuje ekspresiju mTOR, što znači da GAS5 ostvaruje svoje biološku funkciju kroz mTOR put [38]. Ovo delovanje ostvaruje tako što inhibiše funkciju miR-106a-5p. U ćelijskoj liniji ezofagealnog karcinoma, pokazano je da je GAS5 ekspresija snižena. Pokazalo se da povećana ekspresija GAS5 inhibiše proliferaciju, migraciju i da smanjuje PI3K ekspresiju, kao i AKT i mTOR fosforilaciju. Ovo ukazuje na to da GAS5 svoj efekat ostvaruje kroz PI3K/mTOR put u ezofagealnim karcinomskim ćelijama [39,40].

miRNK su klasa RNK kratke dužine koje su brojne kod eukariota [41]. Prethodne studije su pokazale da je GAS5 u bliskom odnosu sa brojnim miRNK [42–44]. Na primer, studije su pokazale da postoji povratna sprega između GAS5 i miR-21. U ovom slučaju, GAS5 indukuje smanjenu ekspresiju miR-21 kako bi pokrenula translaciju bitnih gena, uključujući PTEN i PDCD4 [45,46]. Dodatno je pokazano da GAS5 vezuje miR-103 kako bi povećala PTEN ekspresiju [19]. Dodatno, povećana ekspresija GAS5 može dovesti do povećane ekspresije receptora za oslobađanje kortikotropina 1, samim tim i do dugoročne aktivacije hipotalamo-pituitarno-adrenalne ose, verovatno zato što GAS5 inhibira miR449a [47].

Glukokortikoidni receptori (GR) su važni članovi familije nuklearnih receptora i oni su uobičajeni transkripcioni regulatori koji zavise od nivoa hormona [48]. Po vezivanju hormona, GR reguliše ekspresiju ciljnih gena, kao što su apoptotski geni *cAP2* i *SGK1*, tako što interaguju sa elementom glukokortikoidnog odgovora (eng. GRE) [14]. GAS5 i GR interaguju tako što GAS5 se ponaša kao sunđer za GR, što ukazuje na to da GAS5 može biti biomarker glukokortikoidne senzitivnosti ili rezistencije [49]. Prethodne studije su pokazale da GAS5 kompetira sa GRE kako bi se vezao za DNK-vezujući domen (DBD) na GR [50,51]. Ovaj proces blokira GR vezivanje za GRE, samim tim sprečavajući transkripcionu aktivnost ciljnih gena [52]. Dakle, GAS5 deluje kao riborepresor za GR.

AKT signalni put predstavlja put signalne transdukcije koji promoviše preživljavanje i rast ćelije kao odgovor na vanćelijske signale. Aktivacija AKT puta se odigrava kroz niz različitih signalnih puteva, kao što su MAPK, PI3K/AKT i mTOR. AKT put je povezan sa proliferativnim i invazivnim sposobnostima tumorskih ćelija. GAS5 služi važnoj ulozi u regulaciji AKT puta [53,54]. Ranije studije su pokazale da GAS5 interaguje sa PDCD4 proteinom [55,56]. Pokazano je da GAS5 reguliše ekspresiju PDCD4 tako što cilja miR-21 i indirektno inhibira PI3K/AKT signalni put [57]. Takođe, kompetitivnim vezivanjem za miR-532-5p, GAS5 pospešuje inhibiciju PI3K/AKT signalnog puta [58].

GAS5 U HEMATOLOŠKIM MALIGNITETIMA

Genomsko profilisanje hematoloških maligniteta dovelo je do otkrića velikog broja genetičkih markera koji su značajni u kliničkoj praksi za dijagnozu, prognozu i izbor terapije [59].

Iako je pokazano da „dugačke nekodirajuće RNK“ (dnkRNK) igraju važnu ulogu u patogenezi karcinoma, njihov uticaj na nastanak leukemija je veoma malo izučavan. U slučaju akutne mijeloidne leukemije (AML), najčešćeg hemato-loškog maligniteta kod odraslih, pokazano je da je uvećana ekspresija GAS5 povezana sa citogenetski lošom grupom rizika, a samim tim i sa kraćim ukupnim preživljavanjem obolelih [60,61]. Ovo je u suprotnosti sa pretpostavljenom ulogom GAS5 kao tumor-supresor gena koji inhibira proliferaciju i promoviše apoptozu. Međutim, pokazano je da pojedine varijante u genu za GAS5 mogu predstavljati rizik za pojavu AML [51]. GAS5 je i od velikog značaja za B-ALL koju karakteriše visoka hiperdiploidija odnosno prisustvo t(1;19)(q23;p13) translokacije (TCF3/PBX1 rearanžman), a njen značaj je povezan sa terapijskom primenom glukokortikoida [62,63]. Takođe, značaj GAS5 u ALL se ogleda i u tome što se putem negativne korelacije između ekspresije GAS5 i miR-222 vrši modulacija proliferacije, apoptoze i invazije leuke-mijskih ćelija, te je stoga smanjenje ekspresije GAS5 povezano sa progresijom B-ALL [43]. U slučaju dečje akutne limfoblasne leukemije, pokazano je da nivo ekspresije gena za GAS5 može biti prediktor odgovora na terapiju u po-četnoj fazi lečenja, indukcija remisije [62].

U studiji Isin M et al. koja je izučavala visinu ekspresije cirkulišuće GAS5 kod drugih B neoplazmi, hroničnoj limfocitnoj leukemiji (HLL) i multiplom mijelomu (MM), detektovani su kontradiktorni rezultati [64]. U MM njegova ekspresija je bila smanjena, dok je u HLL ekspresija GAS5 bila nešto viša od one detektovane kod zdravih kontrola. Smanjenje ekspresije GAS5 je u skladu sa njegovom tumor-supresorskom ulogom, a takođe je pokazano da GAS5 štiti leukemij-ske ćelije od anti-proliferativnog efekta hemoterapije [65]. Sa druge strane pokazano je da GAS5 predstavlja glavni regulator preživljavanja ćelija limfoidne loze, pa nije čudno što je GAS5 ekspresija povišena u slučaju HLL [66]. U slučaju „mantle“ ćejskog limfoma pokazano je da regulacija ekspresije GAS5 može imati uticaja na bolje preživljavanje [67].

GAS5 U GINEKOLOŠKIM KARCINOMIMA

U karcinomu cerviksa (KC), koji predstavlja jedan od najčešćih uzroka smrti kod žena, GAS5 ima ulogu tumor-su-presora i njegova ekspresija je smanjena, što za posledicu ima uvećanje ekspresije miR-196a i miR-205. Ove miRNK svoju onkogenu ulogu vrše preko „forkhead box protein O1“ - FOXO1, odnosno „phosphatase and tensin homolog“ - PTEN, uvećavajući proliferaciju, ćelijski rast, invazivnost i migraciju tumorskih ćelija [68,69]. Preko miR-21, GAS5 može uticati na prevazilaženje cisplastinske rezistencije u KC [70]. Prediktivni modeli su pokazali da GAS5 može delovati kao molekulski „sunđer“ za miR-106b, promovišući proliferaciju, a inhibirajući apoptozu endometrijalnih ćelija [71]. Kompleks GAS5/miR-106b vodi ka povećanoj senzitivnosti tumorskih ćelija na primenjenu radijacionu terapiju [72]. Takođe, u KC smanjena ekspresija GAS5 može biti posledica poremećene metilacije u GAS5, što sve govori u prilog tome da ova dnkRNK predstavlja potencijalni biomarker za ovo oboljenje [73]. Slično je i kod karcinoma jajnika, još jednom čestom vrstom ginekološkog karcinoma, gde je smanjenje ekspresije GAS5 takođe u direktnoj vezi sa uznapredovalim stadijumom tumora, i lošom prognozom [74].

GAS5 U GLIOMIMA

Gliom je agresivni maligni tumor mozga, u čijoj patogenezi veliku ulogu imaju epigenetičke promene, između ostalog i aberantna ekspresija regulatornih RNK kao što su dnkRNK. GAS5 u gliomima pokazuje tumor-supresorske karakteristike, tj. njegova ekspresija je smanjena. Obim smanjenja GAS5 je direktno proporcionalan stadijumu bolesti, sa gotovo potpunim izostankom ekspresije GAS5 u uznapredovalim stadijumima tumora [75]. Prema bioinformatičkim predikcijama GAS5 ima više mesta za vezivanje različitih miRNA preko kojih GAS5 obavlja svoju funkciju, kao što su miR-222, miR-10b i miR-196a-5p. Smanjenjem ekspresije GAS5 dolazi do povećanja ekspresije miR-222 koja reguliše proces apoptoze preko članova Bcl2 familije, tačnije preko „Bcl-2-modifying factor“ (Bmf), tumor-supresora čija je ekspresija veoma niska kod glioma. Smanjena ekspresija Bmf ima anti-apoptotski efekat jer dovodi do povećane ekspresije Bcl2, a smanjene ekspresije Bax. Uvećana ekspresija ne samo miR-222, već i miR-221, koja je primećena u kasnijim stadijumima glioma, utiče na smanjenje proteina tirozin fosfataze μ (PTP μ), a kao posledica toga dolazi do povećanja u pokretljivosti ćelija, odnosno do uvećane invazivnosti tumora [76].

miR-196a-5p vrši funkciju onkogena i njena ekspresija u gliomima je uvećana. GAS5 koja ima sposobnost vezivanja za ovu mikro RNK „poništava“ njen onkogeni efekat delovanjem preko „forkhead box protein O1“ - (FOXO1). FOXO1 povećava ekspresiju „phosphotyrosine interaction domain containing 1“ (PID1) i “migration and invasion inhibitory protein” (MIIP), inhibirajući rast tumora i njegovu invazivnost [77].

GAS5 se vezuje i za miR-10b i tako doprinosi sprečavanju daljeg širenja glioma. Ovaj efekat se uspostavlja putem smanjenja ekspresije Sirtuina 1, što dovodi do poremećaja u fosforilaciji fosfatidilinozitol kinaze-3 (PI3K), proteinske kinaze B (AKT), mitogen-aktivirane protien kinaze (MEK) i ekstracelularnim signalom regulisane kinaze (ERK), a takođe dolazi i do uvećanja ekspresije fosfataza i tenzin homologa (PTEN) tumor-supresora. Inhibicijom miR-10b onkogenog

efekta od strane GAS5 dolazi do direktnog smanjenja ekspresije Bcl2, a povećanja ekspresije Bax, što dovodi do aktivacije procesa apoptoze [78].

U gliomima je pokazana povećana ekspresija miR-18a-5p za koju se pretpostavlja da ima onkogenu ulogu kao i u većini drugih tipova karcinoma [79,80]. GAS5, koji ima mesto za vezivanje miR-18a-5p u egzonu 2, vrši represiju miR-18a-5p inhibirajući progresiju tumora [81].

GAS5 se potencijalno vezuje i za miR-34a, a ekspresija navedenih RNK je izrazito smanjena kod glioma [82]. S obzirom na to da miR-34a ima tumor-supresorsku ulogu u gliomima [83], pretpostavlja se da je priroda međusobne interakcije GAS5-miR-34a drugačija od prethodno navedenih primera - GAS5 (tumor-supresor) – miRNA (onkogen). Smatra se da je GAS5-miR-34a interakcija tkivno-specifična, odnosno da zavisi od šire „mreže“ interagujućih molekula, čiji ukupan „neto“ rezultat utiče na progresiju ili inhibiciju tumora.

Još jedna mikro RNK sa tumor-supresorskom ulogom u gliomima je i miR-424. U ćelijama glioma GAS5 povećava ekspresiju tumor-supresorke miR-424 tako što smanjuje metilaciju njenog promotorra stimulišući formiranje polikomb represivnog kompleksa 2 (PRC2) i redukujući nivo DNK-metiltransferaze [84]. Primećeno je da je miR-424 ekspresija znatno smanjena kod glioma i da miR-424 pokazuje tumor-supresorska svojstva inhibirajući invazivnost tumorskih ćelija, a promovišući njihovu apoptozu [85]. Rezultati ove studije ukazuju na to da pospešivanje GAS5, odnosno miR-424 može predstavljati nov pristup u terapiji glioma. Naime, visina ekspresije GAS5 ne predstavlja specifičan biomarker glioma, ali je nekoliko studija pokazalo njegov značaj u kombinaciji sa drugim biomarkerima u substratifikaciji pacijenata u određene grupe rizika. Tako na primer, u kombinaciji sa prisustvom mutacija u izocitrat dehidrogenaza 1 genu (*IDH1*), uvećan nivo GAS5 ekspresije kod pacijenata sa II i III stadijumom glioma i sa *IDH1* mutacijom ukazuje na poboljšano preživljavanje [86]. Takođe, pokazano je da nosioci rs145204276 polimorfizma u GAS5 genu pokazuju uvećanu susceptibilnost ka pojavi glioma [87].

GAS5 U KARCINOMU DOJKE

Kod karcinoma dojke (KD), vodećim tipom karcinoma kod žena, ekspresija GAS5 je smanjena i povezana sa lošijim kliničkim parametrima, izostankom receptora za estrogen, većim volumenom tumora i prisustvom metastaza [88]. Nivo GAS5 izmeren u plazmi KD pacijenata pre i posle operacije je pokazao je da se na osnovu cirkulišuće GAS5 može izvršiti preoperativna evaluacija pacijentkinja i predikcija ishoda nakon hirurškog tretmana [89]. Svoju tumor-supresorsku ulogu GAS5 u KD vrši preko različitih mikro RNK, pa tako npr. vezujući se za miR-23a pospešuje autofagiju [90]. Takođe, kod KD pokazano je postojanje negativne povratne sprege GAS5/miR-21, pa uvećanjem ekspresije GAS5 dolazi do derepresije PTEN i do suprimiranja rasta tumorskih ćelija i invazivnosti tumora [19]. Pozitivna korelacija GAS5/PTEN je veoma važna u prevazilaženju rezistencije na tamoksifen. Naime u tamoksifen-rezistentnoj ćelijskoj liniji MCF-7R primećeno je uvećanje ekspresije onkogene miR-222. Međutim, supresijom miR-222 od strane GAS5 dolazi do aktivacije PTEN i do poboljšanja efikasnosti tamoksifenske terapije kod KD [30]. Uvećanje ekspresije GAS5 dovodi do poboljšanog odgovora na konvencionalu hemoterapiju kao što je primena imatinib-a (PI3K/mTOR inhibitora), tako što u prisustvu ovog dvostrukog inhibitora GAS5 pospešuje apoptozu ćelija karcinoma [91].

GAS5 U KARCINOMIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Karcinom pankreasa (KP) predstavlja jedan od najletalnijih tipova pankreasa i u njemu GAS5 obavlja tumor-supresorsku ulogu, tj. njegova ekspresija je značajno smanjena u tumorskom tkivu [92,93]. Smanjena ekspresija GAS5 je detektovana i u uzorcima plazme obolelih, pa GAS5 predstavlja potencijalni biomarker za ranu detekciju KP koji se uglavnom detektuje u kasnim stadijumima oboljenja [28]. GAS5 je negativni regulator za ciklin-zavisnu kinazu 6 (CDK6), pa tako smanjuje proliferaciju izazivajući zaustavljanje ćelijskog-ciklusa [93]. GAS5 učestvuje i u sprečavanju rezistencije na primjenjenu terapiju tako što inhibira miR-181c-5p i suprimira Hippo singnalni put [92]. Preko miR-221/SOCS3 i mir_32-5p/PTEN signalnog puta GAS5 ukida rezistenciju na gemcitabin, inhibira rast tumora i metastaze [28,94].

U karcinomu želuca (KŽ), najčešćem malignom oboljenju na svetu, smanjena ekspresija GAS5 je povezana sa uznapredovalim stadijumom bolesti, veličinom tumora i sa kraćim ukupnim preživljavajem [95,96]. Takođe, utvrđeno je postojanje rs145204276 polimorfizma u GAS5 genu, gde prisustvo del alela ukazuje na malu susceptibilnost za pojavu KŽ, a kod obolelih, del/del genotip je ukazivao na visoku stopu preživljavanja i nisku stopu pojave metastaza [97]. Smanjena ekspresija GAS5 je povezana i sa rezistencijom na adriamicin, a povećanje njegove ekspresije je uticalo na anti-proliferativnu i pro-apoptotsku aktivnost ovog terapeutika [98]. Uticaj GAS5 na proliferaciju ćelija KŽ se vrši direktno regulacijom CDK6, ali i preko miR-222, odnosno preko PTEN/AKT/mTOR signalnog puta koji predstavlja potencijalni target za ciljanu terapiju kod ovog tipa karcinoma [38]. U ostalim gastrointestinalim karcinomima GAS5 ima sličnu ulogu, pa je tako i kod kolorektalnog karcinoma (KRK) smanjena ekspresija GAS5 povezana sa višim tumorskim stadijumom

i veličinom tumora, dok je kod hepatocelularnog karcinoma ona bila povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem [69,95]. U slučaju karcinoma jednjaka, odnosno njegovog najčešćeg tipa, karcinoma skvamoznih ćelija jednjaka, smanjena ekspresija GAS5 je mogla biti detektovana i u tumorskom tkivu i u serumu pacijenata [39]. Zanimljivo je da je u ovoj vrsti karcinoma detektovano da je GAS5 indukovana od strane interferona (IFN), i da tako, preko JAK/STAT signalnog puta, obavlja svoju anti-tumorsku funkciju [40].

GAS5 U UROLOŠKIM MALIGNITETIMA

Među urološkim malignitetima, jedan od najčeće dijagnostikovanih tumora sa veoma lošom prognozom je karcinom bubrega. U tumorskom tkivu detektovano je smanjenje ekspresije GAS5 koje ukazuje na progresiju i recidiv tumora, a takođe predstavlja i nezavisan faktor predikcije dužine trajanja kompletne remisije [99]. Na osnovu ko-ekspresionog profila GAS5 i miR-34 tumor-supresorskih RNK, pacijenti oboleli od karcinoma bubrega mogu biti subklasifikovani u određene grupe rizika, što ukazuje na potencijalni značaj ovih tumor-supresorskih RNK u prognozi i terapiji [82].

Karcinom bešike je još jedan čest tip uroloških karcinoma sa lošom prognozom. Kod njega je niska ekspresija GAS5 povezana sa višim stadijumom bolesti i sa kraćim trajanjem kompletne remisije [100]. Pored toga, kod neinvazivnog mišićnog karcinoma bešike niska ekspresija GAS5 je u jasnoj vezi sa visokom EORT („European Organization for Research and Treatment of Cancer“) grupom rizika. Kod ove grupe karcinoma bešike, koja je prisutna u oko 70% slučajeva, GAS5 se ponaša kao nezavisni prognostичni biomarker [101]. U karcinomu bešike je pokazano da GAS5 direktno interaguje sa E2F transkripcionim faktorom 4 (EZH2) na nivou iRNK, inhibirajući ga, i tako promoviše apoptozu tumorskih ćelija [102]. Takođe, GAS5 interakcijom sa CDK6 ima uticaja i na proliferaciju [103], a uvećana ekspresija GAS5 dovodi do ukidanja rezistencije na doksorubicin [100].

Karcinom prostate je najčešće detektovani malignitet muške populacije. Kod ovog tipa karcinoma GAS5 ima ulogu kompetirajuće endogene RNK za miR-223. Smanjena ekspresija GAS5 utiče na rast tumora tako što umanjuje aktivnost miR-223 koja inhibitorno deluje na rast ćelija, apoptozu i invaziju [99]. Pored ekspresije GAS5, na predikciju ishoda karcinoma prostate utiče i prisustvo polimorfizama rs145204276 i rs55829688 u GAS5 genu, a na prognozu i ukupno preživljavanje pacijenata u mnogome utiče i aktivnost GAS5/miR-21/PTEN i GAS5/miR-1284/AKT signalnog puta [56]. Sve navedeno ukazuje na veliki značaj GAS5 u karcinomu prostate, ne samo kao dijagnostičkog markera već i kao targeta za ciljanu terapiju.

GAS5 U KARCINOMU PLUĆA

Tumor supresorska uloga GAS5 je ispitivana i u nemikroćelijskom karcinomu pluća, najčešćem histološkom tipu raka pluća prisutnom u oko 80% slučajeva. Nađeno je da je GAS5 ekspresija smanjena u tumorskom tkivu i da je direktno povezana sa kliničko-patološkim parametrima kao što su uznapredovali stadijum bolesti i veličina tumora [104]. Kod obolelih, nivo GAS5 je bio nizak i u uzorcima plazme, a pokazano je da nakon izvršene operacije uklanjanja tumora dolazi do znatnog povećanja njegove ekspresije, što je bilo povezano sa povoljnom prognozom [105,106]. Regulišući ekspresiju TP53 i E2F transkripcionog faktora 1 (E2F1) i inhibirajući miR-23a, GAS5 značajno utiče na smanjenje proliferacije i invazivnost tumorskih ćelija, a promoviše njihovu apoptozu [104,107]. Kao i kod nekih drugih tipova karcinoma, detektovana je povezanost rs145204276 polimorfizma u GAS5 genu sa susceptibilnošću za pojavu karcinoma pluća, a prisustvo del/del alela je bilo povezano sa višom ekspresijom GAS5 [108].

Smanjena ekspresija GAS5 je bila povezana i sa pojmom rezistencije na primjenjenu terapiju. Naime, GAS5/miR-21/PTEN signalni put utiče na senzitivnost tumora na cisplatin, pa uvećanje ekspresije GAS5 dovodi do aktivacije cisplatin-indukovane apoptoze [109]. Forsirana ekspresija GAS5 inhibira tumorogenezu i uvećava osetljivost tumorskih ćelija na radioterapiju direktnom interakcijom sa miR-135b [110]. I u slučaju EGFR-tirozin kinaznih inhibitora, nađeno je da uvećana ekspresija GAS5 doprinosi prevazilaženju rezistenciju na terapiju ovim lekovima [25].

ZAKLJUČAK

GAS5 je duga nekodirajuća RNK, čija uloga nije dovoljno izučena. Doduše, jasno je da zaustavlja ćelijski ciklus i da podstiče apoptozu u ćelijama. Međutim, mehanizmi preko kojih ostvaruje svoje dejstvo u različitim bolestima su dovoljno specifični da zavređuju posebnu pažnju, kao što je i pokazano u mnogobrojnim istraživanjima. Iako postoje tri opšta oblika delovanja GAS5, molekuli na koje on deluje se razlikuju međusobno kada su različita patološka stanja u pitanju. Shodno tome, GAS5 treba dalje proučavati, pogotovo u kontekstu njegovog uticaja na interindividualne razlike kada je u pitanju odgovor na terapiju kod različitih stanja.

GAS5 ima važnu ulogu u karcinogenezi, a njena aberantna ekspresija pospešuje proliferaciju i migraciju, a ukida apoptozu tumorskih ćelija. Brojne studije na različitim tipovima karcinoma su pokazale da GAS5 ima dijagnostički i prognostički značaj, odnosno da se može koristiti kao molekularni marker samostalno, ili u kombinaciji sa drugim molekularnim i kliničkim karakteristikama. Novija istraživanja su usmerena ne samo ka određivanju ekspresije GAS5 u tumorskom tkivu već i ka detekciji cirkulišuće, tzv. „cell-free“ GAS5. Naime, iskorišćena je činjenica da su dncRNK veoma stabilne u cirkulaciji i da ekspresija GAS5 u ovim uzorcima oslikava stanje obolelih pre, a naročito nakon operacije uklanjanja primarnog tumora. Na taj način primenom neinvazivne metode, detektovana ekspresija GAS5 može biti indikator prisustva minimalne rezidualne bolesti, odnosno ranog relapsa. Tumor-supresorka uloga GAS5 ukazuje i na to da ona može biti iskorišćena kao target za primenu ciljane terapije, a u nekim tipovima karcinoma, indukcija uvećane ekspresije GAS5 je osnova za prevazilaženje rezistencije na već primenjenu terapiju.

U skorije vreme, personalizovana medicina se fokusirala na razvoj oblasti nužnih za individualizaciju terapije, kao što su farmakogenomika i farmakotranskriptomika [111]. Varijante u transkriptomu, koje se odnose i na ekspresiju GAS5, sve više su u fokusu biomedicinskih istraživanja.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

- Dunham I, Kundaje A, Aldred S, Collins P, Davis C, Doyle F, et al. The ENCODE Project Consortium: An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. 2012. *Nature* 489: 57–74. *Nature*. 2012 Sep 5;489:57–74.
- Hon C-C, Ramilowski JA, Harshbarger J, Bertin N, Rackham OJL, Gough J, et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature* 2017 Mar 9;543(7644):199–204.
- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*. 2012 Sep;22(9):1775–89.
- Kornienko AE, Dotter CP, Guenzl PM, Gisslinger H, Gisslinger B, Cleary C, et al. Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biol*. 2016 Jan 29;17:14.
- Quek X, Thomson D, Maag J, Bartonicek N, Signal B, Clark M, et al. lncRNAdb v2.0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D168–73.
- Ng S-Y, Johnson R, Stanton LW. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *EMBO J*. 2012 Feb 1;31(3):522–33.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1311–23.
- Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song J-J, Lee JT. Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. *Science* (80-). 2008 Aug 2;322(5902):750–6.
- Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*. 2011 Oct 14;147(2):358–69.
- Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*. 2011 Feb 10;470(7333):284–8.
- Yoon J-H, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell*. 2012 Aug 24;47(4):648–55.
- Ma C, Shi X, Zhu Q, Li Q, Liu Y, Yao Y, et al. The growth arrest-specific transcript 5 (GAS5): a pivotal tumor suppressor long noncoding RNA in human cancers. *Tumor Biol*. 2016;37(2):1437–44.
- Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*. 1988;54(6):787–93.
- Tani H, Torimura M, Akimitsu N. The RNA Degradation Pathway Regulates the Function of GAS5 a Non-Coding RNA in Mammalian Cells. *PLoS One*. 2013 Jan 30;8(1):e55684.
- Mourtada-Maarabouni M, Hedge VL, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT. Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *J Cell Sci*. 2008 Apr 1;121(7):939–46.
- Jiang L, Wang C, Shen X. LncRNA GAS5 suppresses ER stress-induced apoptosis and inflammation by regulating SERCA2b in HG-treated retinal epithelial cell. *Mol Med Rep*. 2020;22(2):1072–80.
- Krell J, Frampton AE, Mirnezami R, Harding V, De Giorgio A, Roca Alonso L, et al. Growth arrest-specific transcript 5 associated snoRNA levels are related to p53 expression and DNA damage in colorectal cancer. *PLoS One*. 2014 Jun 13;9(6):e98561–e98561.
- Qian X, Xu C, Zhao P, Qi Z. Long non-coding RNA GAS5 inhibited hepatitis C virus replication by binding viral NS3 protein. *Virology*. 2016;492:155–65.
- Zhang Z, Zhu Z, Watabe K, Zhang X, Bai C, Xu M, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. *Cell Death Differ*. 2013/08/09. 2013 Nov;20(11):1558–68.
- Liu X, Jiao T, Wang Y, Su W, Tang Z HC. Long non-coding RNA GAS5 acts as a molecular sponge to regulate miR-23a in gastric cancer. *Minerva Med*. 2016;
- Luo G, Liu D, Huang C, Wang M, Xiao X, Zeng F, et al. LncRNA GAS5 Inhibits Cellular Proliferation by Targeting P27<sup>Kip1</sup>;

- Mol Cancer Res. 2017 Jul 1;15(7):789 LP – 799.
- 22. Eilebrecht S, Wilhelm E, Benecke B-J, Bell B, Benecke AG. HMGA1 directly interacts with TAR to modulate basal and Tat-dependent HIV transcription. *RNA Biol.* 2013/02/07. 2013 Mar;10(3):436–44.
 - 23. Aminian K, Mashayekhi F, Mirzanejad L, Salehi Z. A functional genetic variant in GAS5 lncRNA (rs145204276) modulates p27kip1 expression and confers risk for gastric cancer. *Br J Biomed Sci.* 2019;76(2):83–5.
 - 24. Hu G, Lou Z, Gupta M. The Long Non-Coding RNA GAS5 Cooperates with the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E to Regulate c-Myc Translation. *PLoS One.* 2014 Sep 8;9(9):e107016.
 - 25. Dong S, Qu X, Li W, Zhong X, Li P, Yang S, et al. The long non-coding RNA, GAS5, enhances gefitinib-induced cell death in innate EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma cells with wide-type EGFR via downregulation of the IGF-1R expression. *J Hematol Oncol.* 2015 Apr 29;8:43.
 - 26. Liu SD, Meng WX, Xu L, Chi C, Sun X, Liu HY. GAS5 promotes myocardial apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury via upregulating LAS1 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(23):8447–53.
 - 27. Xing Y, Lin NU, Maurer MA, Chen H, Mahvash A, Sahin A, et al. Phase II trial of AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation. *Breast Cancer Res.* 2019 Jul 5;21(1):78.
 - 28. Gao Z-Q, Wang J-F, Chen D-H, Ma X-S, Wu Y, Tang Z, et al. Long non-coding RNA GAS5 suppresses pancreatic cancer metastasis through modulating miR-32-5p/PTEN axis. *Cell Biosci.* 2017 Dec 4;7:66.
 - 29. Zhang X-F, Ye Y, Zhao S-J. LncRNA Gas5 acts as a ceRNA to regulate PTEN expression by sponging miR-222-3p in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget.* 2017 Dec 16;9(3):3519–30.
 - 30. Gu J, Wang Y, Wang X, Zhou D, Shao C, Zhou M, et al. Downregulation of lncRNA GAS5 confers tamoxifen resistance by activating miR-222 in breast cancer. *Cancer Lett.* 2018;434:1–10.
 - 31. Silva JL, Lima CGS, Rangel LP, Ferretti GDS, Pauli FP, Ribeiro RCB, et al. Recent Synthetic Approaches towards Small Molecule Reactivators of p53. *Biomolecules.* 2020 Apr 20;10(4):635.
 - 32. Mazar J, Rosado A, Shelley J, Marchica J, Westmoreland TJ. The long non-coding RNA GAS5 differentially regulates cell cycle arrest and apoptosis through activation of BRCA1 and p53 in human neuroblastoma. *Oncotarget.* 2017 Jan 24;8(4):6589–607.
 - 33. Dong P, Xiong Y, Yue J, J B Hanley S, Kobayashi N, Todo Y, et al. Exploring lncRNA-Mediated Regulatory Networks in Endometrial Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Advances and Challenges. *Cancers (Basel).* 2019 Feb 16;11(2):234.
 - 34. Ye D, Bao Z, Yu Y, Han Z, Yu Y, Xu Z, et al. Inhibition of cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells by Ribavirin: Implication for its cardiac developmental toxicity. *Toxicology.* 2020;435:152422.
 - 35. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci.* 2020 Mar 10;10:31.
 - 36. Yacqub-Usman K, Pickard MR, Williams GT. Reciprocal regulation of GAS5 lncRNA levels and mTOR inhibitor action in prostate cancer cells. *Prostate.* 2015 May 1;75(7):693–705.
 - 37. Li H, Liu Y, Huang J, Liu Y, Zhu Y. Association of genetic variants in lncRNA GAS5/miR-21/mTOR axis with risk and prognosis of coronary artery disease among a Chinese population. *J Clin Lab Anal.* 2020 Oct;34(10):e23430–e23430.
 - 38. Li Y, Gu J, Lu H. The GAS5/miR-222 Axis Regulates Proliferation of Gastric Cancer Cells Through the PTEN/Akt/mTOR Pathway. *Dig Dis Sci.* 2017;62(12):3426–37.
 - 39. Wang G, Sun J, Zhao H, Li H. Long Non-Coding RNA (lncRNA) Growth Arrest Specific 5 (GAS5) Suppresses Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Migration by Inactivating Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Pathway. *Med Sci Monit.* 2018 Oct 28;24:7689–96.
 - 40. Huang J, Li Y, Lu Z, Che Y, Sun S, Mao S, et al. Long non-coding RNA GAS5 is induced by interferons and plays an antitumor role in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2018 May 9;7(7):3157–67.
 - 41. Rustagi Y, Jaiswal HK, Rawal K, Kundu GC, Rani V. Comparative Characterization of Cardiac Development Specific microRNAs: Fetal Regulators for Future. Vol. 10. *PLoS one.* 2015. p. e0139359.
 - 42. Shen X, Zhang Y, Wu X, Guo Y, Shi W, Qi J, et al. Upregulated lncRNA-PCAT1 is closely related to clinical diagnosis of multiple myeloma as a predictive biomarker in serum. *Cancer Biomarkers.* 2017;18:257–63.
 - 43. Jing Z, Gao L, Wang H, Chen J, Nie B, Hong Q. Long non-coding RNA GAS5 regulates human B lymphocytic leukaemia tumourigenesis and metastasis by sponging miR-222. *Cancer Biomarkers.* 2019;26:385–92.
 - 44. Wang W, Jia Y, Yang Y, Xue M, Zheng Z, Wang L, et al. LncRNA GAS5 exacerbates renal tubular epithelial fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of miR-96-5p. *Biomed Pharmacother.* 2020;121:109411.
 - 45. Chen D, Guo Y, Chen Y, Guo Q, Chen J, Li Y, et al. LncRNA growth arrest-specific transcript 5 targets miR-21 gene and regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis through PTEN. *Cancer Med.* 2020 Apr;9(8):2846–58.
 - 46. Lyu K, Xu Y, Yue H, Li Y, Zhao J, Chen L, et al. Long Noncoding RNA GAS5 Acts As A Tumor Suppressor In Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Via miR-21. *Cancer Manag Res.* 2019 Sep 17;11:8487–98.
 - 47. Nemoto T, Kakinuma Y, Shibasaki T. Impaired miR449a-induced downregulation of Crhr1 expression in low-birth-weight rats. *J Endocrinol.* 2015; 224(2):195–203.
 - 48. Weikum ER, Okafor CD, D'Agostino EH, Colucci JK, Ortlund EA. Structural Analysis of the Glucocorticoid Receptor Ligand-Binding Domain in Complex with Triamcinolone Acetonide and a Fragment of the Atypical Coregulator, Small Heterodimer Partner. *Mol Pharmacol.* 2017 Jul;92(1):12–21.
 - 49. Lucafo M, De Iudicibus S, Di Silvestre A, Pelin M, Candussio L, Martelossi S, et al. Long Noncoding RNA GAS5: A Novel Marker Involved in Glucocorticoid Response. *Current Molecular Medicine.* 2015; 15: 94–9.
 - 50. Gharesouran J, Taheri M, Sayad A, Ghafouri-Fard S, Mazdeh M, Omrani MD. The Growth Arrest-Specific Transcript 5 (GAS5) and Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1 (NR3C1): Novel Markers Involved in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Cell Med.* 2018;7(2):102–10.
 - 51. Ketaf FNG, Gharesouran J, Ghafouri-Fard S, Dastar S, Mazraeh SA, Hosseinzadeh H, et al. Dual biomarkers long non-coding RNA GAS5 and its target, NR3C1, contribute to acute myeloid leukemia. *Exp Mol Pathol.* 2020;114:104399.
 - 52. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal.* 2010 Feb 2;3(107):ra8–ra8.
 - 53. Chen L, Ren P, Zhang Y, Gong B, Yu D, Sun X. Long non-coding RNA GAS5 increases the radiosensitivity of A549 cells through interaction with the miR-21/PTEN/Akt axis. *Oncol Rep.* 2020 Mar;43(3):897–907.
 - 54. Dong Z, Li S, Wang X, Si L, Ma R, Bao L, et al. lncRNA GAS5 restrains CCl4-induced hepatic fibrosis by targeting miR-23a through the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2019 Feb 8;316(4):G539–50.

55. Xiang W, Li Z, Lin Z, You K, Pan M, Zheng G. Association between indel polymorphism (rs145204276) in the promoter region of lncRNA GASS5 and the risk of febrile convulsion. *J Cell Physiol.* 2019;1-9.
56. Zhu L, Zhu Q, Wen H, Huang X, Zheng G. Mutations in GASS5 affect the transformation from benign prostate proliferation to aggressive prostate cancer by affecting the transcription efficiency of GASS5. *J Cell Physiol.* 2019 Jun 1;234(6):8928-40.
57. Zhou X-H, Chai H-X, Bai M, Zhang Z. LncRNA-GASS5 regulates PDCD4 expression and mediates myocardial infarction-induced cardiomyocytes apoptosis via targeting MiR-21. *Cell Cycle.* 2020 Jun 2;19(11):1363-77.
58. Li J, Lv H, Che Y-Q. Long non-coding RNA Gas5 potentiates the effects of microRNA-21 downregulation in response to ischaemic brain injury. *Neuroscience.* 2020;437:87-97.
59. Marjanovic I, Kostic J, Stanic B, Pejanovic N, Lucic B, Karan-Djurasevic T, et al. Parallel targeted next generation sequencing of childhood and adult acute myeloid leukemia patients reveals uniform genomic profile of the disease. *Tumor Biol.* 2016;37(10):13391-401.
60. Zimta A-A, Tomuleasa C, Sahnoune I, Calin GA, Berindan-Neagoe I. Long Non-coding RNAs in Myeloid Malignancies. *Front Oncol.* 2019 Oct 18;9:1048.
61. Yan H, Zhang D-Y, Li X, Yuan X-Q, Yang Y-L, Zhu K-W, et al. Long non-coding RNA GASS5 polymorphism predicts a poor prognosis of acute myeloid leukemia in Chinese patients via affecting hematopoietic reconstitution. *Leuk Lymphoma.* 2017 Aug 3;58(8):1948-57.
62. Gasic V, Stankovic B, Zukic B, Janic D, Dokmanovic L, Krstovski N, et al. Expression Pattern of Long Non-coding RNA Growth Arrest-specific 5 in the Remission Induction Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Med Biochem.* 2019 May 11;38(3):292-8.
63. Rodriguez PD, Paculova H, Kogut S, Heath J, Schjerven H, Fretze S. Non-Coding RNA Signatures of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 7;22(5):2683.
64. Isin M, Ozgur E, Cetin G, Erten N, Aktan M, Gezer U, et al. Investigation of circulating lncRNAs in B-cell neoplasms. *Clin Chim Acta.* 2014;431:255-9.
65. Mourtada-Maarabouni M, Hasan AM, Farzaneh F, Williams GT. Inhibition of human T-cell proliferation by mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists requires noncoding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GASS5). *Mol Pharmacol.* 2010 Jul;78(1):19-28.
66. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer.* 2011;104(7):1168-77.
67. Mourtada-Maarabouni M, Williams GT. Role of GASS5 Noncoding RNA in Mediating the Effects of Rapamycin and Its Analogue on Mantle Cell Lymphoma Cells. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2014 Dec 1;14(6):468-73.
68. Yang W, Hong L, Xu X, Wang Q, Huang J, Jiang L. LncRNA GASS5 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer by downregulating miR-196a and miR-205. *Tumor Biol.* 2017 Jul 1;39(7):1010428317711315.
69. Liu L, Meng T, Yang X-H, Sayim P, Lei C, Jin B, et al. Prognostic and predictive value of long non-coding RNA GASS5 and microRNA-221 in colorectal cancer and their effects on colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion. *Cancer Biomarkers.* 2018;22:283-99.
70. Wen Q, Liu Y, Lyu H, Xu X, Wu Q, Liu N, et al. Long Noncoding RNA GASS5, Which Acts as a Tumor Suppressor via microRNA 21, Regulates Cisplatin Resistance Expression in Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2017 Jul;27(6):1096-108.
71. Yang W, Xu X, Hong L, Wang Q, Huang J, Jiang L. Upregulation of lncRNA GASS5 inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cells. *J Cell Physiol.* 2019 Dec 1;234(12):23571-80.
72. Gao J, Liu L, Li G, Cai M, Tan C, Han X, et al. LncRNA GASS5 confers the radio sensitivity of cervical cancer cells via regulating miR-106b/IER3 axis. *Int J Biol Macromol.* 2019;126:994-1001.
73. Yang X, Xie Z, Lei X, Gan R. Long non-coding RNA GASS5 in human cancer. *Oncol Lett.* 2020 Sep;20(3):2587-94.
74. Ma N, Li S, Zhang Q, Wang H, Qin H, Wang S. Long non-coding RNA GASS5 inhibits ovarian cancer cell proliferation via the control of microRNA-21 and SPRY2 expression. *Exp Ther Med.* 2018 Jul;16(1):73-82.
75. Zhao X, Wang P, Liu J, Zheng J, Liu Y, Chen J, et al. Gass5 Exerts Tumor-suppressive Functions in Human Glioma Cells by Targeting miR-222. *Mol Ther.* 2015 Dec;23(12):1899-911.
76. Quintavalle C, Garofalo M, Zanca C, Romano G, Iaboni M, del Basso De Caro M, et al. miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPu. *Oncogene.* 2012;31(7):858-68.
77. Zhao X, Liu Y, Zheng J, Liu X, Chen J, Liu L, et al. GASS5 suppresses malignancy of human glioma stem cells via a miR-196a-5p/FOXO1 feedback loop. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2017;1864(10):1605-17.
78. Ding Y, Wang J, Zhang H, Li H. Long noncoding RNA-GASS5 attenuates progression of glioma by eliminating microRNA-10b and Sirtuin 1 in U251 and A172 cells. *BioFactors.* 2020 May 1;46(3):487-96.
79. Wu W, Zhou X, Yu T, Bao Z, Zhi T, Jiang K, et al. The malignancy of miR-18a in human glioblastoma via directly targeting CBX7. *Am J Cancer Res.* 2017 Jan 1;7(1):64-76.
80. Song Y, Wang P, Zhao W, Yao Y, Liu X, Ma J, et al. MiR-18a regulates the proliferation, migration and invasion of human glioblastoma cell by targeting neogenin. *Exp Cell Res.* 2014;324(1):54-64.
81. Liu Q, Yu W, Zhu S, Cheng K, Xu H, Lv Y, et al. Long noncoding RNA GASS5 regulates the proliferation, migration, and invasion of glioma cells by negatively regulating miR-18a-5p. *J Cell Physiol.* 2019 Jan 1;234(1):757-68.
82. Toraih EA, Alghamdi SA, El-Wazir A, Hosny MM, Hussein MH, Khashana MS, et al. Dual biomarkers long non-coding RNA GASS5 and microRNA-34a co-expression signature in common solid tumors. *PLoS One.* 2018 Oct 5;13(10):e0198231-e0198231.
83. Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M, Durooux M. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol.* 2013 Feb;47(1):131-44.
84. Jin C, Zhao J, Zhang Z-P, Wu M, Li J, Xiao G-L, et al. Long non-coding RNA GASS5, by up-regulating PRC2 and targeting the promoter methylation of miR-424, suppresses multiple malignant phenotypes of glioma. *J Neurooncol.* 2020;148(3):529-43.
85. Jin C, Li M, Ouyang Y, Tan Z, Jiang Y. MiR-424 functions as a tumor suppressor in glioma cells and is down-regulated by DNA methylation. *J Neurooncol.* 2017;133(2):247-55.
86. Wang Y, Xin S, Zhang K, Shi R, Bao X. Low GASS5 Levels as a Predictor of Poor Survival in Patients with Lower-Grade Gliomas. *J Oncol.* 2019 Feb 3;2019:1785042.
87. Yuan J, Zhang N, Zheng Y, Chen Y-D, Liu J, Yang M. LncRNA GASS5 Indel Genetic Polymorphism Contributes to Glioma Risk Through Interfering Binding of Transcriptional Factor TFAP2A. *DNA Cell Biol.* 2018;37(9):750-7.
88. Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GASS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene.* 2009;28(2):195-208.
89. Han L, Ma P, Liu S-M, Zhou X. Circulating long noncoding RNA GASS5 as a potential biomarker in breast cancer for assessing the surgical effects. *Tumor Biol.* 2016;37(5):6847-54.

90. Gu J, Wang Y, Wang X, Zhou D, Wang X, Zhou M, et al. Effect of the LncRNA GAS5-MiR-23a-ATG3 Axis in Regulating Autophagy in Patients with Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(1):194–207.
91. Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145(2):359–70.
92. Gao Z-Q, Wang J, Chen D-H, Ma X-S, Yang W, Zhe T, et al. Long non-coding RNA GAS5 antagonizes the chemoresistance of pancreatic cancer cells through down-regulation of miR-181c-5p. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:809–17.
93. Lu X, Fang Y, Wang Z, Xie J, Zhan Q, Deng X, et al. Downregulation of gas5 increases pancreatic cancer cell proliferation by regulating CDK6. *Cell Tissue Res.* 2013;354(3):891–6.
94. Liu B, Wu S, Ma J, Yan S, Xiao Z, Wan L, et al. lncRNA GAS5 Reverses EMT and Tumor Stem Cell-Mediated Gemcitabine Resistance and Metastasis by Targeting miR-221/SOCS3 in Pancreatic Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018 Dec 7;13:472–82.
95. Sun M, Jin F, Xia R, Kong R, Li J, Xu T, et al. Decreased expression of long noncoding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer.* 2014 May 6;14:319.
96. Guo X, Deng K, Wang H, Xia J, Shan T, Liang Z, et al. GAS5 Inhibits Gastric Cancer Cell Proliferation Partly by Modulating CDK6. *Oncol Res Treat.* 2015;38(7–8):362–6.
97. Li Q, Ma G, Guo H, Sun S, Xu Y, Wang B. The Variant rs145204276 of GAS5 is Associated with the Development and Prognosis of Gastric Cancer. *J Gastrointest Liver Dis.* 2018 Mar 31;27(1 SE-Original Article).
98. Zhang N, Wang A-Y, Wang X-K, Sun X-M, Xue H-Z. GAS5 is downregulated in gastric cancer cells by promoter hypermethylation and regulates adriamycin sensitivity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(15):3199–205.
99. Dong X, Kong C, Liu X, Bi J, Li Z, Li Z, et al. GAS5 functions as a ceRNA to regulate hZIP1 expression by sponging miR-223 in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2018 Aug 1;8(8):1414–26.
100. Zhang H, Guo Y, Song Y, Shang C. Long noncoding RNA GAS5 inhibits malignant proliferation and chemotherapy resistance to doxorubicin in bladder transitional cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79(1):49–55.
101. Avgeris M, Tsilimantou A, Levis PK, Tokas T, Sideris DC, Stratidimos K, et al. Loss of GAS5 tumour suppressor lncRNA: an independent molecular cancer biomarker for short-term relapse and progression in bladder cancer patients. *Br J Cancer.* 2018 Dec;119(12):1477–86.
102. Wang M, Guo C, Wang L, Luo G, Huang C, Li Y, et al. Long noncoding RNA GAS5 promotes bladder cancer cells apoptosis through inhibiting EZH2 transcription. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 14;9(2):238.
103. Liu Z, Wang W, Jiang J, Bao E, Xu D, Zeng Y, et al. Downregulation of GAS5 promotes bladder cancer cell proliferation, partly by regulating CDK6. *PLoS One.* 2013 Sep 17;8(9):e73991–e73991.
104. Mei Y, Si J, Wang Y, Huang Z, Zhu H, Feng S, et al. Long Noncoding RNA GAS5 Suppresses Tumorigenesis by Inhibiting miR-23a Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol Res.* 2017 Jul 5;25(6):1027–37.
105. Vesovic N, Tosic N, Karan Djurasevic T, Andric Z, Zdravkovic D, Pavlovic S, et al. Expression pattern of circulating long non-coding RNA GAS5 as a novel biomarker in non-small cell lung cancer patients. *Arch Med Sci.* 2020; <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.98815>
106. Tan Q, Zuo J, Qiu S, Yu Y, Zhou H, Li N, et al. Identification of circulating long non-coding RNA GAS5 as a potential biomarker for non-small cell lung cancer diagnosis non-small cell lung cancer, long non-coding RNA, plasma, GAS5, biomarker. *Int J Oncol.* 2017;50(5):1729–38.
107. Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Kong R, Chen F, et al. A critical role for the long non-coding RNA GAS5 in proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *Mol Carcinog.* 2015 Jul 1;54(S1):E1–12.
108. Li W, Huang K, Wen F, Cui G, Guo H, Zhao S. Genetic variation of lncRNA GAS5 contributes to the development of lung cancer. *Oncotarget.* 2017; 8: 91025–9.
109. Cao L, Chen J, Ou B, Liu C, Zou Y, Chen Q. GAS5 knockdown reduces the chemo-sensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell to cisplatin (DDP) through regulating miR-21/PTEN axis. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:570–9.
110. Xue Y, Ni T, Jiang Y, Li Y. Long Noncoding RNA GAS5 Inhibits Tumorigenesis and Enhances Radiosensitivity by Suppressing miR-135b Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol Res.* 2017 Sep 21;25(8):1305–16.
111. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Zukic B, Gasic V, Dokmanovic L. Pharmacogenomic and Pharmacotranscriptomic Profiling of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Paving the Way to Personalized Treatment. *Genes (Basel).* 2019 Mar 1;10(3):191.

Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka

Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov

Institut za nuklearne nauke "Vinča", Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: bojana86@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Karcinom rektuma (KR) čini oko 30% svih slučajeva kolorektalnih karcinoma (KRK), koji se u zadnje vreme proučava kao zaseban klinički entitet. Aktuelan terapijski pristup u lečenju lokalno uznapredovalih stadijuma KR podrazumeva primenu preoperativne hemioradioterapije (HRT), nakon koje sledi hirurško uklanjanje tumora. Iako se ovim tretmanom postiže bolja lokalna kontrola bolesti, individualni odgovor na primjenjenu terapiju je varijabilan i ukazuje na značajnu biološku heterogenost tumora u okviru istog kliničkog stadijuma. Stoga je u cilju kreiranja i primene personalizovane terapije neophodno definisati prediktivne i prognostičke molekularne parametre. Primenom PCR metode specifične za metilaciju (MSP), ispitivan je metilacioni status gena *p16INK4a* i *p14ARF*, dok je automatskim sekvenciranjem analiziran mutacioni status gena *KRAS* u pre-tretmanskim biopsijama tumorskog tkiva obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu, kao bi se utvrdio njihov potencijalni prediktivni i prognostički značaj. Rezultati ove studije su pokazali da ispitivane promene u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* pojedinačno gledano, nisu značajni prediktivni i prognostički faktori kod obolelih od KR, mada je istovremeno prisustvo metilacije gena *p14ARF* i mutacije gena *KRAS* povezano sa agresivnjim ponašanjem tumora, dok je istovremeno prisustvo izmena u sva tri ispitivana gena povezano sa kraćim ukupnim preživljavanjem. Međutim, kombinovane analize genetičkih, epigenetičkih i imunohistohemijskih parametara (EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67), mogu imati klinički značaj u identifikaciji podgrupa obolelih, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na HRT, tako i prema toku i ishodu bolesti.

Ključne reči: karcinom rektuma (KR), metilacija, mutacija, *p16INK4a*, *p14ARF*, *KRAS*

Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in humnan rectal carcinoma

Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov

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

Correspondence: bojana86@vin.bg.ac.rs

Abstract

Rectal carcinoma (RC) represents approximately 30% cases of colorectal carcinomas (CRC), which is nowadays studing as a distinct clinical entity. The current management of locally advanced rectal carcinoma involves neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) prior to surgery. Despite improved local control rate, individual patient response to CRT is variable and may reflect heterogeneous biological properties among tumors of the same clinical stage. So, there is utility to define predictive and prognostic molecular parameters of response and to personalize therapeutic approach. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to examine *p16INK4a* and *p14ARF* methylation status, while *KRAS* mutation status was analyzed by direct sequencing in pretreatment tumor biopsies of patients with locally advanced RC, in order to evaluate its potential predictive and/or prognostic role. According to the results of this study, examined molecular changes of *p16INK4a*, *p14ARF* and *KRAS* genes, considering separately, were not proven to be significant predictive and prognostic factors in RC patients, although simultaneous presence of *p14ARF* methylation and *KRAS* mutation was associated with more aggressive tumor behavior, while concurrent presence of genetic/epigenetic alteration in all three examined genes was correlated with shorter overall survival. However, combined analyses of genetic, epigenetic and immunohistochemical parameters (EGFR, VEGF, Bcl-2 and Ki-67), could have important clinical relevance in identification of RC patients subgroups, with distinct pattern of response to CRT and disease outcome.

Keywords: Rectal Carcinoma (RC), Methylation, Mutation, *p16INK4a*, *p14ARF*, *KRAS*

UVOD

Kolorektalni karcinom (KRK) predstavlja jedno od najčešćih malignih oboljenja gastrointestinalnog trakta, čija učestalost je u stalnom porastu, pogotovo u razvijenijim zemljama. Ovaj tip tumora je trenutno na drugom mestu kao uzročnik smrtnosti od malignih bolesti u svetu [1], te stoga predstavlja globalni zdrastveni problem. Generalno gledano, KRK se može definisati kao skup oboljenja sa različitim kliničkim manifestacijama, u čijoj osnovi leži izrazita heterogenost na molekularnom nivou [2-4]. Poseban klinički izazov jesu uznapredovali stadijumi KRK, koje odlikuje značajna hemiorezistentnost i visok stepen pojave recidiva [5, 6]. S obzirom da aktuelni terapijski pristupi nisu dovoljno efikasni, od posebnog bi značaja bilo pronaći odgovarajući model koji bi predviđao odgovor obolelih na primenjenu terapiju.

KARCINOM REKTUMA

Karcinom rektuma (KR) je posle karcinoma proksimalnog kolona drugi najčešći oblik tumora debelog creva i obuhvata između 28-35% svih slučajeva kolorektalnih karcinoma [7]. Iako se karcinom kolona i karcinom rektuma u epidemiološkim studijama proučavaju kao jedan klinički entitet, sve je više podataka koji ukazuju na to da KR predstavlja zaseban klinički entitet sa znatnim specifičnostima u pogledu patogeneze koji zahteva drugačiji terapijski pristup u odnosu na karcinom kolona [8, 9].

TERAPIJSKI PRISTUP U LEČENJU KARCINOMA REKTUMA

Osnovni i najvažniji vid lečenja kolorektalnih karcinoma je odstranjivanje tumora hirurškim putem. U slučaju lokalne proširenosti bolesti, kombinovana primena hirurgije, radioterapije i hemoterapije predstavlja „zlatni standard“ u lečenju obolelih. Aktuelan terapijski pristup u lečenju lokalno uznapredovalih stadijuma KR podrazumeva primenu preoperativne (neoadjuvantne) hemioradioterapije (HRT), nakon koje sledi operativni tretman [10, 11]. Pored toga što je primena preoperativne HRT manje toksična i što znatno smanjuje tumorsku masu i olakšava operativni zahvat, efikasnost ovog tretmana se ogleda i u značajno smanjenju učestalosti lokalnih recidiva i dužem ukupnom preživljavanju obolelih [10, 12]. Međutim, individualni odgovor pacijenata na preoperativnu HRT je varijabilan. Kompletan patološki odgovor (pKO), odnosno redukcija tumorske mase, postiže se kod samo 10-20% ispitanika [13, 14], dok u 30% slučajeva odgovor u potpunosti izostaje [15, 16].

124

PREDIKTIVNI FAKTORI TUMORSKOG ODGOVORA NA PREOPERATIVNU HRT

S obzirom da odgovor na preoperativnu HRT nije uniforman, od kliničke važnosti je identifikovati pacijente kojima će primjenjeni tretman biti od koristi u daljem toku lečenja, a sa druge strane izbeći neželjene efekte zračenja i hemoterapeutika kod pacijenta sa tumorom rezistentnim na terapiju [17]. Brojni ispitivani biomarkeri dovode se u vezu sa stadijumom bolesti i krajnjim ishodom, a kategorisani su kao prediktivni i prognostički parametri. U eri napretka personalizovane medicine, krajnji cilj je definisati molekularne biomarkere u pre-tretmanskim biopsijama KR, koji će pored standardnih kliničko-patoloških parametara, doprineti boljoj stratifikaciji pacijenata i optimizaciji terapijskog režima za svakog pacijenta posebno [18, 19].

Poslednjih godina znatno se ispiće prediktivna uloga brojnih molekularnih parametara u pretretmanskim biopsijama, kao što je nivo ekspresije receptora za epidermalni faktora rasta - EGFR (eng. Epidermal Growth Factor Receptor), vaskularnog endotelnog faktora rasta - VEGF, TP53, timidilat sintaze - TS, Ki-67 (eng. Proliferation - Related Ki-67 Antigen, MKI67), p21 (eng. p21 Protein-Activated Kinase 2; PAK2), Bcl-2 (eng. B-Cell CLL/Lymphoma 2, BCL2), APAF-1 (eng. Apoptotic Protease Activating Factor 1, APAF1) i mnogih drugih [20-22]. Međutim, rezultati istraživanja potencijalnih biomarkera su često kontradiktorni i potrebna je usaglašenost u metodologiji i interpretaciji rezultata da bi ispitivani parametri dobili kliničku primenu [22].

ULOGA METILACIJE GENA P16/NK4A I P14ARF U KOLOREKTALNOJ KANCEROGENEZI

Intezivna istraživanja molekularne patogeneze tumora čoveka u poslednje tri decenije, nedvosmisleno pokazuju da u osnovi etiologije malignih oboljenja leže kako genetičke, tako i epigenetičke promene [5, 23]. Genetičke i epigenetičke aberacije koje leže u osnovi kancerogeneze tumora debelog creva su kompleksne i nisu u potpunosti razjašnjene, ali je opšte prihvaćeno da su različiti molekularni procesi odgovorni za nastanak i razvoj tumora u različitim delovima kolona i rektuma [24]. Najviše ispitivana epigenetička modifikacija kod KRK jeste proces metilacije molekula DNK, pod kojim se podrazumeva kovalentno dodavanje metil grupe na C5 poziciju citozinskog prstena u okviru CpG dinuleotida [25]. Aberantna *de novo* metilacija inače nemetilovanih CpG ostrvaca u okviru promotorskog regiona gena

predstavlja snažan mehanizam suprimiranja njihove ekspresije. Geni *p16INK4a* (eng. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A, p16INK4a) i *p14ARF* (eng. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, CDKN2A alias symbol p14ARF) se nalaze u okviru INK4a/ARF lokusa na hromozomskoj poziciji 9p21, koji je često deletiran ili metilovan u različitim tipovima tumora [26]. Svoju tumor-supresorsku ulogu, kao regulatori ćelijskog ciklusa ostvaruju u okviru dva komplementarna signalna puta, P16INK4a/pRb i P14ARF/p53. Protein P16INK4a je ciklin-zavisni inhibitor koji sprečava fosforilaciju proteina pRb i samim tim zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi [27]. Protein P14ARF indirektno pokreće zastoj ćelijskog ciklusa i pokreće proces apoptoze, tako što ostvaruje interakciju sa proteinom MDM2, koji obeležava protein p53 za degradaciju [28]. Inaktivacija ova dva gena putem hipermetilacije promotrskih regiona rani je i relativno čest događaj tokom kolorektalne kancerogeneze [29-32] i predstavlja važan događaj za patogenezu tumora debelog creva [33, 34]. Međutim, mali je broj studija koje su se bavile ispitivanjem potencijalnih metilacionih markera u cilju predikcije odgovora na preoperativnu HRT kod obolelih od KR [35], tako da prediktivna i prognostička uloga metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF* kod karcinoma rektuma, kao posebnog entiteta nije u potpunosti utvrđena.

ULOGA MUTACIJE GENA KRAS U KOLOREKTALNOJ KANCEROGENEZI

Molekularnu patogenezu tumora debelog creva odlikuju i somatske mutacije proto-onkogena *KRAS* (eng. *Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog*, KRAS) [36], koji kodira mali membrano-vezujući protein sa GTP-aznom aktivnošću i putem prenosa signala preko kinaze MAP ostvaruje važnu ulogu u rastu i deobi ćelija. Kod 30-40% slučajeva KRK detektovane su tačkaste mutacije u genu *KRAS*, najčešće locirane u 12-om i 13-om kodonu egzona 2 [37]. Kao posledica mutacije sintetiše se konstitutivno aktiviran produkt gena *KRAS* sa trajno inhibiranom GTP-aznom funkcijom, što indirektno doprinosi inicijaciji tumora, kao i rastu tumorskih ćelija, njihovom preživljavanju, invaziji okolnog tkiva, angiogenezi i formiranju metastaza. Mutacije u genu *KRAS* smatraju se ranim događajem u kolorektalnoj kancerogeni [36], a s obzirom da je onkogena aktivacija RAS/RAF/MAP signalnog puta uključena u mnoge aspekte malignog procesa, pretpostavlja se da mutacioni status gena *KRAS* može biti prognostički faktor u KRK. Međutim, podaci o prognostičkom značaju mutacionog stausa gena *KRAS* u KRK su kontroverzni i zahtevaju dodatna ispitivanja. Mutacioni status gena *KRAS* koristi se kao molekularni marker odgovora na ciljanu terapiju metastatskog KRK monoklonskim antitelima usmerenim na inhibiciju receptora EGFR [38, 39], dok potencijalni klinički značaj mutacionog stausa gena *KRAS* za predikciju odgovora na HRT kod karcinoma rektuma nije u potpunosti razjašnjen [40-44].

POTENCIJALNI KLINIČKI ZNAČAJ GENA *P16INK4A*, *P14ARF* I *KRAS* U KARCINOMU REKTUMA

Put prenosa signala kinaze MAP [45], kao i regulacija aktivnosti proteina koji maskira pRb [46] i proteina p53 [47] su tri najčešće narušena ćelijska puta u tumorima čoveka. Analiza glavnih učesnika ova tri signalna puta, kao i ispitivanje međuzavisnosti genetičkih/epigenetičkih promena u genima *KRAS*, *p16INK4a* i *p14ARF*, moglo bi značajno doprineti razumevanju molekularne patogeneze karcinoma rektuma kao posebnog entiteta. Rezultati studija kolorektalnog karcinoma su pokazali da protein P14ARF može da reguliše stabilnost proteina P16INK4a [48], kao i da samo prisustvo mutacije u genu *KRAS* može indirektno posredovati u metilaciji INK4a/ARF lokusa [49]. Pored toga, literaturni podaci ukazuju da onkogena aktivacija gena *KRAS*, indukuje zaštitne mehanizme u tumorskoj ćeliji, kao što su onkogenom-indukovana senescencija preko P16INK4a/pRb puta [50], i onkogenom-indukovano zaustavljanje ćelijskog rasta i pokretanje procesa ćelijskog umiranja po tipu apoptoze preko P14ARF/p53 puta [51, 52].

Imajući u vidu gorenavedene činjenice, u ovoj studiji [53] predložen je model istovremene analize epigenetičkih (metilacija gena *p16INK4a* i *p14ARF*) i genetičkih promena (mutacije gena *KRAS*) i nivoa ekspresije odabranih proteina uključenih u proces kancerogeneze (EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki67) u pre-tretmanskim biopsijama tumorskog tkiva obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu. Dobijeni rezultati mogu biti od kliničkog značaja za identifikaciju podgrupa obolelih, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na preoperativnu hemioradioterapiju, tako i prema toku i ishodu bolesti.

ISPITIVANJE METILACIONOG STATUSA GENA *P16INK4A* I *P14ARF* U UZORCIMA TKIVA KR

Rezultati naše studije koja je obuhvatala 63 uzorka [54] su pokazali da je metilacija gena *p16INK4a* odnosno gena *p14ARF* detektovana kod oko 40% (43,3% odnosno 39,6%) ispitanih i učestalost ovih epigenetičkih događaja je u skladu sa drugim studijama na kolorektalnim karcinomima [33, 55-59]. Pored toga, metilacija bar jednog ispitivanog gena detektovana je kod 60,3% ispitanih, dok je istovremena metilacija gena *p16INK4a* i *p14ARF* bila prisutna kod skoro petine obolelih, što ukazuje na to da je epigenetička alteracija ova dva gena relativno čest događaj koji može imati potencijalno važnu ulogu u patogenezi karcinoma rektuma. Podaci iz literature pokazuju da se prisustvo

metilacije gena *p16INK4a* kod KRK uglavnom povezuje sa agresivnijim tokom maligne bolesti i da je metilacija ovog gena zapravo nepovoljan prognostički parametar kod KRK [57, 60, 61]. Slična situacija je i sa prisustvom metilacije gena *p14ARF* koja u jednoj studiji koreliše sa kraćim ukupnim preživljavanjem obolelih od KRK [62], dok rezultati studije Chaar i sar., (2014) sugeriju da bi metilacija gena *p14ARF* mogla biti marker invazivnijih tipova KRK, sa sklonosću ka daljoj progresiji tumora i formiranju lokalnih recidiva i metastaza [63]. Međutim, ispitivanjem potencijalne prediktivne i prognostičke uloge metilacionog stausa gena *p16INK4a* i *p14ARF* u našoj studiji, pokazano je da metilacija ovih gena nije povezana sa odgovorom na primjenjenu HRT, pojmom lokalnih recidiva i ili metastaza i ukupnim preživljavanjem obolelih od KR. Problem u interpretaciji dobijenih rezultata leži u činjenici da podaci o zastupljenosti i ulozi metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF* u kancerogenezi potiču iz studija koje su razmatrale karcinom kolona i karcinom rektuma kao jedan entitet. Za bolje razumevanje uloge metilacionog statusa ispitivanih gena u predikciji odgovora na standardan tretman KR, neophodna je, pre svega, analiza na većem broju uzoraka, pri čemu je bitna usaglašenost u terapijskim režimima, načinu evaluacije odgovora na HRT, kao i stadijumima bolesti ispitanih uključenih u studije, ali i standardizacija metodologije ispitivanja metilacionog statusa.

ISPITIVANJE MUTACIONOG STATUSA GENA KRAS U UZORCIMA TKIVA KR

Procenat detektovanih mutacija u genu *KRAS* u našoj studiji [64] je takođe visok (35%) i u skladu sa rezultatima drugih studija, prema kojima su mutacije u ovom genu prisutne kod 19-48% obolelih od KR [41, 43, 44, 65]. Najčešće detektovani tip mutacije (36%) bila je transverzija G u T na drugoj poziciji kodona 12, što rezultuje u zameni glicina valinom (G12V). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama sprovedenim na obolelima od KRK sa našeg geografskog područja, prema kojima se najveća učestalost ovog tipa mutacije u genu *KRAS* pripisuje izloženosti region-specifičnim karcinogenima [66, 67]. Lako je mutaciona aktivacija gena *KRAS* jedan je od najispitivnijih onkogenih događaja u patogenezi KRK, njegova prognostička i prediktivna uloga u karcinomu rektuma nije u potpunosti definisana. Rezultati studija koje su ispitivale potencijalnu ulogu mutacionog statusa gena *KRAS* kao prediktora odgovora obolelih od karcinoma rektuma na preoperativnu HRT su kontradiktorni. Dok je u određenom broju studija uočena povezanost prisutva mutacija u genu *KRAS* sa nepovoljnijim odgovorom na HRT [68, 43, 44], postoje studije kod kojih ovakve asocijacije nisu uočene [41, 69]. Ipak, treba naglasiti da u ovakvim studijama nisu primenjivani uvek isti hemoterapeutici, kao i da su postojali različiti principi definisanja tumorskog odgovora. Pored toga, često su u analizu mutacionog statusa uključeni i drugi kodoni pored standardnog 12. i 13. kodona gena *KRAS*. U našoj studiji, prisustvo mutacija u genu *KRAS* nije bilo povezano sa odgovorom na HRT, kao ni sa tokom i krajnjim ishodom bolesti. Međutim, kada se posmatraju specifični tipovi mutacija, prisustvo transverzije G u C na drugoj poziciji 12. kodona (G12A) značajno koreliše sa povoljnijim odgovorom na HRT, u poređenju sa ostalim tipovima detektovanih mutacija u ispitivanim kodonima ($p=0,017$). Bez obzira na mali broj uzoraka sa prisutnom mutacijom G12A u ovoj studiji, rezultat je vredan pažnje i zahteva dodatna ispitivanja na većem broju uzoraka. Prethodno objavljeni rezultati su pokazali da različiti tipovi mutacija gena *KRAS* imaju i različit transformišući potencijal na ćelijskom nivou. Rezultati studije Garassino i sar., (2011) pokazali su da različit tip mutacije u okviru 12. kodona gena *KRAS* može biti povezan sa različitim nivoom hemiosenzitivnosti, što se na ćelijskom nivou ogleda u aktivaciji različitih nishodnih puteva prenosa signala u odgovoru na primjenjeni hemoterapeutik [69]. Pored toga, postoji mogućnost da tumori sa određenim tipom mutacije u genu *KRAS* mogu biti povezani sa različitim dodatnim genetičkim alteracijama. Međutim, nema mnogo podataka o uticaju i značaju mutacije tipa G12A (transverzija G u C) u progresiji tumora, verovatno zato što ovaj tip mutacije nije tako čest događaj i predstavlja svega 11% svih detektovanih tipova mutacija u genu *KRAS* kod KRK-a [70]. Kao što je poznato, kolon i rektum kao različite anatomske celine debelog creva izloženi su različitim sredinskim faktorima, a različit tip mutacija može nastati usled dejstva različitih karcinogena [71, 72]. Imajući u vidu navedene činjenice, pretpostavka je da različiti karcinogeni dovode do različitih promena u genomu i doprinose u većoj ili manjij meri tumorskoj progresiji i inazivnosti, što se reflektuje kroz različit tip detektovanih mutacija u genu *KRAS*.

POVEZANOST METILACIJE GENA *P16INK4A* I *P14ARF* SA MUTACIJAMA U GENU *KRAS* U UZORCIMA TKIVA KR

Dobijeni rezultati analize metilacionog statusa gena *p16INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacionog statusa gena *KRAS* u našoj studiji sugeruju da treba sagledati globalni genetički, odnosno epigenetički status tumorskih ćelija, ne samo uticaj pojedinačnih molekularnih događaja na razvoj i progresiju tumora, kao i odgovor tumorskih ćelija na primjenjenu terapiju. Imajući u vidu činjenicu da je inaktivacija lokusa *INK4a/ARF* zabeležena kod 70% slučajeva KRK sa istovremeno prisutnom mutacijom u genu *KRAS* [73-76], ispitivali smo i međusobnu povezanost detektovanih epigenetičkih odnosno genetičkih promena u našoj grupi uzoraka. Lako nije uočena direktna veza između metilacionog statusa gena

p16INK4a, metilacionog statusa gena *p14ARF* i mutacionog statusa gena *KRAS*, pri analizi kombinovanog uticaja promena u navedenim genima na odgovor na HRT, tok i ishod bolesti zabeležena su dva značajna rezultata (Tabela 1.).

Podgrupe ispitanika koje se međusobno razlikuju po odgovoru na terapiju, toku i ishodu bolesti		
1.	mut KRAS (G12A)	Povoljniji odgovor na HRT
2.	mut KRAS + met p14ARF	Češća pojava lokalnih recidiva
3.	mut KRAS + met p16INK4a + met p14ARF	Kraće ukupno preživljavanje
4.	met p16INK4a + visoka eksp. VEGF	Nepovoljniji odgovor na HRT Češća pojava lokalnih recidiva Kraće ukupno preživljavanje
5.	mut KRAS + visoka eksp. VEGF	Nepovoljniji odgovor na HRT Češća pojava lokalnih recidiva Kraće ukupno preživljavanje
6.	met p14ARF + visoka eksp. VEGF	Nepovoljniji odgovor na HRT Češća pojava lokalnih recidiva
7.	met p16INK4a + visoka eksp. EGFR	Povoljniji odgovor na HRT
8.	met p16INK4a + visoka eksp. EGFR + niska eksp. VEGF	Ređa pojava lokalnih recidiva
9.	mut KRAS + visoka eksp. Bcl-2	Nepovoljniji odgovor na HRT
10.	mut KRAS + visoka eksp. Ki-67	Nepovoljniji odgovor na HRT Češća pojava lokalnih recidiva

mut - mutacija; met - metilacija; HRT - hemioradioterapija; eksp. - ekspresija.

Tabela 1. Rezultati kombinovane analize metilacije gena *p16INK4a* i *p14ARF*, odnosno mutacije gena *KRAS* i nivoa ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i Ki-67

Pre svega, izdvojila se podgrupa ispitanika sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p14ARF* i mutacijom gena *KRAS*, kod kojih su značajno češće detekovani lokalni recidivi i/ili metastaze ($p=0,027$). U prethodnim studijama karcinoma rektuma pokazano je da prisustvo mutacije *KRAS* u ranim stadijumima tumora asocira sa pojmom udaljenih recidiva u kasnijim fazama bolesti [77]. Detekcija mutacije ovog gena kod tumora u lokalno uznapredovalim stadijumima KR jeste česta pojava, ali mutacioni status gena *KRAS* nije dovoljan za predikciju agresivnijeg ponašanja tumora i potrebna je analiza i drugih parametara koji bi ukazivali na potencijalni rizik za razvoj recidiva [78]. Efekat istovremenog prisustva metilacije gena *p14ARF* i mutacije gena *KRAS* može se objasniti dobro poznatom fukcijom proteinskog produkta gena *p14ARF* u supresiji ćelijskog rasta u odgovoru na aktivaciju onkogena [51, 52]. Dobijeni rezultat ukazuje na potencijalno sadejstvo promena u ova dva gena u nastanku agresivnije forme tumora. S jedne strane aktivacija onkogena *KRAS* kao inicijalni događaj dovodi do nekontrolisane deobe tumorskih ćelija i daljem rastu potencijalno invazivnog tumora. S druge strane, metilacionom inaktivacijom gena *p14ARF* izostaje zaustavljanje ćelijskog ciklusa i indukovanje apoptoze kao tumor-supresornih mehanizama, što omogućava dalju propagaciju tumora i formiranje lokalnih recidiva. Ovakav model onkogeneze adenokarcinoma duktusa pankreasa pokazan je eksperimentalno na miševima, kod kojih mutacija gena *KRAS* u kombinaciji sa inaktivacijom lokusa *INK4a/ARF* dovodi do ranog formiranja premalignih lezija koje brzo propagiraju ka invazivnim i metastatskim oblicima tumora, dok pojedinačno ovi molekularni događaji ne dovode do formiranja agresivnih formi tumora [79]. Pored toga, među ispitanicima obuhvaćenim ovom studijom izdvojila se i podgrupa obolelih sa istovremeno prisutnom metilacijom gena *p16INK4a* i *p14ARF* i mutacijom u genu *KRAS* kod kojih je zabeleženo statistički značajno kraće ukupno preživljavanje u odnosu na ostale podgrupe pacijenata ($p=0,011$). Iako je broj uzoraka sa navedenim promenama u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* mali (svega 4), dobijeni rezultat nije zanemarljiv i može imati potencijalni prognostički

značaj kod obolelih od KR, uz dodatno ispitivanje na većem broju uzoraka. U studiji autora Serra i saradnika iz 2014. godine, koja je rađena na čelijskim linijama KRK, otkriven je molekularni mehanizam, odnosno signalni protein koji posreduje u metilacionoj inaktivaciji lokusa INK4a/ARF u odgovoru na onkogenu aktivaciju gena *KRAS* [80]. U pitanju je protein ZNF304 (eng. Zinc Finger Protein 304, ZNF304) koji funkcioniše kao transkripcioni represor, odnosno regrutuje represioni proteinski kompleks, uključujući i enzim DNMT1 koji vrši metilaciju i utišavanje ekspresije kompletognog lokusa INK4a/ARF. Pokazano je da ovaj regulatorni protein transkripcije može da indukuje i metilacionu inaktivaciju ekspresije i drugih tumor-supresornih gena uključenih u kancerogenezu KRK.

KOMBINOVANE ANALIZE METILACIJE GENA *P16/INK4A* I *P14ARF*, ODNOSNO MUTACIJE GENA *KRAS* I NIVOA EKSPRESIJE PROTEINA EGFR, VEGF, BCL-2 I KI-67 U UZORCIMA TKIVA KR

S obzirom da promene u ispitivanim genima pojedinačno ne utiču značajno na odgovor na HRT, tok i ishod bolesti, u daljem istraživanju smo analizirali da li istovremeno prisustvo metilacije gena *p16/INK4a* ili *p14ARF*, mutacije gena *KRAS* i izmenjene ekspresije proteina EGFR, VEGF, Bcl-2 i/ili Ki-67 može doprineti definisanju podgrupa obolelih kod kojih će ispitivani molekularni događaji imati precizniju prediktivnu i prognostičku ulogu. U kombinovanoj analizi metilacije gena *p16/INK4a* i *p14ARF*, kao i mutacije gena *KRAS* i različitog nivoa ekspresije odabranih proteina dobijeni su rezultati vredni pažњe koji su sumirani u Tabeli 1.

Rezultati kombinovane analize pokazali su da je istovremeno prisustvo kako metilacije gena *p16/INK4a*, tako i gena *p14ARF* i povišene ekspresije proteina VEGF značajno povezano sa agresivnjim ponašanjem tumora, odnosno sa nepovoljnijim odgovorom obolelih na HRT ($p=0,001$, odnosno $p=0,038$) i trendom ka češćoj pojavi lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,072$, odnosno $p=0,075$). Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) ima glavnu ulogu u procesu nastanaka i razvoja krvnih sudova, kao i u regulaciji premeabilnosti vaskularnih endotelnih ćelija [81]. Proces neovaskularizacije, praćen je povećanjem ekspresijom VEGF i ključan je za dalji rast i širenje tumorskih ćelija [82]. Prema podacima iz literature, kod KRK ekspresija proteina VEGF obično je asociранa sa agresivnjim ponašanjem tumora i lošom prognozom bolesti [83, 84]. Dobijeni rezultati posebno naglašavaju važnu ulogu proteina VEGF u nastanku tumora, kao i ulogu gena *p16/INK4a* i *p14ARF* u supresiji tumorskog rasta. Poznato je da su produkti ova dva gena supresori procesa angiogeneze, odnosno suprimiraju ekspresiju gena VEGF putem inhibicije glavnog regulatornog proteina njegove ekspresije, HIF-1α (eng. Hypoxia-Inducible Factor-1α, HIF-1α) [85]. Iako u našoj studiji nije utvrđena direktna povezanost ekspresije proteina VEGF sa metilacionim statusom gena *p16/INK4a* i *p14ARF*, dobijeni rezultati sugerisu da istovremeno povišena ekspresija ovog faktora i inaktivacija gena *p16/INK4a* ili *p14ARF* može indukovati hemiorezistenciju tumorskih ćelija na primjenjenu HRT. Poznato je da se stvaranjem novih krvnih sudova usled povišene ekspresije VEGF povećava i njihova permeabilnost, što za posledicu ima smanjenu efikasnost usvajanja hemoterapeutika od strane tumorskog tkiva [86]. Pored toga, uočeni trendovi ka češćoj pojavi lokalnih recidiva i/ili metastaza ukazuju da se tumori sa ovakvim molekularnim promenama brže razvijaju i imaju veći invazivni potencijal. Osim toga, uočeno je i značajno kraće ukupno preživljavanje obolelih u našoj studiji kod kojih je istovremeno prisutna metilacija gena *p16/INK4a* i visoka ekspresija proteina VEGF ($p=0,010$). Kombinovan uticaj ova dva molekularna događaja na ukupno preživljavanje ispitanika obuhvaćenih našom studijom može se objasniti time da inaktivacija gena *p16/INK4a* dovodi do nekontrolisane proliferacije tumorskih ćelija i brže progresije ka invazivnjim stadijumima bolesti. Sa druge strane, povišena ekspresija proteina VEGF, koja je inače nezavisan parameter kraćeg ukupnog preživljavanja u našoj studiji, indirektno utiče na krajnji ishod bolesti tako što promoviše stvaranje novih krvnih sudova i dalju invaziju tumorskih ćelija u okolno tkivo. Takođe, ispitanici kod kojih je detektovana mutacija gena *KRAS* i istovremeno visok nivo ekspresije proteina VEGF ispoljavaju značajno nepovoljniji odgovor na primjenjenu HRT ($p<0,001$), dolazi do češće pojave lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,003$), a zabeleženo je i kraće ukupno preživljavanje ($p=0,001$). Prethodno je uočeno da onkogena aktivacija gena *KRAS* u tumorskim ćelijama dovodi značajnog povećanja ekspresije proteina VEGF [87, 88] iako u našoj studiji nije zabeležena značajna asocijacija između mutacionog statusa gena *KRAS* i nivoa ekspresije proteina VEGF. U svakom slučaju, dobijeni rezultat sugerira da mogućnost da istovremeno prisustvo oba navedena molekularna događaja doprinosi agresivnjem ponašanju tumorskih ćelija, usled pojačanog inteziteta proliferacije kao posledice mutacije u genu *KRAS* sa jedne strane i pokretanja procesa neovaskularizacije kao rezultat povišene ekspresije faktora VEGF sa druge strane.

Kombinovanim analizama u našoj studiji uočena je i grupa ispitanika kod kojih je istovremeno prisutna metilacija gena *p16/INK4a* i visoka ekspresija proteina EGFR povezana sa ređom pojavom lokalnih recidiva i udaljenih metastaza ($p=0,038$). Pored toga, identifikovali smo grupu obolelih kod kojih je simultano prisustvo metilacije gena *p16/INK4a*, niske ekspresije proteina VEGF i visoke ekspresije proteina EGFR povezano sa povoljnijim odgovorom na terapiju ($p=0,024$). Dobijeni rezultati nisu još uvek razjašnjeni i zahtevaju detaljnije analize. Receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) pripada ErbB familiji tirozin-kinaznih receptora i ključan je u regulaciji osnovnih čelijskih procesa kao što su proliferacija, preživljavanje, diferencijacija i migracija [89]. U nekoliko studija pokazano je da bazalni nivo ekspresije

proteina EGFR asocira sa lošom prognozom, slabijim odgovorom tumorskog tkiva na terapiju, kao i češćom pojavom recidiva [90-92], što nije slučaj u našoj studiji. Pored toga, u radu autora Zlobec i saradnika iz 2008. godine, pokazano je da je verovatnoća za postizanje kompletног patoloшког odgovora na HRT šest puta veća kod karcinoma rektuma sa pozitivnom ekspresijom proteina EGFR [93]. Takođe je identifikovana grupa ispitanika kod kojih tumori sa pozitivnom ekspresijom proteina VEGF i negativnom ekspresijom proteina EGFR ispoljavaju hemiorezitentnost na terapiju. U studiji koja je obuhvatala obolele od mišićno-invazivnog tumora bešike, ekspresija proteina EGFR isto se pokazala kao povoljan prognostički faktor, odnosno povećan nivo ekspresije ovog proteina bio je značajno povezan sa dužim ukupnim preživljavanjem i ređom pojавom udaljenih metastaza [94]. Rezultati ovih studija sugerisu da povećana ekspresija proteina EGFR utiče na bolju senzitivnost tumorskih ćeja na hemioradioterapiju, što se odražava i na bolji odgovor na HRT. Visok nivo ekspresije proteina EGFR generalno nije povoljan događaj jer dovodi do ubrzane proliferacije tumorskih ćelija. Iako naši rezultati sugerisu da nivo ekspresije ova dva proteina u kombinaciji sa metilacionim statusom gena *p16INK4a* mogu poslužiti u predikciji podgrupe obolelih sa manje agresivnom formom karcinoma rektuma, potrebna su dalja ispitivanja za potvrdu zapaženih asocijacija.

Nepovoljan odgovor na primjenjenu HRT u našoj studiji zabeležen je i kod obolelih sa istovremeno prisutnom mutacijom gena KRAS i visokom ekspresijom proteina Bcl-2 ($p=0,022$). Bcl-2 pripada familiji proteina koji imaju važnu ulogu u regulaciji programirane ćelijske smrti, apoptoze [95]. Svoju anti-apoptotsku funkciju ostvaruje na spolašnjoj membrani mitohondrija, sprečavajući oslobađanje proapoptotičkih faktora koji aktiviraju kaspaze i tako indirektno štiti ćeliju od prerane smrti [96]. Pokazano je da povećana ekspresija ovog proteina predstavlja mehanizam kojim se ćelija štiti od radioterapijom-indukovane apoptoze [22], sa posledičnom pojavom radiorezistencije kod tretiranih ćelija [97-99]. Međutim, nema mnogo podataka kojima se objašnjava uticaj simultanog dejstva onkogene aktivacije gena KRAS i povišene ekspresije proteina Bcl-2 na odgovor na HRT. Iako u našoj studiji nije uočena direktna veza između mutacionog statusa gena KRAS i ekspresije proteina Bcl-2, poznato je da su tumorske ćelije sa mutacijom ovog proto-onkogena otpornije na apoptozu [100]. U cilju boljeg razumevanja našeg rezultata, neophodno je ispitati i druge molekularne regulatore procesa apoptoze, pre svega mutacioni status gena *p53*, za koji je pokazano da ima dominantniju ulogu u patogenezi karcinoma rektuma kao posebnom entitetu, nego kod karcinoma kolona [101].

U daljim kombinovanim analizama, izdvojile su se još dve podgrupe ispitanika kod kojih istovremeno prisustvo mutacije gena KRAS i povišene ekspresije proteina Ki-67 asocira sa nepovoljnim odgovorom na HRT ($p=0,051$), odnosno sa češćom pojавom lokalnih recidiva i/ili metastaza ($p=0,079$). Ekspresija ovog proteina se inače koristi kao pouzdan marker proliferacije ćelija i ima potencijalnu prognostičku ulogu u određenim malignitetima, uključujući i KRK [102, 103]. U radu autora Whoo i saradnika iz 2009. godine, uočen je povećan rizik za nastanak recidiva kod obolelih od adenokarcinoma pluća kod kojih su takođe istovremeno detektovane mutacije gena KRAS i povišena ekspresija proteina Ki-67 [103]. Pošto u većini studija koje su se bavile ispitivanjem prediktivne uloge proteina Ki-67 kod obolelih od KR nije utvrđen uticaj izmenjene ekspresije ovog faktora na odgovor na primjenjenu HRT [17], dobijeni rezultat, svakako treba dodatno proveriti, pogotovo što su uočene asocijacije statistički trendovi.

ZAKLJUČAK

Razultati naše studije su pokazali su da ispitivane promene u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS* pojedinačno gledano, nisu značajni prediktivni i prognostički faktori kod obolelih od KR u lokalno uznapredovalom stadijumu. Međutim, kada sumiramo kombinovane analize metilacionih, odnosno mutacionog statusa ispitivanih gena i nivoa ekspresije odabranih proteina (EGFR, VEGF, Bcl-2, Ki-67), izdvojilo se 10 podgrupa ispitanika sa potencijalnim kliničkim značajem u stratifikaciji obolelih od KR, koje se međusobno razlikuju kako prema odgovoru na HRT, tako i prema toku i ishodu bolesti (Tabela 1.). Dobijeni rezultati su vredni pažnje i ukazuju na potrebu za daljim prospektivnim studijama sa dužim periodom praćenja obolelih, gde su pored ispitivanja promena u genima *p16INK4a*, *p14ARF* i *KRAS*, uključeni i dodatni geni čiji produkti regulišu ćelijske procese kao što su proliferacija, angiogenza i apoptoza.

Kao što je prethodno naglašeno, karcinome kolona i karcinome rektuma možemo posmatrati kao dva odvojena entiteta [8, 9], koje odlikuje različit profil molekularnih promena [101]. Iako za sada ne postoje molekularni prediktori odgovora KR na primjenjenu HRT, definisanje potencijalnih metilacionih markera bi moglo da predvedi odgovor na HRT, što bi doprinelo daljoj individualizaciji tretmana [35]. Međutim, klinička primena metilacionih markera zahteva pre svega usaglašenost u metodama za utvrđivanje metilacionog statusa gena, kao i precizno definisanje uloge metilacije pojedinih gena u predikciji odgovora na terapiju. Pored toga, u cilju bolje stratifikacije obolelih u pogledu predikcije odgovora i prognoze bolesti, metilacione analize treba dopuniti i analizama onih molekularnih parametara za koje je već ustanovljeno da imaju prediktivnu ulogu u KRK, kao što je mutacioni status gena KRAS. Standardizacija primene postojećih biomarkera u kombinaciji sa ispitivanjem novih potencijalnih genetičkih ili epigenetičkih molekularnih parametara pristup je koji vodi ka primeni personalizovane terapije KR u budućnosti.

LITERATURA

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Rev* 2019;14: 89-103.
2. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 2013;19: 619-625.
3. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2014;513: 382-387.
4. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21: 1350-1356.
5. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci* 2013;14: 16365-16385.
6. Kekelidze M, D'Errico L, Pansini M, Tyndall A, Hohmann J. Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation. *World J Gastroenterol* 2013;19: 8502-8514.
7. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics. *Cancer J Clin* 2014;64: 104-117.
8. Carethers JM. One colon lumen but two organs. *Gastroenterology* 2011;141: 411-412.
9. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012;23: 2479-2516.
10. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351: 1731-1740.
11. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radošević-Jelić Lj et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006;355: 1114-1123.
12. Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review and meta-analysis of outcomes following pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Br J Surg* 2012;99: 918-928.
13. Stipa F, Chessin DB, Shia J, Paty PB, Weiser M, Temple LK et al. A pathologic complete response of rectal cancer to preoperative combined-modality therapy results in improved oncological outcome compared with those who achieve no downstaging on the basis of preoperative endorectal ultrasonography. *Ann Surg Oncol* 2006;13: 1047-1053.
14. De Campos-Lobato LF, Stocchi L, da Luz Moreira A, Kalady MF, Geisler D, Dietz D et al. Downstaging without complete pathologic response after neoadjuvant treatment improves cancer outcomes for cIII but not cII rectal cancers. *Ann Surg Oncol* 2010;17: 1758-1766.
15. Beddy D, Hyland JM, Winter DC, Lim C, White A, Moriarty M et al. A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2008;15: 3471-3477.
16. Topova L, Hellmich G, Puffer E, Schubert C, Christen N, Boldt T et al. Prognostic value of tumor response to neoadjuvant therapy in rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2011;54: 401-411.
17. Spolverato G, Pucciarelli S, Bertorelle R, De Rossi A, Nitti D. Predictive factors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Cancers (Basel)* 2011;3: 2176-2194.
18. Karakounis G, Kalady MF. Molecular biology: are we getting any closer to providing clinically useful information? *Clin Colon Rectal Surg* 2017;30: 415-422.
19. Kokelaar RF, Evans MD, Davies M, Harris DA, Beynon J. Locally advanced rectal cancer: management challenges. *Onco Targets Ther* 2016;9: 6265-6272.
20. Zeestraten EC, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Marijnen CA. Prediction in rectal cancer. *Semin Radiat Oncol* 2012;22: 175-183.
21. Milgrom SA, García-Aguilar J. Molecular biomarkers as predictors of response to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Semin Colon Rectal Surg* 2013; 119-124.
22. García-Flórez LJ, Gómez-Álvarez G, Frunza AM, Barneo-Serra L, Martínez-Alonso C, Fresno-Forcelledo MF. Predictive markers of response to neoadjuvant therapy in rectal cancer. *J Surg Res* 2015;194 (1): 120-126.
23. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 2002;196: 1-7.
24. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17: 79-92.
25. Bird AP. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16: 6-21.
26. Rocco J, Sidransky D. p16(INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264: 42-55.
27. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237: 7-13.
28. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Allard L, Chin L et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998;92: 713-723.
29. Trzeciak L, Hennig E, Kolodziejczyk J, Nowacki M, Ostrowski J. Mutations, methylation and expression of CDKN2a/p16 gene in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Cancer Lett* 2001;163: 17-23.
30. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002;160: 1823-1830.
31. Shen L, Kondo Y, Hamilton SR, Rashid A, Issa JP. P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53. *Gastroenterology* 2003;124: 626-633.
32. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005;129: 837-845.
33. Xing X, Cai W, Shi H, Wang Y, Li M, Jiao J et al. The prognostic value of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2013;108: 2542-2548.
34. Chaar I, Amara S, Elamine OE, Khiari M, Ounissi D, Khalfallah T et al. Biological significance of promoter hypermethylation of p14/ARF gene: relationships to p53 mutational status in Tunisian population with colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35: 1439-1449.
35. Williamson JS, Harris DA, Beynon J, Jenkins GJ. Review of the development of DNA methylation as a marker of response to neoadjuvant therapy and outcomes in rectal cancer. *Clin Epigenetics* 2015;7: 70.
36. Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F et al. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis?. *BMC Cancer*. 2008;8: 255.

37. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-684.
38. 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. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-1765.
39. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22: 1535-1546.
40. Luna-Pérez P, Segura J, Alvarado I, Labastida S, Santiago-Payán H, Quintero A. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2000;7: 727-731.
41. Gaedcke J, Grade M, Jung K, Schirmer M, Jo P, Obermeyer C et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiat Oncol* 2010;94: 76-81.
42. Davies JM, Trembath D, Deal AM, Funkhouser WK, Calvo BF, Finnegan T et al. Phospho-ERK and AKT status, but not KRAS mutation status, are associated with outcomes in rectal cancer treated with chemoradiotherapy. *Radiat Oncol* 2011;6: 114.
43. Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2011;254: 486-492.
44. Duldualo MP, Lee W, Nelson RA, Li W, Chen Z, Kim J et al. Mutations in specific codons of the KRAS oncogene are associated with variable resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013;20: 2166-2171.
45. Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L et al. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11: 1618.
46. Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010;16: 1094-1099.
47. Waslylichen AR, Lozano G. Attenuating the p53 pathway in human cancers: many means to the same end. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6: a026211.
48. Kobayashi T, Wang J, Al-Ahmadie H, Abate-Shen C. ARF Regulates the Stability of p16 Protein Via REGy-Dependent Proteasome Degradation. *Mol. Cancer Res. highwire*; 2013;11: 828-833.
49. Serra R, Fang M, Park S, Hutchinson L, Green M. A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *Elife* 2014;3: e02313.
50. Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A et al. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2010;18: 135-146.
51. Palmero I, Pantoja C, Serrano M. P19arf links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 1998;395: 125-126.
52. Berkovich E, Lamed Y, Ginsberg D. E2F and Ras synergize in transcriptionally activating p14arf expression. *Cell Cycle* 2003;2: 127-133.
53. Kožik B. Metilacioni status p16INK4a i p14ARF tumor-supresor gena i prisustvo mutacija KRAS onkogena u korelaciji sa odgovorom na preoperativnu hemioradioterapiju u lokalno uznapredovalom karcinomu rektuma čoveka. Doktorska disertacija, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2020.
54. Kožik B, Kokanov N, Knežević-Ušaj S, Nikolić I, Davidović R, Jovanović-Ćupić S et al. Methylation status of p16 and p14 genes in locally advanced rectal cancer: potential clinical implication. *Arch Biol Sci* 2018;70 (4): 681-90.
55. Veganzones-de-Castro S, Rafael-Fernández S, Vidaurreta-Lázaro M, Orden V, Mediero-Valeros B, Fernández C, Maestro-de las Casas ML. p16 gene methylation in colorectal cancer patients with long-term follow-up. *Revista Española De Enfermedades Dig* 2012;104: 111-117.
56. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60: 129-133.
57. Hibi K, Nakayama H, Koike M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S et al. Colorectal cancers with both p16 and p14 methylation show invasive characteristics. *Jpn J Cancer Res* 2002;93: 883-887.
58. Lee M, Sup Han W, Kyoung Kim O, Hee Sung S, Sun Cho M, Lee SN et al. Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathol Res Pract* 2006;202: 415-424.
59. Kang MY, Lee BB, Ji YI, Jung EH, Chun HK, Song SY et al. Association of interindividual differences in p14ARF promoter methylation with single nucleotide polymorphism in primary colorectal cancer. *Cancer* 2008;112: 1699-1707.
60. Jiang W, Wang PG, Zhan Y, Zhang D. Prognostic value of p16 promoter hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Invest* 2014;32: 43-52.
61. Kim JC, Choi JS, Roh SA, Cho DH, Kim TW, Kim YS. Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2010;17: 1767-1776.
62. Nilsson TK, Lof-Olin Z, Sun XF. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Int J Oncol*. 2013;42: 127-133.
63. Chaar I, Amara S, Elamine OE, Khiari M, Ounissi D, Khalfallah T et al. Biological significance of promoter hypermethylation of p14/ARF gene: relationships to p53 mutational status in Tunisian population with colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35: 1439-1449.
64. Krajinović M, Marković B, Knežević-Ušaj S, Nikolić I, Stanojević M, Nikolić V et al. Locally advanced rectal cancers with simultaneous occurrence of KRAS mutation and high VEGF expression show invasive characteristics. *Pathology Research and Practice* 2016;212 (7): 598-603.
65. Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, Sartori G, Fontana A, Malavasi N et al. Prognostic role of EGFR gene copy number and KRAS mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Br J Cancer* 2010;103: 1019-1024.
66. Urošević N, Krtolica K, Škarlo-Milić A, Knežević-Ušaj S, Dujić A. Prevalence of G-to-T transversions among K-ras oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int J Cancer* 1993;54: 249-254.
67. Krtolica K, Krajinović M, Ušaj-Knežević S, Babić D, Jovanović D, Dimitrijević B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol* 2007;13: 1187-1194.
68. Luna-Pérez P, Segura J, Alvarado I, Labastida S, Santiago-Payán H, Quintero A. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2000;7: 727-731.
69. Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, Rulli E, Martelli O, Farina G et al. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2011;22: 235-237.
70. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90: 675-684.
71. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today. *Natl Canc Inst* 1981;66: 1191-1308.
72. Boyle P. Some recent developments in the epidemiology of colorectal cancer. In: Bleiberg H, Rougier PH, Wilke HJ, eds. *Management of*

- colorectal cancer. Martin Dunitz Ltd, London; 1998. p. 19-54
73. Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Sordat B, Gillet M et al. Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4 genes in colon cancer. *Lab Invest* 2001;81: 217-229.
74. Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C et al. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mut Res* 2003;530: 9-17.
75. Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO et al. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* 2004;3: 28.
76. Kaneda A, Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci* 2011;102: 18-24.
77. Sideris M, Moorhead J, Diaz-Cano S, Bjarnason I, Haji A, Papagrigoriadis S. Kras mutant status, p16 and beta-catenin expression may predict local recurrence in patients who underwent transanal endoscopic microsurgery (tems) for stage i rectal cancer. *Anticancer Res* 2016;36: 5315-5324.
78. Sideris M, Moorhead J, Diaz-Cano S, Haji A, Papagrigoriadis S. KRAS mutant status may be associated with distant recurrence in early-stage rectal cancer. *Anticancer Res* 2017;37: 1349-1357.
79. Aguirre A, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson D, Horner J et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gene Dev* 2003;17: 3112-3126.
80. Serra R, Fang M, Park S, Hutchinson L, Green M. A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *Elife* 2014;3: e02313.
81. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007;102: 1358-67.
82. Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Theodoropoulos VE, Papatheodosiou K, Gazouli M, Bramis J et al. Hypoxia, angiogenesis and apoptosis markers in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2006;21: 248-257.
83. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications. *Am J Clin Oncol* 2006;29: 408-417.
84. Giralt J, Navalpotro B, Hermosilla E, de Torres I, Espin E, Reyes V et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Oncology* 2007;71: 312-319.
85. Lu Y, Zhang X, Zhang J. Inhibition of breast tumor cell growth by ectopic expression of p16/INK4A via combined effects of cell cycle arrest, senescence and apoptotic induction, and angiogenesis inhibition. *J Cancer* 2012;3: 333-344.
86. Azria D, Bibeau F, Barbier N, Zouhair A, Lemanski C, Rouanet P et al. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* 2005;5: 62-71.
87. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55: 4575-4580.
88. Figueras A, Arbos MA, Quiles MT, Viñals F, Germà JR, Capellà G. The impact of KRAS mutations on VEGF-A production and tumour vascular network. *BMC Cancer* 2013;13: 125.
89. Schlessinger J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6: a008912.
90. Giralt J, de las Heras M, Cerezo L, Eraso A, Hermosilla E, Velez D et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: A multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005;74: 101-108.
91. Kim JS, Kim JM, Li S, Yoon WH, Song KS, Kim KH et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66: 195-200.
92. Li S, Kim JS, Kim JM, Cho MJ, Yoon WH, Song KS et al. Epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in locally advanced rectal-cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65: 705-712.
93. Zlobec I, Vuong T, Compton CC, Lugli A, Michel R P, Hayashi S, Jass JR. Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br J Cancer* 2008;98: 450-456.
94. Chakravarti A, Winter K, Wu CL, Kaufman D, Hammond E, Parliament M et al. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invading bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the radiation therapy oncology group. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2005;62: 309-317.
95. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15: 49-63.
96. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275: 1129-1132.
97. Kariya S, Ogawa Y, Yoshida S, Yabuki M, Imajo Y, Utsumi K. X-irradiation enhances the expression of Bcl-2 in HL-60 cells: the resulting effects on apoptosis and radiosensitivity. *Int J Mol Med* 1999;3: 145-152.
98. Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Kosiba T, Fujimoto K et al. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer* 1999;5: 1374-1380.
99. Condon LT, Ashman JN, Ell SR, Stafford ND, Greenman J, Cawkwell L. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. *Int J Cancer* 2002;100: 472-475.
100. Hata AN, Yeo A, Faber AC, Lifshits E, Chen Z, Cheng KA et al. Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers. *Cancer Res* 2014;74: 3146-3156.
101. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenborg EK, Hermans J, Tollenaar RA et al. Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001;195: 171-178.
102. Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, Shibuya K, Fumihiro Shimamura F, Izasa T et al. Ki-67 expression and prognosis for smokers with resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003;75: 1727-1732.
103. Woo T, Okudela K, Yazawa T, Wada N, Ogawa N, Ishiwa N et al. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2009;65: 355-362.

Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi

Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šeletmetjev

Odeljenje za endokrinologiju i radioimunologiju, Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt: marecko@inep.co.rs

Apstrakt

Papilarni tiroidni karcinom (PTK) je najčešći oblik endokrinog maligniteta koji se javlja sa različitim stepenom agresivnosti. Identifikacija pacijenata koji će imati teži klinički tok je jedan od najvećih problema tiroidne onkologije. U ovom radu su predstavljeni savremeni tokovi bazičnih molekularno-bioloških istraživanja sa ciljem selekcije molekularnih markera poboljšanih prognostičkim performansama. Savremeni markeri su podeljeni na: molekularni "background" pacijenta (genski polimorfizmi); preoperativni cirkulišući markeri (tumorska DNK i RNK, tumorske ćelije i ekstracelijske vezikule); intraoperativni markeri; postoperativni markeri (promene na nivou gena i proteina detektovane iz hirurški odstranjenog materijala) koji bi pomogli u proceni opsega hirurškog zahvata i personalizaciji terapijskog toka. Takođe je dat osvrt na prednosti i nedostatke svakog markera kao i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi.

Ključne reči: papilarni tiroidni karcinom, prognostički markeri, molekularna patogeneza

Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice

Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šeletmetjev

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

Correspondence: marecko@inep.co.rs

Abstract

Papillary thyroid carcinoma (PTC), the most common form of endocrine malignancy displays various extents of aggressiveness. Identification of patients who are at risk of developing more severe forms of the disease is of great importance in thyroid oncology. In this review we summarized contemporary basic molecular-biological research aimed to select molecular markers with improved prognostic accuracy. These markers are divided as: patients' molecular background (genetic polymorphisms); preoperative circulating markers (tumor DNA and RNA, tumor cells and extracellular vesicles); intraoperative markers; postoperative markers (changes on genetic and protein levels detected from surgically removed tissue) that could aid the assessment of surgical extent and personalization of therapy. We also elaborated on benefits and disadvantages of each marker and their applicability in clinical practice.

Key words: papillary thyroid carcinoma, prognostic markers, molecular pathogenesis

UVOD

Papilarni tiroidni karcinom (PTK), najčešći oblik endokrinog maligniteta, u većini slučajeva ima dobru prognozu i nizak nivo rekurence. Međutim, zbog nedovoljno razjašnjenih molekularnih događaja, manji broj pacijenata razvija težu kliničku sliku okarakterisanu loko-regionalnom invazijom i metastatskom diseminacijom, što potencijalno rezultuje smrtnim ishodom. Kako incidenca PTK poslednjih decenija beleži rast, postoji sve prisutnija potreba da se identifikuju pacijenti koji će razviti teži tok bolesti, kako bi im se prilagodila terapijska strategija, kako u opsegu operativnog zahvata, tako i postoperativni tok lečenja. Mnoge studije u prošlosti su identifikovale niz kliničkopatoloških parametara indikativnih za predikciju toka PTK. Uopšteno govoreći, ovi faktori se mogu razvrstati u 4 grupe:

1. Pacijentov "background" (podaci o pacijentu, epidemiološki faktori, urođena predispozicija)
2. Preoperativni nalazi (ultrazvuk štitne žlezde i regionalnih limfnih čvorova, citološki nalaz aspirata finom iglom, magnetna rezonanca)
3. Intraoperativni nalazi- nalaz hirurga u toku resekcije (prisustvo ekstratiroidne invazije i uznapredovalost tumora)
4. Postoperativni nalazi (izveštaj patologa sa podacima o histološkom tipu, veličini tumora, ekstratiroidnoj invaziji, multifokalnosti, prisustvu metastaza u limfnim čvorovima ili udaljenih metastaza, TNM stadijum)

U cilju kliničke stratifikacije pacijenata razvijen je niz klasifikacija koji uzimaju u obzir ove faktore. Preoperativni podaci se baziraju na citološkom nalazu dobijenom iz aspirata finom iglom (FNAB eng. fine needle aspiration biopsy), klasifikovan po Bethesda klasifikaciji . Postoperativni nalaz definiše patolog iz arhivskog materijala koristeći TNM klasifikaciju predloženu od strane American Joint Comitee on Cancer (AJCC) koja uzima u obzir sledeće informacije: pol, starost, veličinu tumora, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima i ekstratiroidne invazije. Ipak, trenutna klasifikacija PTK pacijenata suočava se sa nizom ograničenja i izazova. Neadekvatna preciznost, invazivnost pri uzorkovanju, subjektivnost patologa u tumačenju nalaza i nemogućnost predviđanja rekurence su samo neki od njih. Iz tih razloga, već duži niz godina u velikom broju laboratorija vrši se genetička, molekularna i biološka karakterizacija PTK kako bi se identifikovale molekularne promene koje prate tiroidnu onkogenezu, a koje bi bili pogodni kandidati kao molekularni markeri boljih prognostičkih performansi od postojećih.

U ovom radu je dat pregled savremenih istraživanja molekularnih markera u polju prognostike papilarnog tiroidnog karcinoma. Molekularni markeri su grupisani prema podeli iznad, odnosno obrađeni su biomarkeri koji se ispituju kao urođene predispozicije, preoperativni i postoperativni markeri.

134

PROGNOSTIČKI MOLEKULARNI MARKERI U SAVREMENIM ISTRAŽIVANJIMA

1. Pacijentov genetički "background" kao prognostički faktor PTK

Funkcionalni genski polimorfizmi koji se prirodno javljaju u populaciji bilo u promotorskim ili kodirajućim sekvencama gena uglavnom imaju zanemarljiv fenotipski efekat. Međutim, na primeru mnogih patoloških stanja je pokazano da pod određenim uslovima mogu predstavljati predispoziciju za susceptibilnost i klinički tok. U slučaju PTK, nekoliko istraživačkih grupa je dokumentovalo povezanost nasleđenih genetskih varijanti sa agresivnošću maligniteta.

Baysel i saradnici su pokazali da polimorfizam u genu za vitamin D (rs2228570) asocira sa prisustvom limfnih nodalnih metastaza (metastazama u limfnim čvorovima), multifokalnošću i veličinom tumora. Slična studija je identifikovala dva polimorfizma u genu za CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), jedan u promotorskoj (rs4148682) a drugi u kodirajućoj sekvenci (rs213950) sa progresijom bolesti. Obe analizirane alteracije su korelisale sa tumorskom multifokalnošću i metastazama u cervikalnim čvorovima. Još jedna zanimljiva studija je našla povezanost polimorfizma u mikroRNK let-7 (rs10877887 i rs13293512), sa rizikom od razvoja višestrukih tumora i pojavom limfnih metastaza. Na kraju, studija na kohorti pacijenata iz Srbije objavljena 2019. godine od strane naše laboratorije pokazala je povezanost nukleotidne supstitucije u promotoru gena za Matriksnu metaloproteinazu-9 sa razvojem ekstratiroidnih ekstenzija i stadijumom bolesti.

Obzirom da su genetski polimorfizmi urođena osobina, njihovo prisustvo može da se detektuje iz širokog dijapazona bioloških uzoraka pacijenta, što uzorkovanje čini lakis i neinvazivnim. U bazičnim molekularno-biološkim i genetičkim istraživanjima u upotrebi je veliki broj metoda za detekciju genetičkih polimorfizama, baziranih na sekvenciranju, hibridizaciji, enzimskoj digestiji, i drugim post-amplifikacionim metodama baziranim na fizičkim osobinama DNK. Međutim, kako je za primenu u kliničkoj praksi od ključne važnosti i ekonomska isplativost testa, u translatornim istraživanjima se uglavnom ispituje mogućnost primene PCR-RFLP (polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism), kao brza, jednostavna i ekonomična metoda.

2. Preoperativni molekularni markeri

Citološki nalaz dobijen aspiracijom finom iglom iz tiroidnog nodusa trenutno predstavlja zlatni standard u preoperativnoj dijagnostici tumora tiroidee. Međutim, ovo predstavlja agresivnu proceduru potencijalno praćenu komplikacijama, dok je njena pouzdanost narušena mogućnošću da se umesto tumorskih ćelija neselektivno uzorkuje okolno inflamatorno ili nekrotično tkivo. Iz ovog razloga FNAB nije u stanju da da pouzdanu dijagnozu u oko 30% slučajeva, dok je prognostička stratifikacija još nepouzdanija. Novi pristup koji se trenutno ispituje kao alternativa aspiratima je koncept „Tečne biopsije“. Tečna biopsija je nova paradigmata u uzorkovanju i analitici koja se bazira na detekciji biološkog materijala poteklog od tumora iz cirkulacije pacijenta, čineći je daleko manje invazivnom od FNAB-a. Kandidati koji su do sada ispitivani kao cirkulišući markeri progresije PTK su:

Cirkulišuća tumorska DNK (ctDNA)

Cirkulišuća tumorska DNA može biti aktivno otpuštana od strane tumora ili da potiče od razgrađenih tumorskih ćelija koje su prošle kroz apoptozu ili nekrozu. Prednost ctDNA kao tumorskog markera leži u njenoj visokoj stabilnosti, kao i u tome što nosi sve genetske karakteristike primarnog tumora: epigenetske modifikacije, mutacije, mikrosatelitsku nestabilnost i rearanžmane, koji se mogu detektovati kao specifičan "potpis" tumora. Sa druge strane, njeni nedostaci potiču od toga što je prisutna i u drugim patološkim stanjima kao što su inflamacija, trauma tkiva ili hronične bolesti, ali i kod zdravih osoba. Detektuje se digital droplet PCR-om ili sekvenciranjem nove generacije (NGS) iz seruma pacijenata što je za sada čini nedostupnim markerom u standardnoj kliničkoj praksi.

U slučaju PTK, istraživanja ctDNA su još u povoju i za sada se više ispituju kao dijagnostički, a ne prognostički marker. Zane i saradnici su u studiji iz 2013 detektovali veću količinu ctDNA u poodmaklim stadijumima i slabije diferenciranim PTK. Allin i saradnici su kod malog broja PTK pacijenata pomoću ctDNA predikovali pogoršanje bolesti, što markeri u konvencionalnoj upotrebi nisu uspeli. Metaanaliza koja je uključila 9 studija i koja je poređila prisustvo cirkulišuće BRAF V600E mutacije koja je česta u PTK, je objavila veliku heterogenost i nepouzdanost podataka u vezi njihove upotrebljivosti. Zanimljiva studija koja je merila nivo metilacije 5 cirkulišuća gena (CALCA, CDH1, TIMP-3, DAPK, RARB2) je zaključila da metilacioni status predikuje pojavu novih nodusa i rekurencu.

Cirkulišuća tumorska RNK

Tumorske ćelije otpuštaju znatnu količinu svih vrsta RNK u cirkulaciju, i stabilnost pojedinih RNK molekula je začuđujuće velika. Prepostavka je da se ovi molekuli pakuju u ekstraćelijske vezikule ili cirkulišu vezani za proteine, te su time zaštićeni od delovanja serumskih RN-aza. Iako postoji oprečna mišljenja, u slučaju PTK su pronađene informaciona RNK (iRNK), mikro RNK (miRNK) i duge nekodirajuće RNK, IncRNK (eng. long non-coding RNA) čija je deregulacija razmatrana kao tumor-marker.

Od iRNK koje su do sada predložene kao novi marker progresije PTK najviše obećava cirkulišući receptor tireostimulirajućeg hormona (TSHR), koji se detektuje u limfocitnoj frakciji pune krvi i predstavlja surogat marker cirkulišućih tumorskih ćelija. Preoperativno izmerena iRNK TSHR koreliše sa stepenom invazije tumorske kapsule, starošću pacijenta i prisustvom limfnih metastaza. Ovaj marker takođe može poslužiti i u stratifikaciji rizika za papilarni mikrokarcinom; pokazana je njegova pozitivna korelacija sa limfnim metastazama kod pacijenata PTK mikro starijim od 45 god.

MikroRNK (miRNA) su male RNK vrste koje se sastoje od oko 18-25 nukleotida i imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije na posttranskripcionom nivou. Oni se vezuju za nesavršeno komplementarne regije u 3'- netraslatiranim (3'-UTR) regionima informacione RNK i utiču time na njihovu degradaciju ili inhibiciju translacije. MikroRNK su veoma stabilne u cirkulaciji, a zbog njihove deregulisane ekspresije u većini karcinoma, ispituju se kao potencijalni cirkulišući markeri maligniteta.

Yu i saradnici su pokazali da serumski nivoi miR-151-5p korelišu sa veličinom tumora, miR-222 sa stadijumom, a oba korelišu sa limfnim metastazama. Druga studija je ustanovila korelaciju miR-222, miR-221 i miR-146b sa ekstratiroidnom invazijom, višim TNM stadijumom, i limfnim metastazama. Preoperativni i postoperativni cirkulišući nivoi miR-222 i miR-21 su takođe pokazali korelacije sa ekstratiroidnom invazijom i limfnim metastazama. Nekoliko studija nije uspelo da utvrdi povezanost serumskih miR sa parametrima agresivnosti.

Duge nekodirajuće RNK su cirkulišuće RNK dužine preko 200 nukleotida koje ne kodiraju proteine, ali učestvuju u svim aspektima genske regulacije. Imaju ulogu u velikom broju fizioloških i patoloških procesa uključujući malignu transformaciju, pri čemu mogu imati protoonkogensku ili tumor-supresorsku funkciju. Studija objavljena od strane Qiu i saradnika je koristila mikroerejksi čip kako bi uporedila ekspresiju IncRNK između relativno mirnih i agresivnih formi PTK, i zaključila da ENST00000462717 i ENST00000415582 imaju povišenu, a TCONS_00024700 i NR_028494 sniženu ekspresiju kod PTK pacijenata koji su razvili plućne metastaze. Druga studija je našla da deregulacija GAS8-AS1 utiče na progresiju PTK GAS8-AS1.

Cirkulišuće tumorske ćelije

Cirkulišuće tumorske ćelije su ćelije poreklom od primarnog tumora koje su stekle invazivne karakteristike i prešle u krvotok. One su najverovatniji izvor tumorske diseminacije i razvoja udaljenih metastaza što ih potencijalno čini odličnim prediktorom lošeg ishoda bolesti. U slučaju PTK, cirkulišuće tumorske ćelije su nedovoljno ispitane. Zbog kompleksne tehnologije izolacije (obogaćivanje na osnovu specifičnih površinskih markera kao što je EpCAM) i visoke cene eksperimenata, do sada je objavljen mali broj studija sa nedovoljnim brojem uzoraka da bi se doneli validni zaključci u vezi njihove uloge u tiroidnoj onkologiji. Ipak, mali broj studija je objavio obećavajuće rezultate dovodeći ih u vezu sa pojmom udaljenih metastaza i ukupnim preživljavanjem.

Ekstraćelijske vezikule

Ekstraćelijske vezikule su heterogena grupa membranskih vezikula koje ćelija aktivno otpušta u telesne tečnosti. Mogu da nose biomolekule, metabolite, pa čak i organele roditeljske ćelije i smatraju se odrazom molekularnog profila ćelije porekla. Ovo ih čini nosiocem molekularnih informacija i potencijalnih biomarkera u cirkulaciji. Egzozomi su ekstraćelijske vezikule veličine 30-120nm koje su najviše izučavane zbog ustaljenih protokola izolacije. Molekuli egzozomom zaštićeni od degradacije koji imaju najveći potencijal kao prognostički i dijagnostički markeri su miRNK. U slučaju PTK pokazano je da su miR-146b-5p i miR-222-3p egzozomskog porekla dobri prediktori pojave metastaza u limfnim čvorovima i doprinose migratornim sposobnostima tumora, dok miR-485-3p koreliše sa veličinom tumora, pojavom ekstratiroidne invazije, limfnim metastazama i odmaklim stadiumom bolesti. Takođe, miR-34a i miR-17-3p utiču na proliferativnu sposobnost ćelija PTK i razmatraju se kao potencijalni prognostički markeri.

Glavne poteškoće u upotrebi egzozoma kao biomarkera odnose se na njihovu heterogenost i probleme sa izolacijom. Ultracentrifugiranje je najčešći metod izolacije egzozoma, međutim ovaj metod ima slabu reproducibilnost i prinos, i ne diskriminiše egzozome poreklom od tumorskih i zdravih ćelija.

Navedeni analiti prikupljeni tečnom biopsijom, iako predstavljaju intrigantnu i potencijalno obećavajuću alternativu FNAB-u, još uvek su u fazi bazičnih istraživanja i verovatno neće ući u kliničku praksu u doglednoj budućnosti. Rezultati objavljeni od strane različitih istraživačkih grupa su neusaglašeni i obrađeni na malom broju uzoraka, dok je neophodna oprema za njihovu izolaciju skupa i daleko od komercijalne upotrebe. Ipak, ovo je vredno i zanimljivo polje istraživanja koje, zbog brojnih poteškoća sa kojima se suočava savremena tiroidna onkologija, nosi potencijal za kliničku praksu. U nadolazećoj eri personalizovane medicine, preoperativno molekularno-biološko profilisanje tumora pojedinačnih pacijenata neinvazivnim metodama bi donelo brojne prednosti u planiranju operativnog zahvata i postoperativnog tretmana.

3. Intraoperativni molekularni markeri

Intraoperativni molekularni markeri su molekularne informacije o tumorskom potencijalu za širenje koje se mogu dobiti u toku resekcije. Iako spadaju u markere koji se uzorkuju invazivnom metodom, za razliku od postoperativnih markera ipak daju blagovremenu informaciju o neophodnom opsegu operativnog zahvata. Intraoperativni molekularni imidžing je nova tehnologija sa potencijalom da dramatično unapredi hirurške operacije omogućavajući hirurgu da vizualizuje različite delove neoplazme fluorescentnim obeležavanjem. Međutim ova metoda još uvek nije standardizovana u kliničkoj praksi za PTK. Za razliku od toga, intraoperativni "smrznuti isečci" se koriste u tiroidnoj hirurgiji za vizuelizaciju histologije tumora, sa potencijalom i za molekularna ispitivanja.

4. Postoperativni molekularni markeri

Postoperativni molekularni markeri su molekuli čije se prisustvo i karakteristike mogu analizirati iz hirurški odstranjenog tumorskog tkiva. Najčešće ispitivane alteracije su promene u ekspresiji i posttranslacionoj modifikaciji proteina (fosforilacije, glikozilacije, acetilacije) koje se uglavnom detektuju imunohistohemijom i imunoblotom. Takođe se mogu detektovati i genetske promene (mutacije, abnormalna metilacija, genska amplifikacija, pojačana promotorska aktivnost, stabilnost iRNK i alternativni splajsing) metodama baziranim na PCR-u i sekvenciranju. Ovi markeri se mogu ispitati kako na uzorcima svežeg tkiva dobijenog nakon operacije i zamrznutog u tečnom azotu, tako i na arhivskom materijalu (tkivu fiksiranom u formaldehidu i ukalupljenom u parafinu).

4a. Genetički markeri agresivnosti

Genetički markeri progresije tiroidnog karcinoma koji su obrađeni u ovom radu obuhvataju somatske mutacije, izmenjenu ekspresiju kodirajućih RNK (informacionih RNK) i nekodirajućih RNK (miRNK i IncRNK). Somatske mutacije su markeri koji se od ranih 2000.-tih proučavaju u svrhu prognostike PTK. Iako se pojedine somatske mutacije već preporučuju u kliničkoj primeni kao pomoćni tzv "tiebreaker" markeri, za većinu postoji debata u pogledu njihove upotrebljivosti, te one i dalje predstavljaju predmet aktivnog istraživanja. Kao i u slučaju preoperativnih markera, noviji

pravci istraživanja u postoperativnim markerima uzimaju u obzir i deregulaciju miRNK i lncRNK kao prediktore nepovoljnog kliničkog toka PTK.

BRAF V600E

BRAF je serin-treonin kinaza iz RAF familije kinaza koje utiču na RAS/RAF/MEK/ERK signalni put. Mutacije u *BRAF* genu se javljaju u >50% PTK, a 98-99% njih predstavlja *BRAF V600E* mutacija. *BRAF V600E* je tačkasta mutacija u egzonu 15 koja uzrokuje zamenu timina sa adeninom na nukleotidu 1799, što na proteinском nivou ima za posledicu zamenu valina za glutamat. Ova zamena konstitutivno aktivira *BRAF* kinazu, što rezultuje hroničnom stimulacijom MAPK signalnog puta. Na ovaj način, *BRAF V600E* mutacija utiče na signalne puteve koji deluju na agresivnost karcera, preko mehanizama ćelijske adhezije, migracije i invazije.

Osim u papilarnom karcinomu, ova mutacija je pronađena i u 10-20% slabo diferenciranih karcinoma i 20-40% anaplastičnih karcinoma. Obzirom da je kod *BRAF V600E* pozitivnih ATC ista mutacija pronađena i u njegovim dobro diferenciranim regijama, pretpostavlja se da je to jedan od ranih događaja koji predodređuje tumor na dediferencijaciju. Ovo bi ukazivalo da su dobro diferencirani tiroidni karcinomi sa *BRAF V600E* skloniji agresivnjem ponašanju.

Studija koja je prva povezala *BRAF V600E* mutacije sa agresivnošću je objavljena 2015. god i nakon nje su mnoge studije pokazale da *BRAF V600E* koreliše sa kliničko-patološkim faktorima PTK. Dve velike multicentrične studije na 2099 i 1849 pacijenata respektivno su demonstrirale da je *BRAF V600E* mutacija nezavisan prognostički faktor za PTK i koreliše sa PTK-specifičnim mortalitetom. Ipak, ova mutacija je i dalje interesantna za istraživanje jer se tokom godina pojavio i određen broj studija koje su pokazale da ona nije povezana sa progresijom tumora. Rezultati koje je naša laboratorija dobila prilikom analize *BRAF V600E* mutacije i agresivnosti tiroidnog karcera, govore u prilog njenoj povezanosti sa lošijim ishodom. U dve naše studije pokazali smo da PTK pacijenti pozitivni na *BRAF V600E* i sa visokom ekspresijom proteina kaveolina-1 su bili povezani sa agresivnjim varijantama, dok je *BRAF V600E* mutacija sama ili sa visokom ekspresijom EGFR proteina korelisala sa ekstratiroidnom invazijom i metastazama u limfnim čvorovima.

Za papilarne mikrokarcinome niskog rizika (manji od 2mm koji nemaju ekstratiroidnu invaziju ili limfne metastaze) *BRAF V600E* mutacija je predložena kao marker odlučivanja o tretmanu. Za njih se sve više preporučuje kliničko praćenje umesto operacije, zbog njihovog niskog metastatskog potencijala. Ipak jedan deo mikrokarcinoma će razviti metastaze, pa čak biti i fatalan. *BRAF wt* mikrokarcinomi su dokazano niskorizični, te bi terapija ovakvih karcinoma mogla biti manje agresivna.

TERT

TERT (eng. Telomerase reverse transcriptase), predstavlja katalitički domen enzima telomeraze, čija funkcija uključuje dodavanje telomera na krajeve hromozoma čime se održava njihov integritet i genetička stabilnost. *TERT*-om aktivirana telomeraza u toku maligne transformacije ćelije, promoviše ćelijske i molekularne aktivnosti karakteristične za kancer. U promotoru gena za *TERT* su pronađene dve tačkaste mutacije, C228T i C250T koje se međusobno isključuju i povezane su sa malignitetom tiroide. Ove mutacije stvaraju konsenzus mesta za vezivanje određenih transkripcionih faktora što za posledicu ima povećanje transkripcione aktivnosti promotora. Ovo za posledicu ima povećanje ekspresije *TERT-a* na iRNK i proteinском nivou, kao i dužine telomera. Primer za to je vezivanje GABP, ETS transkripcionog faktora koji selektivno vezuje mutantni promotor uzrokujući povećanu transkripciju *TERT-a*.

Kod differentovanog tiroidnog karcinoma *TERT* promotorske mutacije se javljaju sa učestalošću od 10-15%, a kod loše differentovanog i anaplastičnog od 40-45%. Nijedna od ovih mutacija nije detektovana kod benignih tumora. *TERT* promotorske mutacije su veoma jasno povezane sa agresivnošću. Prvo, viša incidenca je detektovana kod agresivnijih i loše differentovanih karcinoma gde su pokazale jaku povezanost sa starošću, veličinom tumora, ekstratiroidnom invazijom, vaskularnom invazijom, metastazama u limfne čvorove i udaljenim metastazama, višim stadijumom i mortalitetom.

TERT mutacije su kao prognostički markeri posebno korisne kada koegzistiraju sa *BRAF V600E* mutacijama ili *RAS* mutacijama. Karcinomi pozitivni na *BRAF V600E* i *TERT* promotorske mutacije čine posebnu agresivnu grupu sa čestim rekurencama i lošim ishodom. U primarnom PTK, učestalost zajedničkih *BRAF* i *TERT* mutacija je 7.7%. Pored velikog broja studija koje su pokazale asocijaciju sa kliničko-patološkim faktorima, dve studije su ubedljivo dokazale da koegzistencija ove dve genetske alteracije predviđa loš tok bolesti. U 2018. god je izašla i studija koja objašnjava ovaj fenomen sa mehaničkičke tačke gledišta. Naime, *BRAF V600E* mutant utiče na konstitutivnu aktivaciju MAP kinaze, i posledično na selektivno vezivanje GABP transkripcioni faktor za *TERT* promotor i malignu transformaciju ćelije.

RET/PTC

RET/PTC je hromozomski rearanžman kod kog se deo *RET* gena fuzioniše sa genima iz prostorno bliskog lokusa, što rezultuje nastankom RET himernih proteina koji su sposobni za ligand-nezavisnu dimerizaciju *RET/PTC* proteina.

Ovo dovodi do hronične stimulacije MAPK ili PI3K/Akt signalnog puta i za posledicu ima proliferaciju folikularnih ćelija. *RET/PTC* rearanžmani su otkriveni u papilarnom tiroidnom karcinomu odakle i potiče njihov naziv, a dva najčešća rearanžmana su *RET/PTC1* i *RET/PTC3*.

Nije do kraja jasno kolika je upotrebljivost *RET/PTC* rearanžmana u prognostici PTK. *RET/PTC1* se povezuje sa boljom prognozom jer se sreće kod manjih, klasičnih PTK, i karcinomima koji se retko dediferenciraju. Za razliku od *RET/PTC1*, *RET/PTC3* se detektuje kod agresivnijeg fenotipa PTK, bilo da je sporadičan ili indukovani radijacijom. *RET/PTC3* rearanžmani su pokazali pozitivnu korelaciju sa veličinom tumora, kasnjim stadijumom i metastatskim širenjem. Studija na 1500 pacijenata je pokazala da uzorci koji nose ove mutacije imaju agresivniji karakter od onih sa *RAS* mutacijama. Ipak, ove studije nisu dovoljno ubedljivo pokazale da se *RET/PTC* rearanžmani mogu upotrebiti u prognostici tiroidnih karcinoma, te je njihova klinička primena za sada ograničena. Rezultati naših istraživanja nisu pokazali da *RET/PTC1* i 3 mutacije imaju kliničku vrednost, u našoj populaciji. One nisu bile značajno češće u malignim tumorima u odnosu na benigne, niti su korelisale sa *BRAF V600E* mutacijom kao markerom agresivnog karaktera.

Kodirajuće RNK

Analiza informacione RNK kao prognostičkog markera je obrađena u malom broju studija sa skromnim zaključcima u pogledu kliničke primene. Jedna studija je ispitivala prognostičku primenu nivoa ekspresije gena koji su markeri tiroidne diferencijacije – TSHR, NIS, Tg i TPO. Pokazano je da nivoi iRNK za tireoglobulin korelišu sa MACIS skorom (MACIS – algoritam za procenu proguze PTK baziran na kliničkopatološkim parametrima). Novija studija Tanake i saradnika je analizirala iRNK ekspresiju TERT gena kao markera progresije. Pokazano je da u slučaju odsustva TERT promotorskih mutacija, nivoi TERT iRNK mogu biti koristan prognostički marker, a kako se TERT mutacije najčešće javljaju kod starijih pacijenata, TERT iRNK je posebno korisna za stratifikaciju rizika kod mlađe populacije.

MikroRNK

Deregulacija mirkoRNK molekula u primarnom papilarnom tiroidnom karcinomu je pokazana u više studija. TCGA analiza je pokazala da se papilarni tiroidni karcinomi mogu klasifikovati u 6 klastera po ekspresiji mirkoRNK molekula, od kojih je klanster 1 grupisao većinu niskorizičnih RAS –pozitivnih pacijenata, a klanster 6 većinu visokočelijskih PTK, histološkog tipa PTK sa agresivnim ponašanjem. Ova analiza je ukazala da se ekspresija mikroRNK molekula u PTK razlikuje prema invazivnom karakteru maligniteta.

Pregled literature prognostičkog potencijala miR u PTK je pokazao da miRNA-221, miRNA-222, miRNA-135b, miRNA-181b, miRNA-146a, i miRNA-146b korelišu sa veličinom tumora, miRNA-146b, miRNA-221, and miRNA-222 sa vaskularnom invazijom, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-146a, miRNA-146b, miRNA-199b-5p, i miRNA-135b sa ekstratiroidnom invazijom, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-21-3p, miRNA-146a, miRNA-146b, i miRNA-199b-5p sa prisustvom limfnih metastaza, a miRNA-146b i miRNA-221 sa pojmom udaljenih metastaza.

Sistematski pregled radova objavljenih na temu asocijacije miRNK i agresivnosti PTK je pokazao da svaki od analiziranih miR molekula (miRNK-21, -34b, -130b, -135b, -146b, -151, -181b, -199b-5p, -221, -222, -21 451, -623, -1271, -2861, i let-7e) koreliše sa bar jednim kliničkopatološkim parametrom loše proguze. Autori su ustanovili da je većina studija dovela u vezu tri miRNK – miR-146b, miR-221 i miR-222 sa nekoliko parametara agresivnosti, pre svega veličinom tumora, ekstratiroidnom invazijom, metastazama u limfnim čvorovima, višim TNM stadijumom.

Meta-analiza koja je uporedila studije koje su se bavile prognostičkim potencijalnom miRNK u dugoročnom praćenju PTK je pokazala da specifične deregulisane mikroRNK mogu da predvide dugoročni ishod bolesti. Već pomenute miR-146b, -221 i -222 su se pokazale kao dobri prognostički markeri za regionalne i udaljene rekurence PTK. U pogledu proguze za ukupno preživljavanje, dve miR sa povišenom (miR-182 i -203) i tri s smanjenom ekspresijom (miR-26a, -381 i -791) su identifikovane kao dobri markeri.

Dugačke nekodirajuće RNK

Slično mikroRNK vrstama, i dugačke nekodirajuće RNK su ispitivane i kao tkivni, postoperativni markeri. IncRNK koje su do sad detektovane kao povišene u PTK, a koje su pokazale korelaciju sa bar jednim od parametara agresivnosti (veličinom tumora, metastazama u limfnim čvorovima, višim TNM stadijumom, multifokalnošću, rezistencijom na ¹³¹I, ekstratiroidnom invazijom ili ukupnim preživljavanjem) su ATB, CTD-3193013, ENSG00000415582, ENSG00000462717, FAL1, HIT000218960, HOTAIR,HOXD-AS1, LOC100507661, NONHSAT076754, NR-036575.1, PANDAR, XLOC-006074 i XLOC-051122. Snižena ekspresija BLACAT1, BANCR, CASC2, H19, GAS5, LINC00271, MEG3, NONHSAG051968, NONHSAT037832, NR-028494, RP5-1024C24.1 i TCONS-00024700 IncRNK koreliše sa bar jednim kliničkopatološkim faktorom. Od pomenutih IncRNK posebno se izdvajaju H19 i NR_036575.1 za koje je ROC analizom izračunata specifičnost >75% za detekciju limfnih nodalnih metastaza; LINC00271 koji može biti nezavisni rizik faktor rekurence PTK; XLOC_051122, XLOC_006074 i Linc00941 koji su analizirane sekvenciranjem RNK, validirane RT-qPCR metodom

i dodatno potvrđene u TCGA studiji kao značajno asocirane sa agresivnošću i BANCR koja je temeljno ispitivana u PTK i za koju je pokazano da igra ulogu u razvoju PTK.

Naša laboratorija se bavila analizom upravo ove IncRNK i ustanovljeno je da ekspresija BANCR u PTK zavisi od prisustva BRAF V600E mutacije. Kod BRAF V600E negativnih PTK, BANCR može da detektuje slučajeve sa ekstratiroidnom invazijom dok promena BANCR eksprezije između tumorskog i susednog normalnog tkiva pokazuje korelaciju sa LNM kod BRAF V600E pozitivnih slučajeva.

4b. Proteinski markeri agresivnosti

Proteinski kandidati-biomerkeri, su oni molekuli koji učestvuju u ključnim ćelijskim procesima kao što su ćelijski rast i diferencijacija, proliferacija i apoptoza, pokretljivost i adhezija, razgradnja okoloćelijskog matriksa itd. Poremećaji u nekom delu ovih bitnih signalnih puteva mogu dovesti do nekontrolisanog rasta i rezistencije na odbrambene ćelijske mehanizme. Samim tim, predstavljaju dobre kandidate za ispitivanje njihove potencijalne uloge u dijagnostici i prognostici tiroidnih karcinoma.

Proteini programirane ćelijske smrti

U normalnim fiziološkim uslovima tkivna homeostaza se ostvaruje održavanjem balansa između programirane ćelijske smrti (apoptoze) i proliferacije. Poremećaji u ovom balansu vode različitim patološkim stanjima koji mogu da rezultuju nekontrolisanom proliferacijom i, posledično, malignom transformacijom. Iz tog razloga, potencijalni postoperativni prognostički markeri mogu da se traže u abnormalnoj ekspreziji ili poremećenom balansu regulatora ovih procesa.

Veliki broj istraživača se bavio analizom deregulacije p53 proteina koji je poznat kao "čuvar genoma" zbog svoje uloge u popravci DNK lanca i regulaciji ćelijskog ciklusa, a takođe funkcioniše i kao transkripcioni faktor za proteine i miRNK koji vrše centralnu ulogu u apoptotskom odgovoru. Jednu od bitnijih uloga p53 ostvaruje preko regulacije transkripcije još jednog proapoptotskog proteina- Bax-a. Hermann i saradnici su zaključili da je prisustvo visoke koncentracije p53 proteina praćeno visokom eksprezijom Bax-a u dobrodiferenciranim karcinomima štitaste žlezde, što dovodi do apoptotske smrti i daje bolju prognozu ovim tumorima. Istraživanja naše grupe su potvrdila odsustvo razlike u ekspreziji Bax-a u grupi dobro diferenciranih karcinoma, ali bez korelacije sa kliničkim parametrima. Ipak, pokazali smo značajnu asocijaciju p53 i Bax-a što sugerira postojanje ćelijskog odgovora na različita apoptotske stimuluse, s tim da ova veza nije dovoljna za realizaciju apoptotske smrti.

Odsustvo korelacije Bax-a kao proapoptotskog proteina sa kliničkopatološkim faktorima PTK motivisalo je istraživače da uzmu u obzir njegov odnos sa antiapoptotskim proteinom Bcl-2 kao prognostički faktor. Bcl-2 reguliše integritet spoljašnje mitohondrijske membrane stvarajući kompleks sa Bax-om. Većina studija je pokazala da se nivo eksprezije Bcl-2 proteina smanjuje u diferenciranim karcinomima u odnosu na normalno tkivo što sugerira da se ova molekulska promena može smatrati ranim znakom tumorogeneze i lošijeg toka bolesti. Naša ispitivanja su, nasuprot tome, pokazala da se nivoi eksprezije Bcl-2 zadržavaju na visokom nivou u dobro diferenciranim karcinomima u odnosu na normalno tkivo, ali da se sinteza ovog antiapoptotskog proteina značajno snižava u slabo diferenciranom anaplastičnom karcinomu. Ipak, imunohistohemiske analize Bcl-2 eksprezije u našim istraživanjima nisu pokazale korelaciju sa tumorskom agresivnošću i prognozom bolesti. Pokazali smo da odnos Bcl-2/Bax značajno opada tokom progresije tiroidnog maligniteta, na osnovu čega bi se moglo očekivati da se kao posledica gubitka Bcl-2 i akumulacije Bax proteina javlja povišen stepen apoptotske smrti. Međutim, uprkos ovakvom odnosu glavnih učesnika u igri život/smrt, do aktivacije programirane ćelijske smrti ne dolazi. Isto tako p53, Bcl-2 i Bax nisu pokazali progostički značaj u predviđanju toka bolesti tiroidno-onkoloških pacijenata, na što ukazuje odsustvo korelacije njihove eksprezije sa kliničko-patološkim parametrima agresivnog ponašanja tumora (limfne metastaze, ekstratiroidna invazija, uznapredovali stadijum bolesti). Razlog za ovaj neuspeh bi se mogao potražiti nizvodno u apoptotskim signalnim putevima, sve do efektorskih molekula-kaspaza.

Još jedan anti-apoptotski protein koji u protekle dve decenije privlači dosta pažnje u oblasti prognostike raznih maligniteta je survivin. Survivin svoju glavnu ulogu u malignoj transformaciji ostvaruje inhibicijom kaspaza i sprečavanjem egzekucije apoptotskog procesa, ali pokazano je da ima i znatno širi spektar delovanja: reguliše ćelijski ciklus i angiogenezu, a pokazana je i njegova veza sa metastatskom diseminacijom.

Kao i većina drugih istraživačkih grupa, i naša je utvrdila povišen nivo eksprezije u tiroidnim tumorima koristeći imunoblot i imunohistohemisku metodu. Čak je u 90% slučajeva karcinomskog tkiva nađeno prisustvo ovog proteina u citoplazmi, bez detekcije eksprezije u okolnom uslovnom nemalignom tkivu čineći ga i dobrim potencijalnim dijagnostičkim merekrom. Pokazali smo da, osim što je zastupljen u većem broju slučajeva u agresivnom anaplastičnom karcinomu (85%) u odnosu na dobro diferenciran PTK (70%), dominantno intenzivo bojenje je bilo prisutno u nediferenciranoj varijanti u odnosu na dominantno umereno u PTK.

Kaspaze predstavljaju glavne izvršioce programirane ćelijske smrti, a među njima najčešće je aktivirana kaspaza-3 koja katalizuje degradaciju velikog broja ključnih ćelijskih proteina. U studiji iz 2013 god koja je obuhvatila 107 slučajeva PTK, autori su pokazali da u predikciji tumorskog ponašanja kaspaza-3 nije dala očekivane rezultate. U kohorti od čak 1900 pacijanata sa ranim stadijumom karcinoma dojke je pokazano je da kaspaza-3 ali ne i -8 povezana sa tumor-specifičnim preživljavanjem i da bi mogla dati korisne informacije o toku bolesti u različitim fenotipovima karcinoma. Obzirom da tumorska ćelija, u cilju sopstvenog preživljavanja pokušava da izbegne proces apoptoze, tako je i nivo sinteze kaspaza deregulisan. To je verovatni uzrok odsustva korelacije između ekspresije kaspaza i agresivnosti karcinoma, te ova egzekutogrna grupa proteina nije atraktivna za ispitivanje prognostičkog potencijala.

Proteini proliferacije i regulatori ćelijskog ciklusa

Od proteina odgovornih za proliferativnu aktivnost ćelije, a koji obećavaju kao postoperativni markeri najviše je izučavan PCNA (proliferating cell nuclear antigen). PCNA je nuklearni protein, kofaktor DNK polimeraze-delta, uključen u replikativnu fazu ćelijskog ciklusa, tako da je njegova sinteza direktno proporcionalna proliferišućim statusu ćelije. PCNA kao marker najagresivnijih formi maligniteta je predlagan još početkom devedesetih godina prošlog veka, a rezultati dobijeni u našoj laboratoriji pokazuju da proliferativna aktivnost progresivno raste od papilarnog mikrokarcinoma, preko klinički manifestnog PTK do anaplastičnog karcinoma. Još jedan potencijalni prognostički marker vezan za rast i proliferativne procese je Ki67. Prospektivna studija rađena na više od 700 slučajeva PTK otkrila je vezu ki67 i veličine tumora, dok je metaanaliza iz 2017 godine našla statističku vezu i sa regionalnim i udaljenim metastazama.

Ciklin D1 je bitan regulator progresije ćelijskog ciklusa i često je dovođen u vezu sa progresijom tumora, mada mu se sa novijim istraživanjima dodeljuju i uloge u ćelijskoj migraciji i invaziji, angiogenezi, indukciji hromozomske nestabilnosti itd. Ekspresija ciklina D1 predstavlja rani događaj u tumorigenezi PTC ali njegova uloga u tumorskoj progresiji nije dovoljno ispitana kao ni njegova potencijalna primena u kliničkoj praksi. Pokazano je da povišena ekspresija ciklina D1 koreliše samo sa prisutvom metastaza u limfnim čvorovima, dok u imunohistohemijskoj studiji koja je obuhvatila 919 pacijenata sa PTK, zaključeno je da nema konzistentne veze između ekspresije ciklina D1 i loših prognostičkih faktora PTK. Bitnije informacije su dobijene na nivou genske ekspreije i moguće veze sa mehanizmom rekurence bolesti.

Proteini angiogeneze

Još jedan proces čije intenziviranje prati nastanak i razvoj epitelnih tumora je angiogeneza. Tumor otpušta u svoju okolinu proangiogenetske faktore koji indukuju stvaranje guste mreže krvnih sudova, omogućavajući tumoru stalni prliv nutrijenata i kiseonika kao i mogućnost metastaziranja. U mnogim humanim malignitetima, uključujući tumor dojke, bešike i stomaka, pokazano je da angiogeneza, merena kao tumorska gustina mikrosudova, koreliše sa razvojem metastaza. Ovaj proces je naročito intenzivan u tumorima endokrinskih organa koje inače karakteriše dobra vaskularizacija i fenestrovani epitel. Kako PTK dominantno diseminuje metastaze limfogenim putem, kao potencijalni marker njegove progresije najviše se izučavao VEGF-C, član porodice proangiogenetskih proteina zadužen za limfangiogenezu. Iz ovog razloga on potencijalno pruža informaciju o tendenciji tumora ka formiranju metastaza u limfnim čvorovima. Ovu pretpostavku podržali su rezultati istraživanja koji su pokazali da je ekspresija VEGF-C povišena u primarnim tumorima pacijenata sa papilarnim karcinomom koji imaju prisutne metastaze u limfnim čvorovima u odnosu na tumore bez metastaza. U ovim slučajevima detektovana je i gušća mreža limfnih sudova kako u tumorskom tako i u peritumorskom tkivu. Rezultati naših istraživanja su pokazali da je VEGF-C eksprimiran na visokom nivou u dobrodiferenciranom PTK ali i u nediferenciranim anaplastičnim karcinomima, sa tendencijom postepenog povećavanja tokom dediferencijacije. Osim u malignim ćelijama, potvrđili smo prisustvo i u endotelu vaskulature, pre svega u okolini malignog tkiva. U poređenju sa kliničko patološkim parametrima, imunohistohemijska analiza ekspresije VEGF-C je pokazala statistički značajnu korelaciju njegove visoke ekspresije i prisustva metastaza u limfnim čvorovima, ekstratiroidne invazije i uznapredovalog kliničkog stadijuma bolesti.

Proteini poreklom iz okoloćelijskog matriksa

Okoloćelijski matriks je dugo smatran za pasivan i stabilan okvir u kome obitavaju ćelije, sa čisto strukturnom, odnosno biomehaničkom ulogom. Danas se zna da je matriks jedna izuzetno dinamična sredina koja recipročno komunicira sa ćelijom, i obezbeđuje kontekstualne informacije odgovorne za kontrolu individualnog i kolektivnog ćelijskog ponašanja regulišući identitet, poziciju, proliferaciju i sudbinu svake ćelije. Zbog toga nije iznenađujuće što matriks tumorske mase poseduje različitu strukturu i molekularni profil od zdravog tkiva, a molekuli čija je ekspresija izmenjena mogu se tretirati kao potencijalni tumor markeri. U slučaju PTK, kao prognostički markeri najviše obećavaju članovi porodice kolagena, glikoproteina, matriksnih metaloproteinaza (MMP) i njihovih tkivnih inhibitora (TIMP). Naša laboratorijska grupa je uložila dosta napora u istraživanje matriksnih metaloproteinaza, ekstraćelijskih enzima odgovornih za

razgradnju okoloćelijskog matriksa, koje fizički krče put pred invazivnim frontom tumora. Najviše smo izučavali MMP-9 i MMP-2 koje imaju sposobnost razgradnje bazalne membrane i omogućavaju prelazak metastatske ćelije u cirkulaciju, kao i njihov inhibitor TIMP-2. U sklopu toga pokazane su značajne statističke asocijacije između imunoekspresije pomenutih markera i karakteristika papilarnog karcinoma koje ukazuju na njegov invazivni potencijal. Visoka imunoekspresija MMP-2 je značajno korelisala sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima dok je TIMP-2 pokazao jače prisustvo u karcinomima većih dimenzija koji su izvršili invaziju na susedno tkivo. Kako se matriksne metaloproteinaze sintetišu kao latentni zimogeni koji se proteolički aktiviraju u okoloćelijskoj sredini, zasebno je imunohistohemijski analizirana aktivna forma MMP-9 kao i zimografski merena proteolitička aktivnost. Imunohistohemijski detektovana aktivna forma MMP-9 se pokazala kao odličan prediktor pojave nepovoljnijih karakteristika papilarnog karcinoma, i korelisala je sa prisustvom limfnih metastaza, ekstratiroidne invazije, stadijumom karcinoma i dubinom njegove neoplastične infiltracije. Uporedna analiza zimografski izmerenih nivoa aktivacije MMP-2 i MMP-9 u papilarnim karcinomima različite agresivnosti je pokazala da je nivo aktivacije MMP-9 je bio značajno viši u uzorcima prezentovanim sa ekstratiroidnom invazijom i limfnim metastazama, kao i u uzorcima sa višim stepenom neoplastične infiltracije i uznapredovalim stadijumom bolesti, u odnosu na karcinome bez ovih karakteristika.

Strukturni proteini citoskeleta

Tumorigenezu karakteriše pojačana depozicija strukturnih proteina koji doprinose sticanju migratornih i invazivnih sposobnosti regulisanju međućelijskih kontakata i izbegavanju prepoznavanja od strane imunog sistema. Citokeratin-19 pripada familiji intermedijalnih filamenata koji učestvuje u izgradnji citoskeleta i čini mehaničku potporu ćelije. Njegova ekspresija se znatno pojačava sa malignom transformacijom. Mnogi autori navode da se javlja u PTK u više od 90% ćelija, dok su naša istraživanja potvrdila njegovu vezu sa prisustvom ekstratiroidne invazije i veličinom tumora.

Kaveolin-1 je mali protein mase 21-22 kDa, iz familije strukturnih proteina kaveolina, glavnih gradivnih jedinica membranskih invaginacija kaveola. Kaveolin-1 stupa u interakciju sa proteinima pričvršćenim na membrani u okviru kaveola i ovom interakcijom modulira njihovu aktivnost. U zavisnosti od vrste protiena sa kojim interreaguje, kaveolin-1 igra tumor promotersku ili tumor supresorsku ulogu. Njegova ekspresija se razlikuje prema histotipovima TK kao i varijantama PTK, a pokazano je da se i njegovi proteinski nivoi razlikuju prema ćelijskim odeljcima.

U našoj laboratoriji je ispitivana ekspresija ovog proteina i na iRNK i proteinskom noviu i pokazana je korelacija kavelina-1 na proteinskom nivou sa kliničko patološkim parametrima u zavisnosti od ćelijskog odeljka. Naime novoi kaveolina-1 u epitelu su bili u pozitivnoj korelaciji sa pojavom limfnih nodalnih metastaza, dok je stromalni kaveolin-1 bio u negativnoj korelaciji sa dubinom neoplastične infiltracije. Posmatrana je i korelacija kaveolina-1 sa BRAF V600E mutacijom kao lošim progostičkim markerom, i pokazano je da stromalni kaveolin-1 negativno koreliše sa prisustvom ove mutacije. Naši rezultati su pokazali da je kaveolin-1 moguće upotrebiti kao pomoćni progostički marker, ali da je njegovu ekspresiju potrebno posmatrati iz ugla ćelijske distribucije.

Proteini adhezije

Promene u adhezivnim karakteristikama prilikom neoplastične transformacije igraju bitnu ulogu u epitelu mezenhimskoj tranziciji i sticanju migratornog ćelijskog fenotipa. Mnogi adhezivni proteini su prekomerno eksprimirani prilikom progresije PTK, uključujući kadherine, galektine, fibronektine i selektine. Galektin-3 je član porodice lektina čija je zajednička karakteristika da se sa velikim afinitetom vezuju za β -galaktozidne strukture. Biološke funkcije galektina-3, pored adhezije, uključuju aktivaciju određenih ćelija, mitogenu stimulaciju i aglutinaciju, dok lokalizacija pored membranske može biti i citoplazmatska i jedarna. U jedru čini komponentu ribonukleoproteinskog kompleksa i smatra se da ima ulogu u splajsovanju RNK. Prepostavlja se da utiče na apoptozu inhibiranjem protein kinaza i kaspaza. Što se tiče korelacije galektina-3 i napredovanja malignog procesa, dobijeni su oprečni rezultati. Povećanje nivoa ekspresije galektina-3 je dovođeno u vezu sa povećanim brojem interakcija između tumorskih ćelija i ekstraćelijskog matriksa posledično dovodeći do promena u ćelijskim deobama i razvoju tumora. U slučaju tiroidnih karcinoma, pokazano je da galektin-3 ima najintenzivniju i najkonzistentniju ekspresiju u epitelnim ćelijama PTK, dok su folikularni i anaplastični karcinomi pokazivali veću varijabilnost u bojenju. Iako mu je posvećena velika pažnja sa dijagnostičkog aspekta, naša ispitivanja njegovog progostičkog potencijala za sada nisu dala obećavajuće rezultate. Visoka imunoekspresija galektina-3 nije korelisala sa prisustvom limfnih metastaza i ekstratiroidne invazije, i u tom smislu nije dala klinički korisnu informaciju. Naši rezultati su pokazali da je galektin-3 pre fenotipska karakteristika PTK nego marker njegovih uznapredovalih stadijuma.

Protein kinaze

Za epidermalni faktor rasta (EGF) i njegov receptor (EGFR) je pokazano da učestvuju u patogenezi različitih tipova karcinoma i da shodno tome predstavljaju atraktivnu metu za molekularnu terapiju. EGFR je transmembranski receptor

sa tirozin kinaznom aktivnošću koji nakon vezivanja za ligand pokreće MAPK i PI3K/Akt signalni put koji učestvuju u proliferaciji, preživljavanju, angiogenezi i migraciji. Veliki broj studija je pokazao da uzroci poremećaja u regulaciji EGFR signalnog puta leže u povišenoj ekspresiji kako liganda, tako i samog receptora, ali i u aktivirajućim mutacijama. Upravo ove pojave su povezane sa uzanpredovalim stadijumom bolesti, prisutnim metastazama i lošom prognozom.

Foklana adheziona kinaza (FAK) takođe pripada familiji protein kinaza koja osim što prima informacije od EGFR, učestvuje i u prenosu signala od integrinskih receptora. Tumorskoj patogenezi doprinosi pojačavajući i MAPK3 i PI3K signalni put promovišući proliferaciju i preživljavanje ali i sposobnost migracije i diseminacije karcinomske ćelije. U tiroidnom karcinomu se vezuje za invazivne karakteristike.

Visoke ekspresije i EGFR i FAK su u našim analizama korelisale sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima, ekstratiroidnom invazijom, stepenom neoplastične infiltracije i veličinom tumora (odnosno pT statusom koji uzima u obzir dimenzije tumora). Oba proteina su se pokazala odgovorna za hemio-rezistenciju, pogodna za predviđanje toka terapije ali i kao mete za nove ciljane molekularne terapije[94].

Detekcija postoperativnih markera progresije PTK nosi brojne prednosti u bazičnim istraživanjima razumevanja biologije tumora, a mnogi od njih su i prevedeni u kliničku praksu kao pomoćni markeri uz standardne procedure. Imunohistohemija koja je najčešće upotrebljavana metoda za analizu arhivskog materijala se uspešno upotrebljava već dugi niz godina, se karakteriše dobro ustaljenim protokolima, niskom cenom i dostupanim prilivom uzoraka. Njena prednost je i u tome što daje informaciju ne samo o ekspresiji proteina od interesa, već i o njegovoj tkivnoj i subćelijskoj lokalizaciji. Sa druge strane, imunoblot tehnikom se može preciznije kvantifikovati količina analita. Nedostaci postoperativnih markera leže u činjenici da se informacija o prognozi tumora dobija tek nakon operacije pacijenta. Takođe, ovim metodama se detektuje zatećeno stanje tumora u momentu operacije pacijenta, pa ne dozvoljava dinamično praćenje markera u više vremenskih intervala.

ZAKLJUČAK

Sudeći po broju publikacija i istraživačkih pravaca pobrojanih u ovom poglavlju, jasno je da postoji jak fokus bazičnih molekularno-bioloških istraživanja na mehanizme progresije PTK u cilju pronalaska savremenijih prognostičkih markera povećane osetljivosti i umanjene invazivnosti uzorkovanja. Ipak, i pored brojnih prednosti koje nude u odnosu na markere u standardnoj primeni, i markeri novije generacije pate od niza nedostataka, zbog čega većina njih još uvek nije ušla u kliničku praksu.

Analiza pacijentovog molekularnog backgrounda kroz detekciju genskih polimorfizama kao prednosti ima neinvazivan način uzorkovanja, relativno nisku cenu analize kao i mogućnost dobijanja epidemiološke informacije o učestalosti markera u populaciji. Sa druge strane uticaj genskih polimorfizama kao predispozicije za loš tok bolesti se ne može gledati izolovano od molekularno-histološkog konteksta pojedinca čime mu se smanjuje osetljivost i otežava personalizacija tretmana.

Preoperativne markere takođe karakteriše neinvazivnost uzorkovanja i mogućnost blagovremenog planiranja opsega operativnog zahvata i postoperativnog terapijskog toka. Međutim, ovi kandidati iziskuju najnovije dostupne tehnologije, a time i veća finansijska ulaganja čineći ih nedovoljno istraženima i bez trenutne perspektive za upotrebu u kliničkoj praksi.

Intraoperativni markeri daju blagovremenu i najvalidniju informaciju o trenutnom stanju pacijenta i neophodnoj veličini hirurškog zahvata. Ipak, ove analize bi morale da daju rezultat u kratkom vremenskom roku ne bi li hirurgu pružile adekvatne informacije.

Postoperativni molekularni markeri su od svih navedenih najviše ispitivani, a često se već primenjuju kao dodatni marker uz već postojeće. Mogućnost personalizovane postoperativne terapije, informacija o progresiji bolesti, temeljna istraženost i ustaljeni protokoli analize čine ih trenutno najadekvatnijim markerima za kliničku upotrebu. Nedostatak ovih markera je što detektuju zatećeno stanje tumora pa ne dozvoljavaju dinamično praćenje markera u više vremenskih intervala.

LITERATURA

1. Cibas ES, Ali SZ, Conference NCITFSotS. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. Am J Clin Pathol 2009;132(5):658-65.
2. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol 2010;17(6):1471-4.
3. Beysel S, Eyerici N, Pinarli FA, Apaydin M, Kizilgul M, Caliskan M, et al. VDR gene FokI polymorphism as a poor prognostic factor for papillary thyroid cancer. Tumour Biol 2018;40(11):1010428318811766.

4. Oh IH, Oh C, Yoon TY, Choi JM, Kim SK, Park HJ, et al. Association of CFTR gene polymorphisms with papillary thyroid cancer. *Oncol Lett* 2012;3(2):455-61.
5. Wang Y, Wei T, Xiong J, Chen P, Wang X, Zhang L, et al. Association Between Genetic Polymorphisms in the Promoter Regions of Let-7 and Risk of Papillary Thyroid Carcinoma: A Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(43):e1879.
6. 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.
7. Zane M, Agostini M, Enzo MV, Casal Ide E, Del Bianco P, Torresan F, et al. Circulating cell-free DNA, SLC5A8 and SLC26A4 hypermethylation, BRAF(V600E): A non-invasive tool panel for early detection of thyroid cancer. *Biomed Pharmacother* 2013;67(8):723-30.
8. Allin DM, Shaikh R, Carter P, Thway K, Sharabiani MTA, Gonzales-de-Castro D, et al. Circulating tumour DNA is a potential biomarker for disease progression and response to targeted therapy in advanced thyroid cancer. *Eur J Cancer* 2018;103:165-75.
9. Fussey JM, Bryant JL, Batis N, Spruce RJ, Hartley A, Good JS, et al. The Clinical Utility of Cell-Free DNA Measurement in Differentiated Thyroid Cancer: A Systematic Review. *Front Oncol* 2018;8:132.
10. Khatami F, Tavangar SM. Liquid Biopsy in Thyroid Cancer: New Insight. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2018;12(3):235-48.
11. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11(6):426-37.
12. Liu R, Hao S, Zhang H, Ma J, Liu X, Xu J, et al. Correlation of thyroid stimulating hormone receptor mRNA expression levels in peripheral blood with undesirable clinicopathological features in papillary thyroid carcinoma patients. *Oncotarget* 2017;8(43):74129-38.
13. Aliyev A, Gupta M, Nasr C, Hatipoglu B, Milas M, Siperstein A, et al. Circulating Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Messenger RNA as a Marker of Tumor Aggressiveness in Patients with Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Endocr Pract* 2015;21(7):777-81.
14. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):259-69.
15. Yu S, Liu Y, Wang J, Guo Z, Zhang Q, Yu F, et al. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(6):2084-92.
16. Zhang Y, Xu D, Pan J, Yang Z, Chen M, Han J, et al. Dynamic monitoring of circulating microRNAs as a predictive biomarker for the diagnosis and recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Lett* 2017;13(6):4252-66.
17. Zhang Y, Pan J, Xu D, Yang Z, Sun J, Sun L, et al. Combination of serum microRNAs and ultrasound profile as predictive biomarkers of diagnosis and prognosis for papillary thyroid microcarcinoma. *Oncol Rep* 2018;40(6):3611-24.
18. Cantara S, Pilli T, Sebastiani G, Cevenini G, Busonero G, Cardinale S, et al. Circulating miRNA95 and miRNA190 are sensitive markers for the differential diagnosis of thyroid nodules in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(11):4190-8.
19. Yu S, Liu X, Zhang Y, Li J, Chen S, Zheng H, et al. Circulating microRNA124-3p, microRNA9-3p and microRNA196b-5p may be potential signatures for differential diagnosis of thyroid nodules. *Oncotarget* 2016;7(51):84165-77.
20. Qiu ZL, Shen CT, Sun ZK, Wei WJ, Zhang XY, Song HJ, et al. Circulating Long Non-Coding RNAs Act as Biomarkers for Predicting 131I Uptake and Mortality in Papillary Thyroid Cancer Patients with Lung Metastases. *Cell Physiol Biochem* 2016;40(6):1377-90.
21. Zhang D, Liu X, Wei B, Qiao G, Jiang T, Chen Z. Plasma lncRNA GAS8-AS1 as a Potential Biomarker of Papillary Thyroid Carcinoma in Chinese Patients. *Int J Endocrinol* 2017;2017:2645904.
22. Sorg S, Pachmann K, Brede-Hekimian K, Freesmeyer M, Winkens T. Determining tissue origin of circulating epithelial cells (CEC) in patients with differentiated thyroid cancer by real-time PCR using thyroid mRNA probes. *Cancer Lett* 2015;356(2 Pt B):491-5.
23. Jiang K, Li G, Chen W, Song L, Wei T, Li Z, et al. Plasma Exosomal miR-146b-5p and miR-222-3p are Potential Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinomas. *Onco Targets Ther* 2020;13:1311-9.
24. Ghafouri-Fard S, Shirvani-Farsani Z, Taheri M. The role of microRNAs in the pathogenesis of thyroid cancer. *Noncoding RNA Res* 2020;5(3):88-98.
25. van Keulen S, Nishio N, Fakurnejad S, van den Berg NS, Lu G, Birkeland A, et al. Intraoperative Tumor Assessment Using Real-Time Molecular Imaging in Head and Neck Cancer Patients. *J Am Coll Surg* 2019;229(6):560-7 e1.
26. Najah H, Tresallet C. Role of frozen section in the surgical management of indeterminate thyroid nodules. *Gland Surg* 2019;8(Suppl 2):S112-S7.
27. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014;159(3):676-90.
28. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.
29. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5399-404.
30. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(1):42-50.
31. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA* 2013;309(14):1493-501.
32. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, et al. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63(5):588-93.
33. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, et al. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63(4):461-6.
34. Jankovic J, Tatic S, Bozic V, Zivaljevic V, Cvejic D, Paskas S. Inverse expression of caveolin-1 and EGFR in thyroid cancer patients. *Hum Pathol* 2017;61:164-72.
35. Paunović Iš, S.; Išić Denčić, T.; Đorić, I.; Janković Miljuš, J.; Rončević, J.; Cvejić, D. Coexistence of BRAFV600E mutation and EGFR overexpression is highly associated with adverse clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma. *Archives of Biological Sciences* 2020;72(1):37-44.
36. Xing M. Genetic-guided Risk Assessment and Management of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019;48(1):109-24.
37. Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 2004;564(1-2):9-13.
38. Low KC, Tergaonkar V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends Biochem Sci* 2013;38(9):426-34.
39. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 2013;20(4):603-10.
40. Borah S, Xi L, Zaug AJ, Powell NM, Dancik GM, Cohen SB, et al. Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science* 2015;347(6225):1006-10.
41. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* 2015;348(6238):1036-9.

42. Alzahrani AS, Alsaadi R, Murugan AK, Sadiq BB. TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer. *Horm Cancer* 2016;7(3):165-77.
43. Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, et al. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(5):672-82.
44. Bu R, Siraj AK, Divya SP, Kong Y, Parvathareddy SK, Al-Rasheed M, et al. Telomerase reverse transcriptase mutations are independent predictor of disease-free survival in Middle Eastern papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 2018;142(10):2028-39.
45. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(6):E1130-6.
46. Liu R, Zhang T, Zhu G, Xing M. Regulation of mutant TERT by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/GAPP in human cancer. *Nat Commun* 2018;9(1):579.
47. Romei C, Ciampi R, Elisei R. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12(4):192-202.
48. Thomas T. Individualized testing and outcome measurements are needed for successful hormone replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3852-3.
49. Jhjiang SM, Mazzaferrari EL. The ret/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma. *J Lab Clin Med* 1994;123(3):331-7.
50. Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, et al. BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(2):511-20.
51. Yip L, Nikiforova MN, Yoo JY, McCoy KL, Stang MT, Armstrong MJ, et al. Tumor genotype determines phenotype and disease-related outcomes in thyroid cancer: a study of 1510 patients. *Ann Surg* 2015;262(3):519-25; discussion 24-5.
52. Janković J. Analysis of protein and genetic markers in preoperative and postoperative differential diagnosis of thyroid gland tumors. Belgrade: University of Belgrade; 2017.
53. Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H, Yamamoto Y, Udagawa K, Kunisue H, et al. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *Eur J Endocrinol* 2000;142(4):340-6.
54. Tanaka A, Matsuse M, Saenko V, Nakao T, Yamanouchi K, Sakimura C, et al. TERT mRNA Expression as a Novel Prognostic Marker in Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid* 2019;29(8):1105-14.
55. Riesco-Eizaguirre G, Wert-Lamas L, Perales-Paton J, Sastre-Perona A, Fernandez LP, Santisteban P. The miR-146b-3p/PAX8/NIS Regulatory Circuit Modulates the Differentiation Phenotype and Function of Thyroid Cells during Carcinogenesis. *Cancer Res* 2015;75(19):4119-30.
56. Celano M, Rosignolo F, Maggisano V, Pecce V, Iannone M, Russo D, et al. MicroRNAs as Biomarkers in Thyroid Carcinoma. *Int J Genomics* 2017;2017:6496570.
57. Aragon Han P, Weng CH, Khawaja HT, Nagarajan N, Schneider EB, Umbricht CB, et al. MicroRNA Expression and Association with Clinicopathologic Features in Papillary Thyroid Cancer: A Systematic Review. *Thyroid* 2015;25(12):1322-9.
58. Silaghi CA, Lozovanu V, Silaghi H, Georgescu RD, Pop C, Dobrean A, et al. The Prognostic Value of MicroRNAs in Thyroid Cancers-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* 2020;12(9).
59. Sedaghati M, Kebebew E. Long noncoding RNAs in thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2019;26(5):275-81.
60. Stojanovic S, Selemetjev S, Doric I, Roncevic J, Jankovic Miljus J, Zivaljevic V, et al. Elevated BANCR expression levels have different effects on papillary thyroid carcinoma progression depending on the presence of the BRAFV600E mutation. *Eur J Surg Oncol* 2020;46(10 Pt A):1835-42.
61. Hermann S, Sturm I, Mrozek A, Klosterhalfen B, Hauptmann S, Dorken B, et al. Bax expression in benign and malignant thyroid tumours: dysregulation of wild-type P53 is associated with a high Bax and P21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 2001;92(6):805-11.
62. Cvejic D, Selemetjev S, Savin S, Paunovic I, Tatic S. Changes in the balance between proliferation and apoptosis during the progression of malignancy in thyroid tumours. *Eur J Histochem* 2009;53(2):65-71.
63. Šeletmetjev S. Analysis of expression of regulatory molecules of apoptosis (Bcl-2, Bax, p53) and proliferation marker (PCNA) in papillary and anaplastic thyroid carcinoma. Belgrade: University of Belgrade; 2008.
64. Selemetjev S, Savin S, Paunovic I, Tatic S, Cvejic D. Concomitant high expression of survivin and vascular endothelial growth factor-C is strongly associated with metastatic status of lymph nodes in papillary thyroid carcinoma. *J Cancer Res Ther* 2018;14(Supplement):S114-S9.
65. Šeletmetjev S. Survivin and VEGF-C in papillary and anaplastic thyroid carcinoma: expression profiles, biological role and their clinicopathological significance. Belgrade: University of Belgrade; 2014.
66. Saffar H, Sanii S, Emami B, Heshmat R, Panah VH, Azimi S, et al. Evaluation of MMP2 and Caspase-3 expression in 107 cases of papillary thyroid carcinoma and its association with prognostic factors. *Pathol Res Pract* 2013;209(3):195-9.
67. Pu X, Storr SJ, Zhang Y, Rakha EA, Green AR, Ellis IO, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis* 2017;22(3):357-68.
68. Tang J, Gui C, Qiu S, Wang M. The clinicopathological significance of Ki67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator? *World J Surg Oncol* 2018;16(1):100.
69. Pan DH, Wen DY, Luo YH, Chen G, Yang H, Chen JQ, et al. The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6,051 cases. *Onco Targets Ther* 2017;10:3261-76.
70. Antonaci A, Consorti F, Mardente S, Natalizi S, Giovannone G, Della Rocca C. Survivin and cyclin D1 are jointly expressed in thyroid papillary carcinoma and microcarcinoma. *Oncol Rep* 2008;20(1):63-7.
71. Pesutic-Pisac V, Punda A, Gluncic I, Bedekovic V, Pranic-Kragic A, Kunac N. Cyclin D1 and p27 expression as prognostic factor in papillary carcinoma of thyroid: association with clinicopathological parameters. *Croat Med J* 2008;49(5):643-9.
72. Sanjari M, Kordestani Z, Safavi M, Mashrouteh M, FekriSoofiAbadi M, Ghaseminejad Tafreshi A. Enhanced expression of Cyclin D1 and C-myc, a prognostic factor and possible mechanism for recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Sci Rep* 2020;10(1):5100.
73. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
74. Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, Nomura T, Ohkubo S, Yamamoto Y, et al. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):1125-31.
75. Lee AS, Lee JE, Jung YJ, Kim DH, Kang KP, Lee S, et al. Vascular endothelial growth factor-C and -D are involved in lymphangiogenesis in mouse unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2013;83(1):50-62.
76. Selemetjev S, Ethoric I, Paunovic I, Tatic S, Cvejic D. Coexpressed High Levels of VEGF-C and Active MMP-9 Are Associated With Lymphatic Spreading and Local Invasiveness of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2016;146(5):594-602.
77. Marečko I. Expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 as potential prognostic markers of human thyroid gland tumors.

- Belgrade: University of Belgrade; 2014
- 78. 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.
 - 79. Išić T. Thyroid peroxidase, galectin-3, HBME-1 and cytokeratin-19 as malignancy and tumor differentiation markers in human thyroid gland. Belgrade: University of Belgrade; 2010.
 - 80. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 2002;54(3):431-67.
 - 81. Staubach S, Hanisch FG. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev Proteomics* 2011;8(2):263-77.
 - 82. Kim D, Kim H, Koo JS. Expression of caveolin-1, caveolin-2 and caveolin-3 in thyroid cancer and stroma. *Pathobiology* 2012;79(1):1-10.
 - 83. Jankovic J, Paskas S, Marecko I, Bozic V, Cvejic D, Savin S. Caveolin-1 expression in thyroid neoplasia spectrum: comparison of two commercial antibodies. *Dis Markers* 2012;33(6):321-31.
 - 84. Paskas S, Jankovic J, Marecko I, Isic Dencic T, Tatic S, Cvejic 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.
 - 85. Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(2):267-76.
 - 86. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995;147(3):815-22.
 - 87. Selemetjev SA, Savin SB, Paunovic IR, Tatic SB, Cvejic D. Changes in the expression pattern of apoptotic molecules (galectin-3, Bcl-2, Bax, survivin) during progression of thyroid malignancy and their clinical significance. *Wien Klin Wochenschr* 2015;127(9-10):337-44.
 - 88. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S3-8.
 - 89. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61(2):203-12.
 - 90. Nedergaard MK, Hedegaard CJ, Poulsen HS. Targeting the epidermal growth factor receptor in solid tumor malignancies. *BioDrugs* 2012;26(2):83-99.
 - 91. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71(3-4):435-78.
 - 92. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):598-610.
 - 93. Owens LV, Xu L, Dent GA, Yang X, Sturge GC, Craven RJ, et al. Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human thyroid cancer. *Ann Surg Oncol* 1996;3(1):100-5.
 - 94. Selemetjev S, Bartolome A, Isic Dencic T, Doric I, Paunovic I, Tatic 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.

Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti

Ljiljana Rakićević

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Beograd, Srbija

Kontakt: ljiljanarakicevic011@gmail.com

Apstrakt

Kardiovaskularne bolesti (KVB) su klasa oboljenja koja obuhvataju srce i/ili krvne sudove i nastaju složenim sadejstvom genetičkih i stečenih faktora. Razvoj molekularne biologije omogućio je nove uvide u fundamentalne mehanizme koji dovode do KVB, kao i napredak u dijagnostici, prognostici i lečenju. Novi pristupi u dijagnostici i lečenju KVB podstaknuti su istraživanjima koja se odnose na nekodirajuće RNK - duge nekodirajuće RNK i kratke nekodirajuće RNK. Ova klasa molekula, ne samo da se povezuje sa različitim mehanizmima koji dovode do razvoja KVB, nego se prepoznaje njihov potencijal kao biomarkera, farmakogenetičkih faktora, novih meta lekova i novih alatki u lečenju bolesti. Upotreba nekih od njih u lečenju ljudi je i odobrena od strane relevantnih agencija. Posebnu pažnju privlače studije koje se odnose na nekodirajuće RNK poreklom iz ekstracelularnih vezikula, dodatno potvrđujući potencijal nekodirajuće RNK kao leka budućnosti, ne samo u tretmanu KVB.

Ključne reči: Kardiovaskularne bolesti, nekodirajuće RNK, biomarkeri

Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases

Ljiljana Rakićević

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

Belgrade, Serbia

Correspondence: ljiljanarakicevic011@gmail.com

146

Abstract

Cardiovascular diseases (CVDs) are group of diseases which encompass heart and/or blood vessels and they originate from complex coaction of genetic and acquired factors. Development of molecular biology has enabled new insights into fundamental mechanisms which lead to CVDs, as well as progress in diagnostics, prognosis and treatment. New approaches to diagnostics and treatment of CVDs have been encouraged by researches which are related to non-coding RNA, long non-coding and short non-coding RNA. Not only is this group of molecules being associated with different mechanisms which lead to CVDs, but their potential to be biomarkers, pharmacogenetic factors, new drug targets and new treatment tools is being recognised. Relevant agencies have approved some of them to be used for human treatments. Studies related to non-coding RNAs deriving from extracellular vesicles are getting special attention, additionally confirming non-coding RNAs potential as drug of the future, not limited just to CVDs.

Key words: cardiovascular diseases, non-coding RNAs, biomarkers

1. KARDIOVASKULARNE BOLESTI KAO ZNAČAJAN MEDICINSKI I DRUŠTVENI PROBLEM

Kardiovaskularne bolesti (KVB) su klasa oboljenja koja obuhvataju srce i/ili krvne sudove i nastaju složenim dejstvom genetičkih i stečenih faktora. Ova oboljenja su vodeći uzrok smrtnosti u svim delovima sveta, osim u Africi [1]. Tokom poslednjih decenija stopa mortaliteta je smanjena u mnogim razvijenim zemljama, ali stovremeno je došlo do naglog porasta smrtnosti usled KVB u zemljama sa niskim i srednjim nivoom primanja. Na globalnom nivou, opterećenje bolestima iz ove grupe je u porastu, a poslednje statistike pokazuju da je u proseku skoro svaka treća smrt u svetu izazvana kardiovaskularnim bolestima. U pojedinim zemljama stopa smrtnosti je i veća, kao što je slučaj u Srbiji, gde iznosi 53,3% [2, 3].

Osnovne patofiziološke manifestacije, koje se postavljaju kao izazov u medicinskoj praksi i istraživanju, javljaju se u vidu ateroskleroze i suženja krvnih sudova, primarne i sekundarne hipertenzije, infarkta miokarda, venskih tromboza, aritmija, bolesti srčanih zalistaka, bolesti miokarda i perikarda izazvane infektivnim agensima ili reumatskim bolestima. Osim genetičke predisponiranosti i rizičnog stila života, razvoju kardiovaskularnih bolesti doprinose i pridružene bolesti kao što su dijabetes, hiperlipidemija, hormonski poremećaji, infektivne bolesti itd. S obzirom na prirodu i složenost KVB, napor i društva, da se smanji njihova učestalost kao i stepen smrtnosti, dolaze iz različitih pravaca - od bazičnih i применjenih istraživanja, preko angažovanja inovativnih tehnologija do edukacije stanovništva [1].

2. MOLEKULARNA BIOLOGIJA KAO ZAMAJAC U PROUČAVANJU I LEČENJU KARDIOVASKULARNIH BOLESTI

Revolucija koju je molekularna biologija izazvala u mnogim oblastima, svakako je i kardiološka istraživanja postavila na potpuno novu platformu. Metodološki pristupi molekularne biologije omogućili su nove i preciznije uvide u fundamentalne procese i doveli do opisivanja novih dijagnostičkih i prognostičkih markera, iznalaženja novih farmakoloških meta, kao i do postavljanja osnova za razvoj inovativnih metoda lečenja. Zahvaljujući tehnologijama za analizu sekvene DNK, opisani su uzročnici naslednih malformacija i monogeničkih bolesti srca [4]. Takođe, opisani su genetički faktori koji pokazuju visoku povezanost sa složenim bolestima kao što su hipertenzija [5, 6], aritmija [7], aterosklerozna [8], venske tromboze [9]. Dodatno, okarakterisani su nasledni faktori koji opredeljuju odgovor na mnoge farmakoterapeutike, koji se koriste u lečenju i prevenciji KVB. To je dovelo do dizajniranja personalizovanih protokola koji pružaju mogućnost terapije koja je bezbednija za pacijenta i ekonomičnija za zdravstveni sistem [10].

Nova era na polju izučavanja kardiovaskularnog sistema, na molekularnom nivou nastala je sa mogućnostima za dizajniranje rekombinantnih gena i uređivanje genoma. Tehnike kojima se izaziva *over-ekspresija*, utišavanje gena ili kreiraju mutacije, kao i dizajniranje eksperimentalnih modela kod kojih se imitiraju bolesti čoveka, postale su moći alati koji omogućavaju nova i preciznija saznanja o funkciji i bolestima srca [11]. Manipulacija genima u cilju lečenja bolesti kod ljudi, najviše se približava realnosti korišćenjem modernih tehnika u vidu CRISPR/Cas9 sistema. Tome idu u prilog rezultati istraživačke grupe koja je uspela da kod ljudskih preimplantacijskih embriona eliminiše mutirani gen *MYBPC3* porekлом od oca obolelog od nasledne kardiomiopatije. Ipak, uspostavljanje ovakvih pristupa u redovnoj medicinskoj praksi, zahteva prevazilaženje mnogih izazova, ne samo tehnoloških, nego i etičkih [12].

Jedan od najvećih izazova za istraživanja u medicini odnosi se na mogućnosti regeneracije miokarda nakon povrede izazvane infarktom. Naime, posle srčane povrede, kardiomiociti prolaze kroz nekrotičnu i apoptotsku smrt ćelija i srčani fibroblasti se aktiviraju da proizvode kolagen i druge komponente ekstracelularnog matriksa, što dovodi do fibroze i oštećenja srčane funkcije. Proliferativni kapacitet kardiomiocita koji bi omogućio regeneraciju srca, postoji kod novorođenčadi, ali vremenom opada, tako da je kod odraslih osoba taj kapacitet nedovoljan za oporavak srca [13]. Embrionalne matične ćelije i indukovane pluripotentne matične ćelije su proučavane u cilju razvoja ćelijske terapije kao egzogeni izvor novih kardiomiocita. Pokazano je da se kardiomiociti, dobijeni ćelijskim inženjerstvom, mogu uspešno inkorporirati u infarktom oštećeni miokard, izazivajući povoljne efekte na srčanu funkciju. Ipak uspešnosti u kliničkoj upotrebi stoje na putu više prepreka, kao što su loše preživljavanje egzogenih kardiomiocita, rizik od tumorogenosti, razvoj aritmija i sl. [14].

Nove mogućnosti u podsticanju regenerativnog potencijala ciljnih organa, i izazivanja regresije patoloških procesa, potekle su iz istraživanja nekodirajućih RNK.

3. NEKODIRAJUĆE RNK

Većina RNK sintetisanih u procesu transkripcije su nekodirajuće. Informacione RNK (iRNK), čije primarne sekvene opredeljuju sekvene proteina, čine manje od 2% eksprimiranog genoma. Prvi karakterisani molekul nekodirajuće RNK bila je transportna RNK (tRNK) za alanin, čija je struktura opisana još 1965. godine [15]. Detaljna struktura ribozo-

malnih RNK (rRNK), opisana je nešto kasnije, krajem sedamdesetih i ranih osamdesetih godina prošlog veka, mada su kao komponente ribozoma, bile poznate i ranije [16]. Do danas je, uz tRNK i rRNK, opisano više klase nekodirajućih RNK: duge nekodirajuće RNK (lncRNK), mikro RNK (miRNK), male interferirajuće RNK (siRNK), RNK koje stupaju u interakciju sa PIWI proteinima (piRNK), male nuklearne RNK (snRNK), ekstracelularne RNK (exRNK), male RNK specifične za Kahalovo telo (scaRNK) [17]. Opsežna istraživanja ovih molekula pokrenuta su tokom devedesetih godina prošlog veka, kada su detektovane male regulatorne RNK kod nematoda (*Caenorhabditis elegans*) i prvi put opisani mehanizmi regulacije ekspresije posredstvom nekodirajućih RNK [18]. Od tada su se nekodirajuće RNK izdvojile kao posebna grupa regulatornih molekula sa nezamenjivom ulogom u održavanju osnovnih ćelijskih procesa. Generalno, do sada se najveći broj podataka u pogledu ove grupe molekula, odnosi na mikro RNK i duge nekodirajuće RNK, pa je takva proporcija prisutna i kada je u pitanju ispitivanje uloge nekodirajućih RNK u kardiovaskularnim bolestima.

3.1. Mikro RNK

Mikro RNK (miRNK) su obično dužine oko 22 nukleotida i nastaju od dužih, dvolančanih prekursora koji nakon transkripcije dobijaju karakterističnu sekundarnu strukturu u vidu ukosnice. Ovi molekuli su poznati kao regulatori ekspresije gena na posttranskripcionom nivou.

Uobičajeni mehanizmi regulacije ekspresije posredstvom miRNK su: endonukleotička degradacija; destabilizacija iRNK (deadenilacija i egzonukleolitička degradacija); utišavanje translacije (inhibicijom inicijacije ili elongacije translacije; proteoliza rastućeg polipeptida). Takođe, miRNK mogu delovati kao aktivatori ekspresije, npr. putem ometanja proteina koji vrše represiju translacije [17].

Prema poslednjoj sistematizaciji podataka, kod čoveka je opisano 1917 prekursora od kojih nastaje 2654 maturiranih sekvenci različitih miRNK [19]. Jedna miRNK može učestvovati u regulaciji više stotine gena, dok različite miRNK mogu kolektivno ciljati jednu mRNA [20]. Uz ovakvu kombinatoriku, procenjuje se da je ekspresija oko dve trećine gena koji kodiraju proteine čoveka, regulisano posredstvom miRNK [21].

Krajem protekle decenije došlo se do preciznijih podataka o delovanju pojedinih miRNK i njihovom translacionom potencijalu u pogledu dijagnostike i lečenja KVB. Intenzivna istraživanja koja su se odvijala u ovoj oblasti dovela su do toga da se na osnovu bazičnih znanja o miRNK, kreiraju inovativne strategije u formulaciji lekova. Tako je od strane Američke Agencije za hranu i lekove nedavno odobreno više terapijskih strategija koje su zasnovane na modulaciji delovanja miRNK. Obavljenja je prva faza kliničkog testiranja farmakološkog agensa MRG-110, dizajniranog da inhibira miRNK92a (NCT03603431). Prethodno je ustanovaljeno da miRNK92a u endotelnim ćelijama čoveka, vrši represiju procesa neophodnih za angiogenezu, tako što utišava ekspresiju proangiogenih faktora (kao što je integrin alfa 5), blokira vaskularno umrežavanje i usporava migraciju endotelnih ćelija kao i njihovu sposobnost da se vežu za fibronektin. Prekliničke studije na sisarima su pokazale da sintetički inhibitor miRNK92a, pojačava ekspresiju proangiogenih gena, koji su ujedno mete miRNK92a [22].

Takođe, za primenu kod ljudi, odobrena je upotreba sintetičkog preparata CDR132L koji inhibitora miRNK132 (NCT04045405). Naime, pokazano je da kod insuficijencije srca, miRNK132 orkestrira pokretanje patološkog remodeliranja miokarda utišavajući niz kardiološki relevantnih gena kao što su *NOS3* (Endothelial Nitric Oxide Synthase 3) i *SR Ca²⁺ATPaza 2a* (SERCA2a). Tokom prekliničkih ispitivanja pokazano je da CDR132L sprečava nepovoljno remodeliranje miokarda i obnavlja srčanu funkciju, a na molekularnom nivou dovodi do restauracije ekspresije ATPase SERCA2a koja je krucijalna za ponovno preuzimanje kalcijuma tokom kontrakcija kardiomiocita [23].

Poslednjih nekoliko godina istraživanja, koja se odnose na ulogu miRNK u KVB, obeležila je detaljnija stratifikacija pacijenata, uzročnika bolesti i faktora rizika. To je omogućilo da se dođe do preciznijih informacija o aktivnostima pojedinih miRNK u definisanim uslovima. Tako je od strane grupe autora pokazano da miRNK-29b-3 posreduje u patološkim promenama miokarda kod kongenitalnih bolesti srca, utišavajući ekspresiju gena *NOTCH2*, koji je posebno bitan za razvoj srca [24]. U istraživanjima koja se odnose na Šagasovu bolest, koja je prouzrokovana parazitom *Trypanosoma cruzi* i praćena hroničnom kardiomiopatijom, pokazano je da je pojačana ekspresija miRNK-21 povezana sa napredovanjem fibroze i imunim odgovorom kod ove bolesti. U tom kontekstu, inhibicija miRNK-21 predstavlja obećavajući terapeutski pristup [25]. Kako je miRNK-21, koja je prva opisana i najveće proučavana miRNK kod čoveka, postoji rapidan priliv podataka u vezi uloge ove nekodirajuće RNK u KVB. Tako je pokazano da je nivo cirkulišuće miRNA-21 u pozitivnoj korelaciji sa razvojem dijabetične kardiomiopatije kod pacijenata obolelih od dijabetesa, kao i da u tom kontekstu predstavlja biomarker visoke dijagnostičke efikasnosti [26]. Takođe, pokazano je da nivo cirkulišuće miRNA-21, u kombinaciji sa *Cystatin-C* testom (testa procenu brzine glomerularne filtracije), predstavlja dobar prognostički marker kardiorenalnog sindroma tipa 2 kod starijih pacijenata [27].

Analizom nivoa miRNA-21 i miRNA-126 poreklom iz egzozoma seruma, došlo se do zaključka da ove nekodirajuće RNK imaju visoku dijagnostičku efikasnost u pogledu razvoja akutnog koronarnog sindroma (nestabilna angina pektoris i infarkt miokarda) [28].

Kada su u pitanju istraživanja u medicini, posebna pogodnost u vezi miRNK je njihovo prisustvo u telesnim tečnostima, što ih čini dostupnim i jednostavnijim za proučavanje kod ljudi. Većina miRNK u krvi čoveka je porekлом iz trombocita, što je podatak koji trombocite čini posebno dragocenim u pogledu izučavanja nekodirajućih RNK [29]. Pored zaključaka o bazičnim ćelijskim procesima u kojima učestvuju trombocitne miRNK, došlo se i do podataka o potencijalnom značaju miRNK po pitanju analize aktivnosti trombocita i efekata antiagregacione terapije. Naime, pokazano je da miRNK u cirkulaciji ukazuju na status trombocita u realnom vremenu i da se mogu koristiti kao biomarkeri za predviđanje različitih aspekata njihove funkcije, pa se u tom kontekstu, mogu iskoristiti i za praćenje i prilagođavanje antitrombotičke terapije [30, 31]. Ovakvi nalazi imaju značaj za dalje unapređenje personalizovane medicine, koja i pored značajnih dokaza koji opravdavaju njenu primenu, još nije zaživela u pogledu tretmana KVB. Da bi se to ostvarilo, pored prevazilaženja ekonomskih i tehničkih barijera, dodatni uslov je generisanje stratifikovanih i preciznijih podataka, koji bi bili osnova za dalje unapređenje personalizovanih protokola [32]. Kao što je slučaj sa drugim oblastima, izučavanje nekodirajućih RNK i personalizovanu medicinu postavlja u novu ravan, obezbeđujući detaljnije i preciznije podatke neophodne za razvoj medicine.

3.2. Duge nekodirajuće RNK

Duge nekodirajuće RNK - IncRNK (Inc – eng. *long non coding*) obično se definišu kao nekodirajući transkripti čija je dužina veća od 200 nukleotida [33]. Vrlo brzo nakon što su 1999. godine prvi put opisane, IncRNK su postale predmet mnogih istraživanja značajnih, koliko zbog fundamentalne uloge ovih molekula, toliko i zbog mogućnosti koje pružaju u oblasti primenjene nauke [34]. Prema poslednjoj sistematizaciji, do sada je kod čoveka registrovano 101 293 transkripta za IncRNA [35]. LncRNK su lokalizovane u jedru i za razliku od drugih nekodirajućih RNK, nije im svojstvena konzerviranost među vrstama [36]. Ulogu regulatornih molekula IncRNK ostvaruju putem: regrutovanja kompleksa koji učestvuju u epigenetičkoj regulaciji gena; modifikovanja vezivanja opštih transkripcionih faktora za DNK; učešća u procesu transkripcione interferencije; modulacijom specifičnih transkripcionih faktora IncRNK, često deluju tako što okupljaju proteinske komplekse i zajedno sa njima predstavljaju senzore za različite ćelijske signale [33].

Kao i miRNK, i IncRNK su intenzivno proučavane kod kardiovaskularnih bolesti, sa ciljem da se objasne molekularni procesi koji dovode do patoloških stanja i/ili da se principi delovanja IncRNK iskoriste u formulaciji novih generacija lekova. U tom kontekstu poseban izazov predstavlja iznalaženje mogućnosti za reaktivaciju proliferacije kardiomiocita, kako bi se omogućila regeneracija miokarda nakon infarkta. Na tom polju značajni su podaci o visoko konzerviranoj RNK LncDACH1 čija ekspresija raste nakon rođenja i tokom odrastanja, a posebno je visoka u oštećenom miokardu. LncDACH1 se direktno vezuje i inhibira aktivnost proteina PP1A (eng. *protein phosphatase 1 catalytic subunit alpha*), neophodnog za deobu ćelija, kontrakciju mišića, metabolizam glikogena, i proteinsku sintezu. Eksperimenti na životinjama su pokazali da se utišavanjem LncDACH1 postiže reaktivacija proliferativnog potencijala kardiomiocita i regeneracija srca nakon infarkta, što su podaci koji bi se mogli iskoristiti za razvoj terapeutske strategije u cilju regeneracije srca [37].

LncRNK pokazuju i svoj potencijal biomarkera korisnih za praćenje toka i lečenja KVB. Tako je pokazano da kod pacijenata sa koronarnom bolešću koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji, visoka koncentracija IncRNA-Ang362 u plazmi korelira sa lošim prognozama u daljem toku bolesti [38]. Dodatno, niska ekspresija IncRNA TONSL-AS1, kod pacijenata sa koronarnom bolešću je povezana lošom prognozom toka bolesti. Smanjenje ekspresije ove nekodirajuće RNK, istovremeno korelira sa pojačanom ekspresijom miR-197. Pokazano je da između IncRNA TONSL-AS1 i miR-197 ne postoji direktni međusobni uticaj na ekspresiju, mada su istovremeno uključene u procesu, kojima se, osim toka bolesti, reguliše i njihova sopstvena aktivnost [39]. Udrženost u delovanju IncRNK i miRNK na iste ćelijske procese pokazana je i na drugim primerima [40].

Broj podataka koji se odnose na nekodirajuće RNK rapidno raste i očigledno je da su različiti tipovi nekodirajućih RNK umreženi u jedinstvene regulatorne procese. To dovodi do kombinatorike koja usložnjava, kako postavke istraživanja tako i interpretaciju rezultata. Zbog toga su veoma bitna bioinformatička istraživanja koja imaju za cilj da se iz mreže celokupne RNK izdvaje klasteri molekula koji bi bili najvažniji za proučavanje određenih fizioloških i patofizioloških procesa. Ujedno, ovakvi pristupi bi olakšali selekciju molekula koji su visoko specifični kada su u pitanju određene bolesti i koji bi bili najrelevantniji kao biomarkeri ili farmakološke mete [41].

Poseban predmet interesovanja po pitanju dugih nekodirajućih RNK i mikro RNK predstavlja njihovo prisustvo u ekstracelularnim vezikulama. Ekstracelularne vezikule (EV) su strukture koje oslobađaju skoro sve ćelije živog sveta. Okružene su dvoslojnom membranom i sadrže brojne molekule, kao što su proteini, nukleinske kiseline, bioaktivni lipidi itd. Na ove tvorevine se gleda kao na važne medijatore u međećelijskoj komunikaciji, koji putem svog sadržaja mogu prenositi različite signale do ciljnih ćelija, gde se uključuju u različite procese [42]. EV su izazvane posebno interesovanje zbog svog potencijala u regeneraciji miokarda. Naime, pokazano je da EV porekлом iz hESC-Pg (*human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors*) ćelija, i aplicirane u infarktom oštećeni miokard eksperimentalnih

miševa, dovode do promocije oporavka i boljeg preživljavanja srčanih ćelija [43, 44]. Razmatranje miRNK i lncRNK po reklom iz EV postalo je posebno značajno uz podatke da su ove dve klase nekodirajućih RNK entiteti preko kojih ekstracellularne vezikule ostvaruju efekte na miokard [45]. Takođe, poznato je da su miRNK i lncRNK u ekstracelularnim vezikulama stabilizovane i zaštićene, što obezbeđuje njihovo postojano učešće u ćelijkim procesima. Ove okolnosti su bile motivacija da se EV dizajniraju bioinženjeringom sa ciljem da se njihov sadržaj isporuči do željenih odrednica. Jedna od mogućnosti za korišćenje ovako nastalih vezikula je i isporuka različitih terapeutika, što je posebno povoljno za supstance koje su po prirodi ribonukleinske kiseline [46].

S obzirom na dosadašnja saznanja koja postoje o miRNK i lncRNK i njihovim potencijalima u podsticanju regenerativnih procesa, ove grupa molekula je nezaobilazna u razmatranjima koja se tiču transporta terapeutika putem EV.

Konačno, prema onome što u ovom trenutku pružaju naučna literatura i rezultati, očigledno je da istraživanja koja se odnose na nekodirajuće RNK, kako bazična tako i primenjena, uzimaju novi zamah. Saznanja o prirodi i principima delovanja nekodirajućih RNK otvaraju nove perspektive u lečenju, dijanostici i prognostici. Međutim, ispred korišćenja ovih saznanja u praksi, stoe brojni izazovi - od prepoznavanja specifičnosti potencijalnih biomarkera do formulisanja efikasnih lekova najbezbednijih za primenu kod ljudi. U svakom slučaju nesumnjivo je da su nekodirajuće RNK već postala fundamentalna osnova za razvoj medicine budućnosti.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the american heart association. *Circulation* 2020; 141:e139-e596.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American heart association. *Circulation* 2016;133:e38-360.
3. Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, de Belder M, Knot, J, Aaberge L et I. European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions. Re-perfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *Eur Heart J* 2010; 31(8):943–957.
4. Richards AA, Garg V. Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev*. 2010;6(2):91-7.
5. Padmanabhan S, Melander O, Johnson T, Di Blasio AM, Lee WK, Gentilini D et al. Genome-wide association study of blood pressure extremes identifies variant near umod associated with hypertension. *PLoS genetics* 2010; 6:e1001177.
6. Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 2011; 478:103–109.
7. Gray B, Behr ER. New Insights Into the Genetic Basis of Inherited Arrhythmia Syndromes. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; 9(6):569-577.
8. Cristiano Fava, Martina Montagnana. Atherosclerosis Is an Inflammatory Disease which Lacks a Common Anti-inflammatory Therapy: How Human Genetics Can Help to This Issue. A Narrative Review *Front Pharmacol* 2018; 6:9:55.
9. de Haan HG, Bezemer ID, Doggen CJ, Le Cessie S, Reitsma PH, Arellano AR et al. Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood* 2012; 120(3):656-63.
10. Mitropoulou C, Fragoulakis V, Rakicevic LB, Novkovic MM, Vozikis A, Matic DM, et al. Economic analysis of pharmacogenomic-guided clopidogrel treatment in Serbian patients with myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenomics* 2016; 17(16):1775-1784.
11. Babu GJ, Periasamy M. Transgenic mouse models for cardiac dysfunction by a specific gene manipulation. In: Sun Z, ed. *Molecular Cardiology: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press, 2005:365-78.
12. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017; 24:548(7668):413-419.
13. Vujic A, Natarajan N, Lee RT. Molecular mechanisms of heart regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2020;100:20–28.
14. Terashvili M, Bosnjak Z. Stem Cell Therapies in Cardiovascular Disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2019; J33(1):209-222.
15. Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisse M, Merill SH, et al. Structure of a Ribonucleic Acid. *Science* 1965; 147(3664):1462–5.
16. Noller HF, Woese CR. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* 1981; 212 (4493): 403—411.
17. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol* 2016; 937:3-17.
18. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806–11.
19. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1):D155-D162.
20. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469:336–342.
21. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92–105.
22. Gallant-Behm CL, Piper J, Dickinson BA, Dalby CM, Pestano LA, Jackson AL. A synthetic microRNA-92a inhibitor (MRG-110) accelerates angiogenesis and wound healing in diabetic and nondiabetic wounds. *Wound Repair Regen* 2018; 26(4):311-323.

23. Foinquinos A, Batkai S, Genschel C, Viereck J, Rump S, Gyöngyösi M, et al. Preclinical development of a miR-132 inhibitor for heart failure treatment. *Nat Commun* 2020; 31;11(1):633.
24. Yang Q, Wu F, Mi Y, Wang F, Cai K, Yang X, et al. Aberrant expression of miR-29b-3p influences heart development and cardiomyocyte proliferation by targeting NOTCH2. *Cell Prolif* 2020; 53:e12764.
25. Nonaka CKV, Sampaio GL, Silva KN, Khouri R, Macedo CT., Rogatto SR et al. Therapeutic miR-21 Silencing Reduces Cardiac Fibrosis and Modulates Inflammatory Response in Chronic Chagas Disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22(7):3307.
26. Tao L, Huang X, Xu M, Qin Z, Zhang F, Hua F, et al. Value of circulating miRNA-21 in the diagnosis of subclinical diabetic cardiomyopathy. *Molecular Cellular Endocrinol* 2020; 518:110944.
27. Wang Y, Liang Y, Zhao W, Fu G, Li Q, Min X, et al. Circulating miRNA-21 as a diagnostic biomarker in elderly patients with type 2 cardiorenal syndrome. *Scientific Rep* 2020;10:4894.
28. Ling H, Guo Z, Shi Y, Zhang L, Song C. Serum exosomal MicroRNA-21, MicroRNA-126, and PTEN are novel biomarkers for diagnosis of acute coronary syndrome. *Front Physiol* 2020;11:654.
29. Krammer, T.L.; Mayr, M.; Hackl, M. microRNAs as Promising Biomarkers of Platelet Activity in Antiplatelet Therapy Monitoring. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21, 3477.
30. Zapilko V, Fish RJ, Garcia A, Reny JL, Dunoyer-Geindre S, Lecompte T, et al. MicroRNA-126 is a regulator of platelet-supported thrombin generation. *Platelets*. 2020; 31(6):746-755.
31. Garcia A, Dunoyer-Geindre S, Noll S, Reny JL, Fontana PJ An Ex Vivo and In Silico Study Providing Insights into the Interplay of Circulating miRNAs Level, Platelet Reactivity and Thrombin Generation: Looking beyond Traditional Pharmacogenetics. *Pers Med*. 2021; 11(5):323.
32. Rakicevic L, Nestorovic A. Pharmacogenetics of Clopidogrel Therapy and Neurointerventional Procedures: We Need Precision Data for Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther* 2019;105(3):547-549.
33. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat Rev Genet* 2009;10:155–159.
34. Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J. Collection of mRNA-like non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:192–195.
35. Li Z, Liu L, Jiang S, Li Q, Feng C, Du Q, Zou D. LncExpDB: an expression database of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D962-D968.
36. Cabili MN, Dunagin MC, McClanahan PD, Biaesch A, Padovan-Merhar O, Regev A, Rinn JL. Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution. *Genome Biol*. 2015; 16(1):20.
37. Cai B, Ma W, Wang X, Sukhareva N, Hua B, Zhang L, et al. Targeting LncDACH1 promotes cardiac repair and regeneration after myocardium infarction. *Cell Death Difer* 2020; 27(7):2158-2175.
38. Wang H, Gong H, Liu Y, Limin Feng. Relationship between lncRNA-Ang362 and prognosis of patients with coronary heart disease after percutaneous coronary intervention. *Biosci Rep* 2020;40:1–0.
39. Wu L, Tan G, Li X, Jiang X, Run B, Zhou W, Liao H. LncRNA TONSL-AS1 participates in coronary artery disease by interacting with miR-197. *Microvasc Res*. 2021; Jul;136:104152.
40. Zhang H, Ji N, Gong X, Ni S, Wang Y. NEAT1/miR-140-3p/MAPK1 mediates the viability and survival of coronary endothelial cells and affects coronary atherosclerotic heart disease. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2020; Sep 8;52(9):967-974.
41. Tao L, Shi J, Huang X, Hua F, Yang L. Identification of a lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA theory reveals functional lncRNAs in hypertrophic cardiomyopathy. *Exp Ther Med*. 2020; 20(2):1176-1190.
42. Veziroglu EM, Mias GI. Characterizing Extracellular Vesicles and Their Diverse RNA Contents. *Front Genet*. 2020; 17;11:700.
43. Sahoo, S. Losordo, D. W. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ. Res.* 2014;114, 333–344.
44. Kervadec A, Bellamy V, El Harane N, Arakelian L, Vanneaux V, Cacciapuoti et al .Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35(6):795-807.
45. Wu Q, Wang J, Tan WLW, Jiang Y, Wang S et al. Extracellular vesicles from human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells promote cardiac infarct healing through reducing cardiomyocyte death and promoting angiogenesis. *Cell Death Dis*. 2020; 11;11(5):354.
46. Sil S, Dagur RS, Liao K, Peebles ES, Hu G, Periyasamy P, et al. Strategies for the use of Extracellular Vesicles for the Delivery of Therapeutics. *Neuroimmune Pharmacol*. 2020; 15(3):422-442.

Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres

Milica Kojadinović, Aleksandra Arsić

Institut za medicinska istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu
Kontakt: milica.kojadinovic.imr@gmail.com

Apstrakt

Nar (*Punica granatum*, L) je jedan od najstarijih jestivih plodova koji se koristi u prevenciji i lečenju od davnina. Različiti delovi biljke, kao što su plod, seme, kora i lišće, sadrže bioaktivne sastojke za koje se navodi da poseduju lekovita i terapeutska svojstva. Među mnogobrojnim bioaktivnim komponentama u naru, polifenoli predstavljaju najvažniju grupu molekula sa pozitivnim efektom na zdravlje. Hipoglikemijski, hipopolipemijski, hipotenzivni i anti-oksidativni efekat polifenola nara potvrđen je u brojnim studijama. Ovaj pregledni rad ima za cilj da predstavi najnovija istraživanja o strukturi i biološkoj aktivnosti komponenata nara i njihovom potencijalnom korisnom efektu u terapiji bolesti povezanih sa metaboličkim sindromom.

Ključne reči: polifenoli nara, metabolički sindrom, dijabetes melitus 2, lipidi, oksidativni stres

Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress

Milica Kojadinovic and Aleksandra Arsic

Institute for Medical Research, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade

Correspondence: milica.kojadinovic.imr@gmail.com

Abstract

Pomegranate (*Punica granatum*, L) is one of the oldest edible fruits used in prevention and treatment. Various parts of the plant, such as fruit, seeds, bark, and leaves, contain bioactive ingredients that possess medicinal and therapeutic properties. Among the many bioactive components in pomegranate, polyphenols are the most important group of molecules with a positive effect on health. The hypoglycemic, hypolipidemic, hypotensive, and anti-oxidative effects of pomegranate polyphenols have been confirmed in numerous studies. The aim of this review is to present the latest research on the structure and activity of bioactive components of pomegranate and their potential beneficial effect in the treatment of diseases related to metabolic syndrome.

Keywords: pomegranate polyphenols, metabolic syndrome, diabetes melitus 2, lipids, oxidative stress

UVOD

Nar (*Punica granatum* L.), čije je ime izvedeno od latinske reči *pomum* „jabuka“ i *granatum* „seme“ je jestivo voće koje se gaji u mnogim zemljama i konzumira širom sveta. Najverovatnije vodi poreklo iz Irana i Avganistana, mada se danas gaji u Africi, na jugu Kavkaza, u Južnoj i Centralnoj Aziji, Severnoj i Južnoj Americi, u Jermeniji i u Mediteranskoj regiji [1]. To je dekorativno i dugovečno drvo koje živi više od 200 godina. Plod čini okrugla bobica sa gustom crveno-kastom ljuskom. Unutrašnji deo ljuške su bele tanke ćelije mezokarpa koji obrazuje komore koje sadrže jestive arilice sa semenom. Arilice su tamno crvene ili ljubičaste boje, zbog visokog sadržaja polifenola, uglavnom antocijanina [2]. Ova velika količina polifenola čini nar snažnim i jedinstvenim antioksidansom, čija je antioksidativna aktivnost veća i od vitamina E, A ili S [3]. Šta više, sok od nara pokazuje najveći antioksidativni kapacitet među ostalim često konzumiranim pićima koja su bogata polifenolima, kao što su zeleni čaj, crveno vino, sok od pomorandže, grejpfruta, grožđa ili brusnice [4,5]. Sadržaj aktivnih fitokemikalija u naru zavisi od sorte, geografskog regiona, zrelosti i metoda obrade [6]. Viši nivo polifenola primećen je i u soku i u kori plodova nara koji su uzgajani u područjima sa pustinjskom klimom, u poređenju sa onima u voću uzgajanog u Mediteranskoj oblasti [7].

Zbog visokog sadržaja polifenolnih komponenti, nar je prepoznat kao jedna od namirnica čiji antioksidanti imaju brojne pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Brojne *in vivo* i *in vitro* studije pokazale su da ekstrakti iz različitih delova biljke kao što su kora, cvet, seme, ili sok od nara mogu da utiču na metabolizam lipida i ugljenih hidrata u mnogim patološkim stanjima kakva su hiperlipidemije, dijabetes melitus tip 2 (DMT2), gojaznost. Metabolički sindrom (MetS) kao skup nekoliko metaboličkih poremećaja, koji uključuju visok nivo glukoze, centralnu gojaznost, dislipidemiju i hipertenziju [8], predstavlja široko rasprostranjenu hroničnu nezaraznu bolest u humanoj populaciji. Otpornost na insulin i abdominalna gojaznost prepoznati su kao glavni uzročni faktori MetS-a. Osim toga, MetS se odlikuje povećanim oksidativnim stresom i hroničnom inflamacijom i zbog toga se smatra jednim od glavnih faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) [9]. Pored hipoglikemijske i hipolipemijske tarapije, lečenje osoba sa MetS uključuje i promene u načinu života, dijetetsku intervenciju i fizičku aktivnost. Poslednjih decenija mnoge biljke i njihovi ekstrakti predmet su istraživanja kod hroničnih nezaraznih bolesti povezanih sa MetS kao terapijske opcije sa malim rizikom od pojave neželjenih efekata [9,10]. Među njima su i biljke bogate polifenolima koje su prepoznate kao najperspektivniji antiaterogeni i kardioprotektivni biljni lekovi [10,11].

U ovom radu ćemo se fokusirati na pregled najnovijih istraživanja o strukturi i biološkoj aktivnosti bioaktivnih komponenata nara i njihovom potencijalnom korisnom efektu u terapiji bolesti povezanih sa MetS.

AKTIVNE KOMPONENTE NARA

Nar (*Punica granatum*, L.), za koga se kaže da je rastao u rajsckom vrtu, dugo se koristi u narodnoj medicini, posebno u zemljama Istočne i Južne Evrope. Nar se konzumira kako svež, tako i u formi sokova, džemova, vina [12,13], i tako omogućava unos velike količine polifenola. Uloga polifenola u prirodi je višestrukta. Sa jedne strane kao sekundarni metaboliti oni štite biljku od oksidativnog stresa i ultraljubičastog zračenja, a sa druge strane redovno konzumiranje polifenola usko je povezano sa smanjenjem rizika od pojave mnogih hroničnih bolesti [14].

Za strukturu polifenola karakteristično je da sadrže jedan ili više aromatičnih prstenova za koje su vezane jedna ili više hidroksilnih grupa. U prirodi postoji više od 8000 fenolnih jedinjenja, koja se prema biološkoj funkciji, mestu nałożenja i hemijskoj strukturi dele u klase. U zavisnosti od položaja i broja hidroksilnih grupa u fenolnim jedinjenjima zavisi ne samo njihova uloga u redoks reakcijama gde se ponašaju kao redukujući agensi i donori vodonika, već i njihova antioksidativna moć [14].

Klase prirodnih polifenola

Postoji nekoliko različitih podela fenolnih jedinjenja na klase. Na osnovu strukturnih karakteristika polifenoli se dele na dve velike klase, flavonoide i ne-flavonoide u koje spadaju fenolne kiseline, fenolni amidi, halkoni, stilbeni i lignani [15].

Flavonoidi predstavljaju najveću klasu polifenola u okviru koje se nalazi najveći broj identifikovanih fenola do sada, čak preko 6000 različitih jedinjenja [16]. Većina njih sadrži dva aromatična prstena, povezana piranskim prstenom. Prema stepenu oksidacije piranskog prstena polifenoli mogu da se podele u 6 podklasa: flavonoli, flavanoli, izoflavoni, flavanoni, flavoni i antocijani [17] (Slika 1.). Flavonoidi koji se nalaze u prirodi najčešće se mogu naći u hrani u formi glikozida [18].

Ne-flavonoidi se najčešće dele na pet ili šest klasa ali se u odnosu na hemijsku strukturu, ulogu u očuvanju zdravlja i biološku funkciju njenih najvažnijih predstavnika, mogu podeliti na tri klase: fenolne kiseline, stilbeni i kurkumoidni [19,20].

Fenolne kiseline sadrže aromatični prsten za koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa i jedna karboksilna grupa. Podeljene su u dve podklase koje čine derivati benzoinske kiseline i derivati cinaminske kiseline. Jedinjenja obe

Polifenoli nara

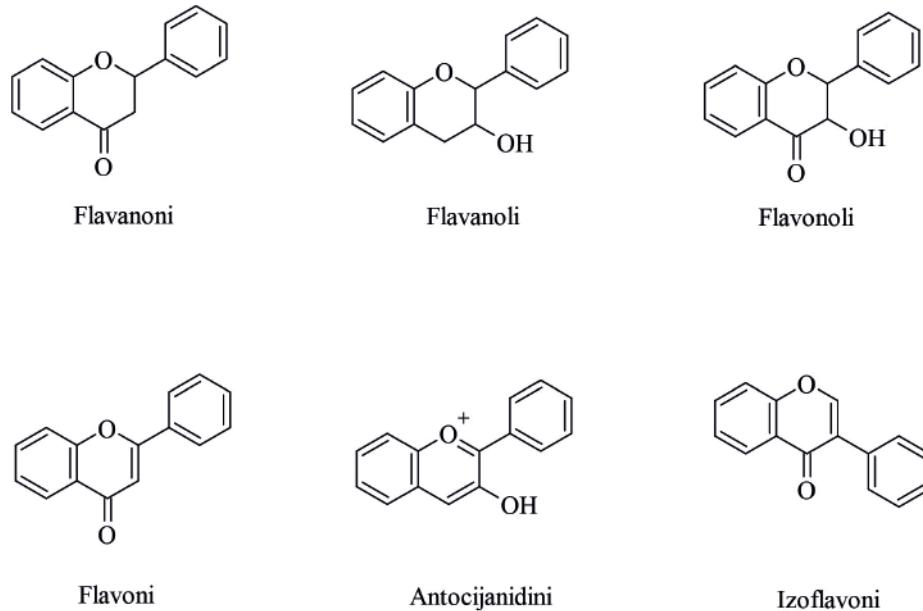
Najrasprostranjenija klasa polifenolnih jedinjenja u naru su hidrolizabilni tanini, posebno elagitanini i galotanini, koji su prisutni u svim delovima biljke. Bioaktivnost nara je većim delom zasnovana na prisustvu ovih jedinjenja [24,25]. Glavni elagitanini su punikalgin i granatin. Punikalgin se sastoji od elaginske i galne kiseline i molekula glukoze. Elaginska kiselina (EK) je prisutna u svim delovima biljke, a u mezokarpu nara ima najviše EK i granatina B (Slika 2.).

Nakon konzumiranja nara, elagitanini se u crvenom traktu hidrolizuju do EK [26,27]. Bioraspoloživost EK pokazuje veliki stepen varijacije, koji zavisi od brojnih faktora: slabe rastvorljivosti slobodne EK u želucu, vrste elagitanina kao prekursora za EK i ograničene apsorpcije EK u crevima [28].

Elaginska kiselina se u crevima metaboliše od strane mikrobiote do urolitina A, izourolitina-A, urolitina B, urolitina C i urolitina D [29]. Katabolizam EK do urolitina zavisi od sastava mikrobiote pojedinca i u zavisnosti od smeše urolitina koja se dobije prilikom razgradnje, postoje različiti metabolički fenotipovi [30]. Ukoliko je krajnji metabolit A, onda govorimo o metaboličkom fenotipu A. Metabolički tip B, prisutan je ukoliko su zastupljeni urolitin A, izourolitin-A i urolitin B, dok su oni koje ne proizvode urolitine označeni kao metabolički fenotip 0 [30]. Interesantno je da je metabolički fenotip B prisutan u visokom procentu kod osoba sa hroničnim bolestima kakve su MetS ili kancer [30]. Pozitivni efekti na zdravlje koji se pripisuju urolitinima su brojni i raznovrsni, od antimalarialskog do uticaja na ekspresiju nekih gena [31].

U naru su osim elagitanina, u velikoj meri zastupljeni i antocijani. Međutim, antocijani nisu bioraspoloživi, odnosno nakon konzumiranja soka od nara ovi molekuli se ne detektuju u serumu ili urinu. Crvena boja nara upravo potiče od visokog sadržaja antocijana [32].

Nar sadrži i niske koncentracije ispraljivih jedinjenja kao što su monoterpeni, aldehidi, estri i alkoholi [33,34]. Nekoliko organskih kiselina učestvuju u ukusu i kiselosti soka od nara. Tu spadaju limunska kiselina, malonska kiselina, oksalna kiselina, askorbinska kiselina, galna kiselina, kumarinska kiselina, hlorogena kiselina, kafeinska kiselina i ferulinska kiselina [6,35,36]. Masne kiseline i lignani su zastupljeni u zrnu nara. Ukupni lipidi čine 6-21.6 %, a u njima čak 90% nezasićenih masnih kiselina [37,38]. U semenkama nara prisutna je visoka koncentracija fitosterola kao što su beta-sitosterol, kampesterol i stigmasterol [37].



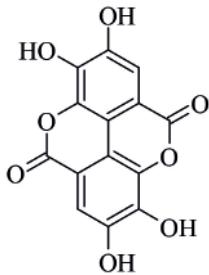
Slika 1. Podela flavonoida na podklase

podklase je teško naći u slobodnom obliku. Glavni predstavnik hidrobenzoinskih kiselina je galna kiselina, a hidroksi-cinaminske kiselina kafeinska kiselina [21].

Stilbeni u svojoj strukturi sadrže dva aromatična prstena povezana dvostrukom vezom. Rezveratrol je jedno od najpoznatijih jedinjenja u klasi stilbena. Zbog malog procenta zastupljenosti u biljkama, ova klasa polifenola nije previše zastupljena u svakodnevnoj ishrani [22,23].

Kurkuminoidi u svojoj strukturi sadrže dva aromatična prstena vezana na krajeve β-diketona. Iako su prisutni u manjoj meri u hrani, imaju značajnu ulogu u očuvanju zdravlja.

ANTIOKSIDATIVNI EFEKTI SOKA OD NARA



Slika 2. Strukturna formula elaginske kiseline

nje slobodnih radikala u suštini potiče od svih polifenola koji su prisutni u njemu i da je takav superiorniji od pojedinačnih polifenola iz soka [42].

Neutralizacija slobodnih radikala, u biološkim sistemima, pod dejstvom polifenola iz soka od nara podrazumeva doniranje protona od strane polifenola lipidnim peroksidima (LOO.) čime se prekida proces lipidne peroksidacije [43]. Osim protiona, neki polifenoli kao što je punikalagin, mogu donirati elektron iz OH grupe koja je vezana za fenolni prsten, vodonik peroksidu (H_2O_2) i tako ga redukovati do vode, doprinoseći tako njegovom uklanjanju [44]. Osim toga, elektron može biti doniran i trovalentnom gvožđu Fe^{3+} pri čemu nastaje Fe^{2+} , a kapicitet soka od nara da redukuje Fe upravo je srazmeran broju hidroksilnih grupa u molekulu polifenola [44]. Ovako nastao Fe^{2+} može biti dalje neutralisan od strane polifenola, budući da mnogi od njih imaju sposobnost da heliraju metalne jone. Naime, joni Fe^{2+} su visoko reaktivni i mogu da pokrenu stvaranje hidroksil radikala u Fentonovoj reakciji [45]. Hidroksil radikal je veoma reaktivan i može da indukuje proces lipidne peroksidacije. Nekoliko studija je pokazalo da kvercetin i punikalgin iz soka od nara helira Fe^{2+} i tako sprečavaju stvaranje slobodnih radikala [46, 44].

Različiti polifenoli efikasno inhibiraju aktivnost nekih ATP (engl. acid transporter protein) i NADPH (engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) zavisnih enzima, vezujući se za aktivna mesta ovih enzima. Tako je potvrđeno da polifenoli iz soka od nara inhibiraju aktivnost ksantin oksidaze, koji generiše različite reaktivne vrste kiseonika [47]. Osim toga, flavonoidi poput katehina i nekih procijanidina interaguju sa NADPH-oksidazom što dovodi do smanjenja proizvodnje superoksid anjon radikala [43]. Neki autori su potvrdili da polifenoli mogu da moduliraju aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su glutation peroksidaza (engl. glutathione peroxidase GPx), katalaza (engl. catalase CAT) i glutation S-transferaza [48], kao i da mogu da obnavljaju antioksidante i redukujuće agense, kakvi su vitamini E i C [43].

Kao odgovor na oksidativni stres, ćelije indukuju koordinisanu ekspresiju gena koja je uglavnom posredovana aktivacijom transkripcije NRF2 (engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) koji se dalje vezuje za promotore gena koji kodiraju superoksid dizmutazu (engl. superoxide dismutase SOD), hemoksigenazu-1, kinin oksidoreduktazu-1 i γ-glutamil cistein sintazu [49,50]. Nekoliko studija je pokazalo da punikalgin, resveratrol i ekstrakti nara takođe aktiviraju NRF2 koji se translocira u jedro, gde posreduje u transkripciji ciljnih gena koji kodiraju antioksidativne enzime i tako povećavaju otpornost ćelije na oksidativni stres i učestvuju u antioksidativnoj odbrani organizma [51,52].

Osim toga, resveratrol aktivira AMPK (engl. AMP-activated protein kinase) preko SIRT1 (engl. sirtuin 1) i pojačava biogenezu mitohondrija [53,54]. Primećeno je da resveratrol smanjuje ekspresiju iNOS (engl. inducible nitric oxide synthase) [55], smanjujući proizvodnju azot oksida (engl. nitric oxide NO), što dalje vodi smanjenju oksidativnog stresa.

Polifenoli mogu da utiču i na ekspresiju gena i signalne puteve koji su deo metabolizma lipida i ugljenih hidrata. Tako je pokazano da resveratrol povećava ekspresiju nekih gena koji su ključni za funkciju β-ćelija pankreasa, kao što su glukozni transporter 2 (engl. glucose transporter 2 GLUT2), mitohondrijski transkripcioni faktor A, fosfoinozitid-zavisna kinaza-1, glukokinaza i insulin 1 kroz regulaciju glavnog gena, SIRT1, i tako ublažava posledice kod dijabetičara [56].

EFEKAT NARA NA KOMPONENTE METABOLIČKOG SINDROMA

Poslednjih decenija ispitivanje korisnih efekta soka od nara u brojnim metaboličkim poremećajima kakvi su hiperlipidemije, DMT2, gojaznost, ili hipertenzija, postaje predmet istraživanja mnogih naučnika. Skup ovakvih višestrukih kardiometaboličkih poremećaja koji obuhvata izmenjen metabolismus glukoze i insulina, centralnu gojaznost, dislipidemiju i hipertenziju, naziva se metabolički sindrom [57]. Prema kriterijumima NCEP ATP III (engl. National Cholesterol Education Program III), MetS se definije kao pojedinačno prisustvo najmanje tri od pet navedenih faktora rizika:

- visok nivo glukoze ($\geq 5.6 \text{ mmol/l}$)
- abdominalna gojaznost (obim struka $> 102 \text{ cm}$ za muškarce i $> 88 \text{ cm}$ za žene)
- visok nivo triglicerida (engl. tryglicerides TG) ($\geq 1.70 \text{ mmol/l}$)

- nizak nivo HDL-holesterola (engl. high density lipoprotein) ($<1.03 \text{ mmol/l}$ kod muškaraca ili $<1.29 \text{ mmol/l}$ kod žena)
- visok krvni pritisak ($\geq 130/85 \text{ mm Hg}$ kod poslednja dva merenja)

Metabolički sindrom povećava rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti i DMT2, i predstavlja kritično pretkliničko stanje kod koga je neophodno intervenisati. Osim medikamentne terapije, promene u načinu ishrane, upotreba biljnih preparata i proizvoda koji su bogati antioksidantima, predstavlja preporuku za tretman ovog stanja. U narednim poglavljima ovog rada fokusiraćemo se na efekte koji polifenoli nara imaju na parametre MetS-a.

EFEKAT NARA NA METABOLIZAM GLUKOZE

Dijabetes melitus je grupa metaboličkih oboljenja koje karakteriše hronična hiperglikemija koja je rezultat poremećenog lučenjenja insulina, delovanja insulina, ili i jednog i drugog. Prema podacima svetske zdravstvene organizacije iz 2020. godine više od 422000 ljudi boluje od ove bolesti, a 90% njih ima DMT2. Za razliku od dijabetesa tipa 1, u kojem ćelije pankreasa ne proizvode insulin, DMT2 karakteriše insulinska rezistencija, a ne nedostatak proizvodnje insulina. Poremećen nivo insulina kao anaboličkog hormona utiče i na metabolizam lipida i proteina.

Podaci iz literature su pokazali da različiti delovi biljke nara imaju hipoglikemijski efekat, kao i da pozitivno utiču na funkcije β -ćelija, lučenje insulina i značajno smanjuju aktivnost enzima α -amilaze. Naime, Amri i saradnici [58] su pokazali da suplementacija sokom od nara, korom nara i listom nara u količini od 250 mg/kg sprečava pojavu hiperglikemije i hiperinsulinemije kod gojaznih pacova. Šta više, njihova istraživanja ukazuju da usled smanjenja apsorpcije ugljenih hidrata u crevnom traktu dolazi i do smanjenja telesne težine, sugerijući da dugotrajni tretman ekstraktom nara poboljšava toleranciju na glukozu, sprečava razvoj insulinske rezistencije, kao i da se smanjenjem aktivnosti α -amilaze i lipaze smanjuje apsorpcija ugljenih hidrata i lipida. Osim toga, i u drugim animalnim i *in vitro* studijama pokazano je da ekstrakt nara inhibira aktivnosti α -amilaze, što vodi smanjenju apsorpcije ugljenih hidrata u gastrointestinalnom traktu i do smanjenja nivoa glukoze u plazmi [59–61].

Međutim mali broj studija pokazao je isti efekat na humanoj populaciji. Naime u studiji Parsayean i saradnika [62] svakodnevno konzumiranje 200 ml soka od nara u trajanju od 6 nedelja dovelo je do statistički značajnog smanjenja nivoa glukoze kod pacijenata sa DMT2 (Tabela 1.). Sličan rezultat su dobili i Aviram i saradnici [63] u studiji sa pacijentima sa bolešću karotidnih arterija, koji su konzumirali 50 ml soka od nara u trajanju od godinu dana, ali ove promene nisu bile statistički značajne. Sa druge strane, neki autori su pokazali da sok od nara ne utiče na nivo glukoze ili čak povećava njen nivo u plazmi [64]. Tako se nivo glukoze nije značajno menjao kod žena sa MetS nakon konzumiranja 300 ml soka od nara u trajanju od 6 nedelja [65]. Značajno povećanje koncentracije glukoze pokazano je kod pacijenata sa koronarnim oboljenjem srca nakon konzumiranja 240 ml soka od nara u trajanju od 3 meseca [66]. Takođe, Gonzales-Ortiz i saradnici [67] su pokazali da je u studiji sa gojaznim osobama koje su konzumirale 120 ml soka od nara u trajanju od mesec dana došlo do značajnog povećanja koncentracije glukoze. Slične rezultate su dobili Moazzen i Alizadeh [68], u čijoj studiji je nakon konzumiranja 500 ml soka od nara u trajanju od jedne nedelje pokazano da se koncentracija glukoze značajno povećala kod osoba sa MetS.

Mogući mehanizam kojim polifenoli nara deluju na sniženje glukoze zasniva se na mogućnosti polifenola da stimulišu translokaciju SIRT1, IRS1 (engl. Insulin Receptor Substrate 1), PI3K (engl. Phosphoinositide 3-kinase), NRF1 (engl. Nuclear Respiratory Factor 1), GLUT-4 i FOXO1 (engl. Forkhead Box O1) na taj način pojačavajući osjetljivost signala za insulin i mitohondrijsku biogenezu. Polifenoli takođe mogu da smanje fosforilaciju ppIRS-1 (engl. phosphorylated IRS1) (S307) i inhibiraju DPP-4, regulisanjem ppPI3K (engl. Phosphoinositide 3-kinase). DPP-4 je jedan od enzima u crevima koji su tokom varenja odgovorni za razgradnju skroba do glukoze, pa tako podiže nivo glukoze u cirkulaciji. Inhibicija ovog enzima suzbija postprandijalnu hiperglikemiju i povećanje nivoa ppPI3K poboljšava signalne mehanizme insulina, ublažavajući tako rezistenciju na insulin.

Osim uticaja na nivo glukoze i insulina, nekoliko studija je ispitivalo efekat suplementacije ekstraktima nara na nivo HbA1c (engl. Hemoglobin A1c) [66,69,70]. Ipak, Huang i saradnici [71] u preglednom radu i meta analizi pokazali su da se vrednost HbA1c ne menja značajno, nakon konzumiranja soka od nara u trajanju od 1 do 12 nedelja kako kod zdravih tako ni kod osoba sa MetS. Oni su sugerisali da sok od nara nema koristan efekat na metabolizam glukoze i nivo insulina kod ljudi.

EFEKAT NARA NA GOJAZNOST I METABOLIZAM LIPIDA

Gojaznost kao deo metaboličkog poremećaja može se definisati kao hronična bolest sa više faktora kod koje se akumulira višak telesne masti i meri se indeksom telesne mase (BMI) pojedinca. Za odraslu osobu, prekomerna težina je BMI preko 25 kg/m^2 , a gojaznost kada je BMI preko 30 kg/m^2 [72]. Međutim, mnoga istraživanja ukazuju na to da je obim struka značajniji pokazatelj gojaznosti od BMI [73]. Polifenoli nara kao što su kamfor, fenolna jedinjenja, flavonoidi, galna kiselina, katehini mogu da smanje aktivnost lipoproteinske lipaze i tako vode ka smanjenju gojaznosti [74].

Nekoliko animalnih studija pokazalo je koristan efekat nara na smanjenje telesne težine. Tako su *Bounihi* i saradnici u studiji koja je trajala 18 nedelja pokazali da sok od nara utiče na smanjenje telesne težine i smanjenje apetita kod gojaznih pacova [75]. Takođe, rezultati studije *Adnyana* i saradnika [76], u kojoj su gojazni miševi konzumirali 50 i 100 mg/ml ekstrakta lišća nara mesec dana, pokazali su da dolazi do značajnog smanjenja telesne težine. Osim toga u *in vitro* studijama sa mezenhimskim matičnim ćelijama dobijenih iz masnog tkiva koje su bile izložene 10 µg/ml smeše punične, oleinske i linolne kiseline (engl. linoleic acid LA) pokazano je da ulje nara dovodi do inhibicije adipogeneze, smanjenja inflamacije, manje proizvodnje ATP i manjeg unosa glukoze [77].

Smanjenje količine masnog tkiva nakon mesec dana konzumiranja 120 ml soka od nara pokazano je u studiji sa gojaznim ljudima [67].

Takođe, *Haghishian* i saradnici su u studiji sa gojaznim ženama sa dislipidemijom koje su konzumirale 500 mg kore nara u trajanju od 8 nedelja pokazali da je došlo do smanjenja ukupnog holesterola, LDL-holesterola, TG, smanjenje sistolnog krvnog pritiska i CRP (engl. C-reactive protein) [78].

Promjenjen metabolism lipida koji podrazumeva povećan nivo holesterola i TG predstavlja glavni uzrok mnogih bolesti, uključujući gojaznost, bezalkoholnu masnu jetru, kardiovaskularne bolesti, insulinsknu rezistenciju, hipertenziju, i aterosklerozu. S toga je efekat konzumiranja soka od nara na metabolizam lipida ispitivan u brojnim studijama. Tako je tretman polifenolima nara, kao što je galna kiselina, u trajanju od sedam nedelja smanjio nivo ukupnog holesterola, TG i LDL-holesterola kod gojaznih miševa [79]. Sa druge strane *Yamasaki* i saradnici [80] su u studiji sa uljem semenki nara kod miševa pokazali da koncentracija TG u serumu raste, dok su *Mc Farlin* i sardnici [81] utvrdili da dvomesečno konzumiranje ulja od semenki nara nema značajan efekat na TG i lipidni profil kod zečeva sa hiperholesterolemijom.

Brojne humane studije potvrdile su hipolipemijski efekat nara. Tako na primer u tri odvojene studije pokazano je da nakon 6 nedelja konzumiranja 200 ml soka od nara i 8 nedelja uzimanja 40 g koncentrata soka od nara, došlo do značajnog smanjenja LDL-holesterola i ukupnog holesterola kod pacijenata sa DMT2 koji su razvili hiperlipidemiju [62,82,83]. Takođe, u našoj nedavno objavljenoj studiji nivo LDL-holesterola značajno se smanjio nakon dve nedelje konzumiranja 300 ml soka od nara kod osoba sa dislipidemijom [84]. Sa druge strane nekoliko studija je pokazalo da konzumiranje soka od nara, dovodi do povećanja nivoa HDL-holesterola kod osoba sa DMT2 [85] kao i osoba sa bezalkoholnom masnom jetrom [86].

Osim toga u studiji *Rashidi* i saradnika [87] sa dijabetičarima koji su 3 meseca svakodnevno konzumirali 45 g koncentrovanog soka od nara autori su pokazali da on nema uticaja na lipidni profil kod ovih pacijenata. Takođe, *Sahabkar* i saradnici [88] u meta-analizi koja je uključila 12 studija, pokazuju da konzumiranje soka od nara ne utiče na lipidni profil, ni kod zdravih ispitanika, tako ni kod gojaznih, umereno gojaznih, osoba sa hiperlipidemijom, ali ni osoba sa hipertenzijom. Štaviše, neki autori su pokazali povećanje koncentracije TG nakon konzumiranja 500 ml soka od nara, u trajanju od 7 dana, kod osoba sa MetS [68].

Mehanizam kojim sok od nara deluje na koncentraciju lipida nije sasvim razjašnjen, ali se prepostavlja da se odvija preko PPARs, koji su osnovni modulatori metabolizma lipida [89]. Naiime, smatra se da se punična i galna kiselina iz nara vezuju za PPAR-α i time ga aktiviraju, koji onda aktivira ekspresiju gena koji su uključeni u metabolizam lipida [90]. Među genima koje reguliše PPAR nalaze se geni koji kodiraju: *APOA1* (engl. Apolipoprotein A1), *APOA2*, *APOA5*, enzime uključene u oksidaciju masnih kiselina (MK) (*ACO* (engl. acyl-CoA oxidase), *CPT-I* (engl. carnitine palmitoyl transferase-I), *CPT-II*), enzime potrebne za desaturaciju MK kao što su $\Delta 6$ desaturaze (engl. acyl-CoA desaturase) i $\Delta 9$ desaturaze (engl. stearoyl-CoA desaturase), gene koji su uključeni u metabolizam HDL-a i sintezu ketonskih tela [91]. Hipoholesterolemijski efekat nekih polifenola, posebno procijanidina koji imaju veliku molekulsku masu, zasnovan je na činjenici da takvi molekuli smanjuju resorpciju holesterola u crevima [92]. Takođe, nekoliko autora je ukazalo da smanjen nivo TG potiče od smanjene regulacije acetil-CoA karboksilaze pri čemu kao posledica dolazi do sprečavanja akumulacije TG u jetri [93]. Disproporcija među razultatima može poticati od različitog sadržaja nekih polifenola u različitim sortama nara, a u svakom slučaju zavisi i od zdravstvenog stanja i patologije ispitanika.

Osim što utiču na metabolizam lipida, polifenoli mogu da utiču i na metabolizam MK. Tako je pokazano da polifenoli aronije menjaju MK profil kod gojaznih žena [94]. Međutim, efekat polifenola nara na metabolizam MK ispitivan je u manjoj meri. Ranije studije su pokazale da neki polifenoli smanjuju aktivnost $\Delta 6$ desaturaze jer modulišu nivo njene mRNA [92] kao i da smanjuje ekspresiju gena koji kodira $\Delta 9$ desaturazu [95,96]. Naša istraživanja su pokazala da konzumiranje soka od nara u trajanju od 6 nedelja kod osoba sa MetS dovodi do smanjenja nivoa arahidonske kiseline i povećanje nivoa ukupnih zasićenih masnih kiselina u plazmi. Osim toga, konzumiranje soka od nara dovelo je do smanjenja nivoa dokozahckaenske kiseline (engl. Docosahexaenoic acid DHA) i povećanja nivoa ukupnih mononezasićenih MK u eritrocitima (ER) [65]. Slično tome, u našoj drugoj studiji koja je trajala samo 2 nedelje, suplementacija sokom od nara dovela je do smanjenja nivoa DHA u plazmi, i povećanja nivoa dihomo-gama-linolne kiseline u ER, kod osoba sa dislipidemijom [84]. Sok od nara u ovoj studiji uticao je i na procenjene aktivnosti enzima koji su uključeni u biosintezu MK. Tako se aktivnost $\Delta 9$ smanjila u plazmi nakon konzumiranja soka od nara, dok je u ER procenjena ak-

tivnost $\Delta 6$ desaturaza bila povećana, a $\Delta 5$ desaturaze smanjena nakon konzumiranja soka. Naša istraživanja su pokazala da aktivne komponente nara mogu da utiču osim na aktivnost $\Delta 9$ i $\Delta 6$ desaturaze i na aktivnost $\Delta 5$ desaturaze koje je uključena u biosintezu MK. Budući da se mali broj istraživača bavio ovom temom, neophodna su dalja istraživanja koja bi podrazumevala praćenje efekta polifenola nara na ekspresiju gena koji kodiraju enzime koji učestvuju u biosintezi MK.

EFEKAT NARA NA HIPERTENZIJU

Hipertenzija je hronična bolest kod koje je arterijski krvni pritisak stalno povišen. To je glavni faktor rizika za druge KVB, poput moždanog udara, infarkta miokarda i srčane insuficijencije [97]. Poslednjih godina je uočeno da mnogi sastojci u ishrani mogu da utiču na stanje kardiovaskularnog sistema kod ljudi, kao i da konzumiranje hrane sa visokom antioksidativnom aktivnošću ublažava simptome hipertenzije [98]. Tako su *Shao* i saradnici pokazali da punikalagin smanjuje arterijsku hipertenziju u plućima i ublažava ventrikularnu hipertrofiju, kod pacova [99]. Osim toga *Santos* i saradnici su pokazali da konzumiranje nara redukuje sistolni krvni pritisak i aktivnost koronarnog angiotenzin-konvertujućeg enzima (*engl. angiotensin-converting enzyme ACE*), kod spontano hipertenzivnih pacova [100]. Slično, alkoholni ekstrakt nara, smanjuje sistolni krvni pritisak, pojačava endotelijalno-zavisnu koronarnu relaksaciju i pravila kardiovaskularne parametre, kod pacova [101].

I brojne humane studije pokazale su da nara može imati hipotenzivni efekat. Tako je pokazano da je kod pacijentata sa DMT2 krvni pritisak bio značajno niži nakon dve nedelje konzumiranja soka od nara ili ekstrakta nara nakon 8 nedelja [85,102]. Slično tome, i u drugim studijama [13,63,103,104] zabeleženi su blagotvorni efekti soka od nara na krvni pritisak i aktivnost ACE u serumu kod pacijentata sa hipertenzijom. Hipotenzivni efekat soka od nara potvrđen je i kod osoba sa DMT2, nakon 6 nedelja konzumiranja 200 ml soka [82]. I naša istraživanja su pokazala da kod osoba sa dislipidemijom nakon 2 nedelje konzumiranja soka od nara dolazi do značajnog smanjenja dijastolnog krvnog pritiska [84], ali nismo dobili takav efekat nakon 6 nedelja konzumiranja soka od nara kod osoba sa MetS [65].

Mehanizam pomoću kojeg neki polifenoli, npr. kao resveratrol i kvercetin, mogu izazvati vazodilataciju krvnih sudova i normalizovati krvni pritisak, zasniva se na uklanjanju superoksid-anion radikala iz cirkulacije čime se povećava bioraspoloživost NO [105]. Pored toga, polifenoli nara mogu da indukuju ekspresiju endotelne azot oksid sintaze i tako utiču na pojačanu sintezu NO, vodeći tako vazodilataciji krvnih sudova [106]. Uticaj soka nara na krvni pritisak verovatno zavisi od količine i tipa polifenolnih jedinjenja kao i od vrste bolesti ispitanika kod kojih se efekat prati.

EFEKAT NARA NA REDOKS-RAVNOTEŽU

Oksidativni stres je definisan kao stanje u organizmu u kome produkcija slobodnih radikala prevazilazi antioksidativni kapacitet endogenih i egzogenih antioksidanata i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite za njihovu eliminaciju. U tom slučaju raste količina reaktivnih vrsta kiseonika (*engl. Reactive oxygen species ROS*) koji reaguju sa proteinima, lipidima i DNK, i na taj način ih oštećuju. Posledice ovih reakcija vode ka promeni metabolizma ćelije i potencijalnog oštećenja čitavih organskih sistema a posebno krvotoka [107–109]. Brojne studije su zaključile da oštećenja ćelija koja izazivaju ROS imaju direktnu ulogu u razvoju i napredovanju mnogih hroničnih bolesti, uključujući aterosklerozu, hipertenziju, insulinsku rezistenciju, DMT2 [110], ali i MetS [111].

Unutarćelijska koncentracija ROS zavisi od produkcije ROS-a u ćeliji kao i od njihovog uklanjanja od strane antioksidativnog sistema. Tri najvažnija antioksidativna enzima, neophodna za održavanje redoks ravnoteže su: SOD, CAT i glutation peroksidaza, GPx [112].

Brojne studije su pokazale da sok od nara i ekstrakt nara imaju pozitivne efekte na oksidativni stres [55,113,114]. Efekat soka od nara ili ekstrakta nara na nivo lipidne peroksidacije i na aktivnost enzima antioksidativne zaštite praćen je na animalnim modelima ali i u humanoj polupaciji, kako kod zdravih ispitanika ili elitnih sportista, tako i u različitim metaboličkim oboljenjima.

Naime, administracija 200 mg/kg/dan vodenog ekstrakta kore nara tokom 15 dana smanjuje lipidnu peroksidaciju u srčanom, jetrenom i bubrežnom tkivu, kod pacova [115]. Slično tome, *Al-Gubori* i saradnici su pokazali da tretman 10% ekstraktom kore nara u ishrani tokom 40 dana dovodi do značajnog sniženja lipidne peroksidacije u plazmi kod zdravih miševa [116]. Animalni modeli su pokazali da konzumiranje nara dovodi do smanjenja aktivnosti enzima antioksidativne odbrane kao što su SOD i GPx kod pacova kod kojih je indukovani dijabetes nakon 4 nedelje suplementacije [117].

Osim toga, i brojne humane studije pokazale su da sok od nara može uticati na stepen lipidne peroksidacije u plazmi i eritrocitima (ER). Tako su *Matthaiou* i saradnici pokazali da konzumiranje 500 ml soka od nara dnevno za samo 1 nedelju smanjuje nivo MDA (*engl. malon dialdehyde*), kao krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije u plazmi kod

zdravih ispitanika (Tabela 1.) [118]. Osim toga, značajno smanjenje nivoa MDA primećeno je i kod pacijenata sa DMT2, nakon konzumiranja 250 ml dnevno, tokom 12 nedelja [119]. Takođe, naša ranija studija je pokazala da 300 ml soka od nara u trajanju od 6 nedelja može smanjiti nivo MDA kod žena sa MetS [65]. Isto tako, smanjenje nivoa MDA u serumu nakon 72 nedelje konzumiranja soka od nara primećeno je kod dizača tegova i zdravih volontera [120]. Slični rezultati dobijeni su kod gojaznih i umereno gojaznih osoba koji su konzumirali 1000mg, ekstrakta nara, kao i kod pacijenata na hemodijalizi koji su konzumirali 100ml soka tokom 48 nedelja [121,122]. Iako su brojne studije potvrdile pozitivan efekat konzumiranja soka od nara na stepen lipidne peroksidacije, kod nekih pacijenata kakvi su oni sa reumatodnim artritisom koji su konzumirali ekstrakt nara tj., 250mg 40% elaginske kiseline u trajanju od 8 nedelja, nije pokazan ovaj efekat [123].

Konzumiranje nara povezano je sa poboljšanjem čelijskog antioksidativnog kapaciteta, uključujući i povećanje nivoa redukovanih glutationa GSH i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC), kao i aktivnosti GPx, GR (engl. Glutathione reductase), GST (engl. Glutathione-S-transferase), SOD i CAT [116,118,119,124].

Aktivnost GPx menja se pod uticajem polifenola nara. Tako je pokazano da se aktivnost GPx u serumu povećava nakon intervencije kod zdravih volontera nakon samo 2 nedelje konzumiranja 250 ml soka od nara [125], ili čak 72 nedelje kod dizača tegova i zdravih ispitanika [120]. Osim toga, u 2 randomizirane studije, nakon 6 ili 8 nedelja konzumiranja ekstrakta nara, odnosno soka od nara u drugoj, došlo je do povećanja nivoa GPx u serumu kod osoba sa reumatoidnim artritisom [123], kao i onih pacijenata sa osteoartritisom koji su konzumirali 200 ml soka od nara [126]. Sa druge strane naši rezultati u dve odvojene studije pokazali su da se nakon konzumiranja 300 ml soka od nara u trajanju od 2 nedelje kod osoba sa dislipidemijom [84] ili u trajanju od 6 nedelja kod osoba sa MetS (rezultati nisu publikovani) aktivnost GPx u ER smanjuje.

Kada govorimo o aktivnosti CAT, ona se uglavnom ne menja tokom suplementacije sokom od nara što je pokazano u različitim randomiziranim studijama. Izuzetak su dizači tegova kod kojih je zabeleženo da se aktivnost CAT u serumu povećana nakon konzumiranja soka od nara [120]. Osim toga u našoj *in vitro* studiji urolitini kao metaboliti EA uticali su na smanjenje nivoa CAT u čelijskoj liniji humanog epitela kolorektalnog adenokarcinoma [127].

Sa druge strane, konzumiranje soka od nara utiče i na aktivnost SOD što je pokazano u nekoliko randomiziranih studija. Tako je kod zdravih ispitanika nakon 2 nedelje došlo do povećanja aktivnosti SOD u serumu [125]. Međutim, naše studije nisu pokazale promenu u aktivnosti SOD u ER nakon 2 [84] i 6 (rezultati nisu publikovani) nedelja konzumiranja soka od nara, kod osoba sa MetS i osoba sa dislipidemijom.

Iako tačan mehanizam na koji deluju polifenoli iz nara nije sasvim razjašnjen, jedan od načina je da oni doniraju elektron iz OH grupe fenolnih prstenova, slobodnom radikalu kao što je superoksid anjon radikal ili hidroksi radikal. Na taj način dolazi do stabilizacije ili inaktiviranja slobodnih radikala čime se zaustavljaju slobodno-radikalne lančane reakcije i tako smanjuju oksidativna oštećenja proteina, lipida i DNK molekula [47,128]. Pored toga, glavna bioaktivna komponenta nara, punikalagin, poznat je kao helator Fe i čistač vodonik-peroksida [129] i tako doprinosi smanjenju oksidativnog stresa u organizmu. Već smo pomenuli da neki polifenoli aktiviraju enzime antioksidativne odbrane i tako doprinose smanjenju oksidativnog stresa.

Disproporcija među rezultatima koja je dobijena u studijama zavisi od brojnih faktora: od količine soka koji se konzumira, dužine trajanja studija, ispitanika i njihovih pridruženih bolesti, količine polifenola u sokovima, metoda kojima su određivani ispitivani parametri itd. Zbog toga je potreban veći broj interventivnih studija koje bi potvrdile korisne efekte soka od nara na redoks ravnotežu u različitim metaboličkim poremećajima uključujući i stanje MetS.

ZAKLJUČAK

Nar je bogat izvor širokog spektra jedinjenja sa korisnim biološkim dejstvom pre svega na metabolizam lipida i redoks ravnotežu. Konzumiranje soka od nara ima preventivnu ulogu ili čak poboljšava tok bolesti kao što su gojaznost, dijabetes, KVB. Međutim, zbog disproporcije koja postoji među rezultatima neophodna su dalja istraživanja koja treba da otkriju tačan mehanizam delovanja bioaktivnih sastojaka nara i njegov potpun potencijal kao preventivno i terapijsko sredstvo kod bolesti koje čine komponente MetS-a.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je podržan od strane Ministarstva za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj, Republike Srbije, ugovor broj 451-03-68/2020-14/200015.

Doza	Dužina suplementacije	Ispitanici	Efekat na lipidni profil i oksidativni stres	Reference
200 ml	6 nedelja	Dijabetičari tip 2	LDL-holesterol ↓, Holesterol ↓, MDA ↓	[62]
300 ml	6 nedelja	Pacijenti sa MetS	MDA ↓	[65]
500 ml	8 nedelja	Gojazne žene sa hiperlipidemijom	Holesterol ↓, LDL-holesterol ↓, TG ↓	[78]
200 ml	6 nedelja	Dijabetičari tip 2	LDL-holesterol ↓, Holesterol ↓	[82]
40 g/dan	8 nedelja	Dijabetičari tip 2 sa hiperlipidemijom	LDL-holesterol ↓, LDL/HDL Holesterol ↓	[83]
300ml	2 nedelje	Gojazne osobe sa dislipidemijom	LDL-holesterol ↓; GPx↓	[84]
45 g	3 meseca	Dijabetičari tip 2	Nema uticaja	[87]
300 ml	6 nedelja	Pacijenti sa MetS	GPx↓	Rezultati nisu publikovani [118]
500 ml	1 nedelja	Zdravi volonteri	MDA ↓	[119]
250 ml	12 nedelja	Dijabetičari tip 2	MDA ↓	[122]
100 ml	48 nedelja	Pacijenti na hemodializи	MDA ↓	[125]
250 ml	2 nedelje	Zdravi volonteri	GPx↑, SOD↑	[126]
200 ml	8 nedelja	Pacijenti sa osteoartritism	GPx↑	[126]

Tabela1. Efekat soka od nara na lipidne i parametre oksidativnog stresa u humanim studijama
MetS-metabolički sindrom, LDL-holesterol (engl. low density lopoprotien), HDL- holesterol (engl. high density lopoprotien), MDA (engl. malondyaldehide), GPx (engl. glutathione peroxidase), SOD (engl. superoxide dismutase)

Literatura

- Bhandari P. Pomegranate (*Punica granatum L.*). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases 2012;2 (3):171–84.
- Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2010;9 (6):635–54.
- Aviram M, Kaplan M, Rosenblat M, Fuhrman B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. Handbook of Experimental Pharmacology 2005;(170):263–300.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008;56 (4):1415–22.
- Rozenberg O, Howell A, Aviram M. Pomegranate juice sugar fraction reduces macrophage oxidative state, whereas white grape juice sugar fraction increases it. Atherosclerosis. 2006;188 (1):68–76.
- Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). Food Chemistry 2011;127 (2):807–21.
- Young JE, Pan Z, Teh HE, Menon V, Modereger B, Pesek JJ, et al. Phenolic composition of pomegranate peel extracts using an liquid chromatography-mass spectrometry approach with silica hydride columns. Journal of Separation Science 2017;40 (7):1449–56.
- Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JL, Sodhi K. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. International Journal of Medicine 2016;13 (1):25–38.
- Forni C, Facchiano F, Bartoli M, Pieretti S, Facchiano A, D'Arcangelo D, et al. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. BioMed Research International 2019;2019:8748253.
- Finicelli M, Squillaro T, Di Cristo F, Di Salle A, Melone MAB, Galderisi U, et al. Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives. Journal of Cellular Physiology 2019 May;234 (5):5807–26.
- Vucic V, Grabež M, Trchounian A, Arsic A. Composition and Potential Health Benefits of Pomegranate: A Review. Current Pharmaceutical Design 2019;25 (16):1817–27.
- Martin KR. Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. In: Seeram NP, Schulman RN, Heber D, editors. Angewandte Chemie International Edition. Los Angeles: CRC press; 2007. p. 67–68.
- Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. Advanced Biomedical Research 2014;3:100.
- Lakey-Beitia J, Berrocal R, Rao KS, Durant AA. Polyphenols as therapeutic molecules in Alzheimer's disease through modulating amyloid pathways. Molecular Neurobiology 2015;51 (2):466–79.

15. Choi D-Y, Lee Y-J, Hong JT, Lee H-J. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* 2012;87 (2):144–53.
16. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2010;2 (12): 231–1246.
17. Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56 (18):8418–26.
18. Thilakarathna SH, Rupasinghe HPV. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients* 2013;5 (9):3367–87.
19. Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences* 2007; 8(9): 950–988.
20. Silveira AC, Dias JP, Santos VM, Oliveira PF, Alves MG, Rato L, et al. The Action of Polyphenols in Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: A Common Agent for Overlapping Pathologies. *Current Neuropharmacology* 2019;17 (7):590–613.
21. El Gharris H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science Technology* 2009;44 (12):2512–8.
22. Lee W-H, Loo C-Y, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current Neuropharmacology* 2013;11 (4):338–78.
23. Brglez Mojzer E, Knez Hrcic M, Skerget M, Knez Z, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 2016; 21 (7):901.
24. Gil MI, García-Viguera C, Artés F, Tomás-Barberán FA. Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1995;68 (1):77–81.
25. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48 (10):4581–9.
26. Arapitsas P, Menichetti S, Vincieri FF, Romani A. Hydrolyzable Tannins with the Hexahydroxydiphenoyl Unit and the m-Depsidic Link: HPLC-DAD-MS Identification and Model Synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55 (1):48–55.
27. Bakkalbaşı E, Menteş O, Artık N. Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2009;49 (3):283–98.
28. González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MÁ, Tomé-Carneiro J, Zafrilla P, Mulero J, et al. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *Journal of Functional Foods* 2015;19 (A):225–35.
29. Cerdá B, Llorach R, Cerón JJ, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *European Journal of Nutrition* 2003;42 (1):18–28.
30. Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarrías A, Selma M V, Espín JC. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014;62 (28):6535–8.
31. Whitley AC, Sweet DH, Walle T. Site-specific accumulation of the cancer preventive dietary polyphenol ellagic acid in epithelial cells of the aerodigestive tract. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology* 2006;58 (9):1201–9.
32. Nuñez-Sánchez MA, García-Villalba R, Monedero-Saiz T, García-Talavera N V, Gómez-Sánchez MB, Sánchez-Álvarez C, et al. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Molecular Nutrition & Food Research* 2014;58 (6):1199–211.
33. Vázquez-Araújo L, Chambers E 4th, Adhikari K, Carbonell-Barrachina ÁA. Sensory and physicochemical characterization of juices made with pomegranate and blueberries, blackberries, or raspberries. *J Food Sci.* 2010;75 (7):S398–404.
34. Melgarejo P, Calín-Sánchez Á, Vázquez-Araújo L, Hernández F, Martínez JJ, Legua P, et al. Volatile composition of pomegranates from 9 Spanish cultivars using headspace solid phase microextraction. *Journal of Food Science* 2011;76(1):S114–20.
35. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000;891 (1):183–8.
36. Schwartz E, Tzuker R, Glazer I, Bar-Ya'akov I, Wiesman Z, Tripler E, et al. Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions/fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57 (19):9197–209.
37. Kaufman M, Wiesman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55 (25):10405–13.
38. Elfalleh W, Ying M, Nasri N, Sheng-Hua H, Guasmi F, Ferchichi A. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2011;62 (3):200–6.
39. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016;2016:7432797.
40. Tsai H-Y, Ho C-T, Chen Y-K. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis* 2017;25 (1):134–47.
41. Avetisyan A, Markosian A, Petrosyan M, Sahakyan N, Babayan A, Aloyan S, et al. Chemical composition and some biological activities of the essential oils from basil Ocimum different cultivars. *BMC complementary and alternative medicine* 2017;17 (1):60.
42. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M de L, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 2009;113 (4):859–71.
43. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten S V, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine* 2010;31 (6):435–45.
44. Aloqbi A, Omar U, Yousr M, Grace M, Lila M, Howell N. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Punicalagin. *Natural Sciences* 2016;08 (06):235–46.
45. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine* 1991;91 (3C):14S–22S.
46. Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology: CBP* 2006;142 (3–4):317–27.
47. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001;74 (4):418–25.
48. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2010;2 (11):1106–31.
49. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation.

- Biochemical Pharmacology 2013 Mar;85 (6):705–17.
- 50. Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. Toxicology 2008;246 (1):24–33.
 - 51. Sun W, Yan C, Frost B, Wang X, Hou C, Zeng M, et al. Pomegranate extract decreases oxidative stress and alleviates mitochondrial impairment by activating AMPK-Nrf2 in hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. Scientific Reports 2016;6:34246.
 - 52. Yan C, Sun W, Wang X, Long J, Liu X, Feng Z, et al. Punicalagin attenuates palmitate-induced lipotoxicity in HepG2 cells by activating the Keap1-Nrf2 antioxidant defense system. Molecular Nutrition and Food Research 2016;60 (5):1139–49.
 - 53. Sekiya M, Hiraishi A, Touyama M, Sakamoto K. Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008;375 (4):602–7.
 - 54. Giera M, Lingeman H, Niessen WMA. Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. Chromatographia. 2012;75 (9–10):433–40.
 - 55. Ahmed ST, Islam MM, Bostami ABMR, Mun H-S, Kim Y-J, Yang C-J. Meat composition, fatty acid profile and oxidative stability of meat from broilers supplemented with pomegranate (*Punica granatum L.*) by-products. Food Chemistry 2015;188:481–8.
 - 56. Vetterli L, Brun T, Giovannoni L, Bosco D, Maechler P. Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E beta-cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism. Journal of Biological Chemistry 2011;286 (8):6049–60.
 - 57. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection E, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation 2002; 106:3143–421.
 - 58. Amri Z, Ben Khedher MR, Zaibi MS, Kharroubi W, Turki M, Ayadi F, et al. Anti-diabetic effects of pomegranate extracts in long-term high fructose-fat fed rats. Clinical Phytoscience 2020;6(1).
 - 59. Barrett A, Ndou T, Hughey CA, Straut C, Howell A, Dai Z, et al. Inhibition of α-amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2013;61 (7):1477–86.
 - 60. Amor AJ, Gómez-Guerrero C, Ortega E, Sala-Vila A, Lázaro I. Ellagic Acid as a Tool to Limit the Diabetes Burden: Updated Evidence. Antioxidants 2020;9 (12):1226.
 - 61. Adisakwattana S, Jiphimai P, Prutanopajai P, Chanathong B, Sapwarobol S, Ariyapitipan T. Evaluation of alpha-glucosidase, alpha-amylase and protein glycation inhibitory activities of edible plants. International Journal of Food Sciences and Nutrition 2010;61 (3):295–305.
 - 62. Parsaeyan N, Mozaffari-Khosravi H, Mozayan MR. Effect of pomegranate juice on paraoxonase enzyme activity in patients with type 2 diabetes. Journal of Diabetes and Metabolic Disorders 2012;11 (1):11.
 - 63. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. Clinical Nutrition 2004;23 (3):423–33.
 - 64. Basu A, Newman ED, Bryant AL, Lyons TJ, Betts NM. Pomegranate Polyphenols Lower Lipid Peroxidation in Adults with Type 2 Diabetes but Have No Effects in Healthy Volunteers: A Pilot Study Arpita. Journal of Nutrition and Metabolism 2013;2013:708381.
 - 65. Kojadinovic MI, Arsic AC, Debeljak-Martacic JD, Konic-Ristic AI, Kardum ND, Popovic TB, et al. Consumption of pomegranate juice decreases blood lipid peroxidation and levels of arachidonic acid in women with metabolic syndrome. Journal of the Science of Food and Agriculture 2017;97 (6):1798–804.
 - 66. Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmier JJ, Chew MH, Marlin R, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. American Journal of Cardiology 2005;96 (6):810–4.
 - 67. González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Espinel-Bermúdez MC, Pérez-Rubio KG. Effect of pomegranate juice on insulin secretion and sensitivity in patients with obesity. Annals of Nutrition and Metabolism 2011;58 (3):220–3.
 - 68. Moazzen H, Alizadeh M. Effects of Pomegranate Juice on Cardiovascular Risk Factors in Patients with Metabolic Syndrome: a Double-Blinded, Randomized Crossover Controlled Trial. Plant Foods for Human Nutrition 2017;72 (2):126–33.
 - 69. Faghihimani Z, Mirmiran P, Sohrab G, Iraj B, Faghihimani E. Effects of Pomegranate Seed Oil on Metabolic State of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. International Journal of Preventive Medicine 2016;7:124.
 - 70. Sohrab G, Nasrollahzadeh J, Zand H, Amiri Z, Tohidi M, Kimiagar M. Effects of pomegranate juice consumption on inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial. Journal of Research in Medical Sciences 2014;19 (3):215–20.
 - 71. Huang H, Liao D, Chen G, Chen H, Zhu Y. Lack of efficacy of pomegranate supplementation for glucose management, insulin levels and sensitivity: evidence from a systematic review and meta-analysis. Nutr Journal 2017;16 (1):67.
 - 72. Medjakovic S, Jungbauer A. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. Food Function 2013;4 (1):19–39.
 - 73. James WPT, Jakson-Leach R, Mhurchu CN, Kalamara E, Shayeghi M, Rigby NJ, Nishida C. Overweight and obesity (high body mass index). Geneva : World Health Organization; 2003. p.497–596.
 - 74. Khoshnur J, Nusratun N, Tohmina Afrose B AH and Mohammed R. Can *Punica granatum* be a Miracle in Ameliorating Obesity? - A Short Review. EC Pharmacology and Toxicology 2020;8 (6):52–60.
 - 75. Bounihi A, Bitam A, Bouazza A, Yargui L, Koceir EA. Fruit vinegars attenuate cardiac injury via anti-inflammatory and anti-adiposity actions in high-fat diet-induced obese rats. Pharmaceutical Biology 2017;55 (1):43–52.
 - 76. Adnyana IK, Sukandar EY, Yuniarto A, Setiawan F. Anti-obesity Effect of the Pomegranate Leaves Ethanol Extract (*Punicagranatum*) in High-Fat Diet induced Mice. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2014;6 (4):626–31.
 - 77. Trichur Khabeer S, Prashant A, Haravey Krishnan M. Dietary fatty acids from pomegranate seeds (*Punica granatum*) inhibit adipogenesis and impact the expression of the obesity-associated mRNA transcripts in human adipose-derived mesenchymal stem cells. Journal of Food Biochemistry 2019;43 (3):e12739.
 - 78. Haghigian M, Rafraf M, Moghaddam A, Hemmati S, Jafarabadi M, Gargari B. Pomegranate (*Punica granatum L.*) peel hydro alcoholic extract ameliorates cardiovascular risk factors in obese women with dyslipidemia: A double blind, randomized, placebo controlled pilot study. European Journal of Integrative Medicine 2016;8 (5):676–82.
 - 79. Jang A, Srinivasan P, Lee NY, Song HP, Lee JW, Lee M, et al. Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid-linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice. Chemico-Biological Interactions 2008;174 (2):109–17.
 - 80. Yamasaki M, Kitagawa T, Koyanagi N, Chujo H, Maeda H, Kohno-Murase J, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. Nutrition. 2006;22 (1):54–9.
 - 81. McFarlin BK, Strohacker KA, Kueht ML. Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. British Journal of Nutrition 2009;102 (1):54–9.

82. Sohrab G, Roshan H, Ebrahimof S, Nikpayam O, Sotoudeh G, Siasi F. Effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A single-blind randomized clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN* 2019;29:30–5.
83. Esmaillzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *Journal of Medicinal Food* 2004;7 (3):305–8.
84. Kojadinovic M, Glibetic M, Vucic V, Popovic M, Vidovic N, Debeljak-Martacic J, et al. Short-Term Consumption of Pomegranate Juice Alleviates Some Metabolic Disturbances in Overweight Patients with Dyslipidemia. *Journal of Medicinal Food* 2021, <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0122>
85. Shishehbor F, Mohammad Shahi M, Zarei M, Saki A, Zakerkish M, Shirani F, et al. Effects of Concentrated Pomegranate Juice on Subclinical Inflammation and Cardiometabolic Risk Factors for Type 2 Diabetes: A Quasi-Experimental Study. *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 2016;14 (1):e33835.
86. Hajimahmoodi M, Oveisí MR, Sadeghi N, Jannat B, Nateghi M. Antioxidant Capacity of Plasma after Pomegranate Intake in Human Volunteers. *Acta Medica Iranica* 1970;47 (2):125–132.
87. Rashidi AA, Jafari-Mensadi F, Zinsaz A, Sadafi Z. Effect of concentrated pomegranate juice consumption on glucose and lipid profile concentrations in type 2 diabetic patients. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2013;15 (6):40–2.
88. Sahebkar A, Simental-Mendia LE, Giorgini P, Ferri C, Grassi D. Lipid profile changes after pomegranate consumption: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytomedicine* 2016;23 (11):1103–12.
89. Hsu S-C, Huang C. Changes in liver PPAR α mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007;18 (2):86–96.
90. Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J. Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;2013:789764.
91. Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 2002;43 (6):1565–75.
92. Ogino Y, Osada K, Nakamura S, Ohta Y, Kanda T, Sugano M. Absorption of dietary cholesterol oxidation products and their downstream metabolic effects are reduced by dietary apple polyphenols. *Lipids*. 2007;42 (2):151–61.
93. Aoun M, Michel F, Fouret G, Casas F, Jullien M, Wrutniak-Cabello C, et al. A polyphenol extract modifies quantity but not quality of liver fatty acid content in high-fat-high-sucrose diet-fed rats: possible implication of the sirtuin pathway. *British Journal of Nutrition* 2010;104 (12):1760–70.
94. Kardum N, Petrovic-Oggiano G, Takic M, Glibetic N, Zec M, Debeljak-Martacic J, et al. Effects of glucomannan-enriched, aronia juice-based supplement on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in subjects with abdominal obesity. *Scientific World Journal* 2014;2014:869250.
95. Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, You M. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008;295 (4):G833–42.
96. Klaus S, Pütz S, Thöne-Reineke C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *International Journal of Obesity* 2005;29 (6):615–23.
97. Sahebkar A, Ferri C, Giorgini P, Nachtigal P, Grassi D. Effects of pomegranate juice on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research* 2017;115:149–161.
98. Huang W-Y, Davidge ST, Wu J. Bioactive natural constituents from food sources-potential use in hypertension prevention and treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2013;53 (6):615–30.
99. Shao J, Wang P, Liu A, Du X, Bai J, Chen M. Punicalagin Prevents Hypoxic Pulmonary Hypertension via Anti-Oxidant Effects in Rats. *American Journal of Chinese Medicine* 2016;44 (4):785–801.
100. Dos Santos RL, Dellacqua LO, Delgado NTB, Rouver WN, Podratz PL, Lima LCF, et al. Pomegranate peel extract attenuates oxidative stress by decreasing coronary angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in hypertensive female rats. *Toxicology and Environmental Health* 2016;79 (21):998–1007.
101. Delgado NTB, Rouver W do N, Freitas-Lima LC, de Paula TD-C, Duarte A, Silva JF, et al. Pomegranate Extract Enhances Endothelium-Dependent Coronary Relaxation in Isolated Perfused Hearts from Spontaneously Hypertensive Ovariectomized Rats. *Frontiers in Pharmacology* 2016;7:522.
102. Grabez M, Skrbic R, Stojiljkovic MP, Rudic-Grujic V, Paunovic M, Arsic A, et al. Beneficial effects of pomegranate peel extract on plasma lipid profile, fatty acids levels and blood pressure in patients with diabetes mellitus type-2: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Functional Foods* 2020;64:10392.
103. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 2001;158 (1):195–8.
104. Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Hashemi M, Rafieian-Kopaei M. Clinical investigation of the acute effects of pomegranate juice on blood pressure and endothelial function in hypertensive individuals. *ARYA Atherosclerosis* 2013;9 (6):326–31.
105. Knox M, Vinet R, Fuentes L, Morales B, Martínez JL. A Review of Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilation Induced by Phytochemicals in Isolated Rat Aorta. *Animals* 2019;9 (9):623.
106. Olszanecki R, Gebska A, Kozłowski VI, Gryglewski RJ. Flavonoids and nitric oxide synthase. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 2002;53 (4 Pt 1):571–84.
107. Taniyama Y, Griendlung KK. Reactive Oxygen Species in the Vasculature. *Hypertension* 2003;42(6):1075–81.
108. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004;24 (5):816–23.
109. Otani H. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxidants and Redox Signaling* 2011;15 (7):1911–26.
110. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003;88 (10):4673–6.
111. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003;52 (9):2346–52.
112. McCord JM, Keele BBJ, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1971;68 (5):1024–7.
113. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis* 2006;187 (2):363–71.

114. Zou X, Yan C, Shi Y, Cao K, Xu J, Wang X, et al. Mitochondrial dysfunction in obesity-associated nonalcoholic fatty liver disease: the protective effects of pomegranate with its active component punicalagin. *Antioxidants and Redox Signaling* 2014;21 (11):1557–70.
115. Parmar HS, Kar A. Medicinal values of fruit peels from *Citrus sinensis*, *Punica granatum*, and *Musa paradisiaca* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *Journal of Medicinal Food*. 2008;11 (2):376–81.
116. Al-Gubory KH, Blachier F, Faure P, Garrel C. Pomegranate peel extract decreases small intestine lipid peroxidation by enhancing activities of major antioxidant enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2016;96 (10):3462–8.
117. Mollazadeh H, Boroushaki MT, Soukhtanloo M, Afshari AR, Vahedi MM. Effects of pomegranate seed oil on oxidant/antioxidant balance in heart and kidney homogenates and mitochondria of diabetic rats and high glucose-treated H9c2 cell line. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2017;7 (4):317–33.
118. Matthaiou CM, Goutzourelas N, Stagos D, Sarafoglou E, Jamurtas A, Koulocheri SD, et al. Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food and Chemical Toxicology* 2014;73:1–6.
119. Sohrab G, Angoorani P, Tohid M, Tabibi H, Kimiagar M, Nasrollahzadeh J. Pomegranate (*Punica granatum*) juice decreases lipid peroxidation, but has no effect on plasma advanced glycated end-products in adults with type 2 diabetes: A randomized double-blind clinical trial. *Food and Nutrition Research* 2015;59 (8):1–6.
120. Ammar A, Turki M, Hammouda O, Chtourou H, Trabelsi K, Bouaziz M, et al. Effects of Pomegranate Juice Supplementation on Oxidative Stress Biomarkers Following Weightlifting Exercise. *Nutrients* 2017;9 (8):819.
121. Hosseini B, Saedisomeolia A, Wood LG, Yaseri M, Tavassoli S. Effects of pomegranate extract supplementation on inflammation in overweight and obese individuals: A randomized controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 2016;22:44–50.
122. Shema-Didi L, Sela S, Ore L, Shapiro G, Geron R, Moshe G, et al. One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: a randomized placebo-controlled trial. *Free Radical Biology and Medicine* 2012;53 (2):297–304.
123. Ghavipour M, Sotoudeh G, Tavakoli E, Mowla K, Hasanzadeh J, Mazloom Z. Pomegranate extract alleviates disease activity and some blood biomarkers of inflammation and oxidative stress in Rheumatoid Arthritis patients. *European Journal of Nutrition* 2017;71 (1):92–6.
124. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhownik M, Sultana S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology* 2009;47 (1):50–4.
125. Mazani M, Fard AS, Baghi AN, Nemati A, Mogadam RA. Effect of pomegranate juice supplementation on matrix metalloproteinases 2 and 9 following exhaustive exercise in young healthy males. *Journal of the Pakistan Medical Association* 2014;64 (7):785–90.
126. Ghoochani N, Karandish M, Mowla K, Haghhighizadeh MH, Jalali MT. The effect of pomegranate juice on clinical signs, matrix metalloproteinases and antioxidant status in patients with knee osteoarthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2016;96 (13):4377–81.
127. Kojadinovic M, Arsic A, Petovic-Oggiano G, Gavrovic-Jankulovic M, Glibetic M, Popovic M. Effect of urolithins on oxidative stress of colorectal adenocarcinomacells-Caco-2. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2017;68 (8):952–9.
128. Castaneda-Ovando A, De Lourdes Pacheco-Hernandez M, Paez-Hernandez ME, Rodriguez JA G-VC. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 2009;113 (4):859–71.
129. Cao K, Xu J, Pu W, Dong Z, Sun L, Zang W, et al. Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. *Scientific Report* 2015;5 (1):14014.

MOLEKULARNA BIOLOGIJA PROKARIOTA MOLECULAR BIOLOGY OF PROKARYOTES



Biogeni utišavači virulencije vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Milka Malešević¹, Branko Jovčić^{1,2}

¹Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija ²Univerzitet u Beogradu Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: milkam@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Pseudomonas aeruginosa jedan je od najznačajnijih uzročnika unutarbolničkih infekcija čiji je terapijski tretman konvencionalnim antibioticima sve češće neefikasan usled rezistencije na antibiotike. Inovativni vidovi kontrole infekcija, poput utišavanja međućelijske komunikacije bakterija, a time i onemogućavanja virulencije i inhibicije patogenog fenotipa su stoga od izuzetnog značaja. U ovom radu biće predstavljena istraživanja koja su bazirana na prirodnom svojstvu bakterija koje dele ekološke niše da sarađuju, ali i kompetiraju, na osnovu čega su analizirane *Delftia tsuruhatensis* i *Burkholderia cepacia* koje tokom infekcija kolokalizuju sa *P. aeruginosa*. Pokazano je da *D. tsuruhatensis* 11304 produkuje C18-HSL koji inhibira virulenciju *P. aeruginosa* i rekonstituiše osetljivost na antibiotike, a takođe je po prvi put u literaturi opisano prisustvo dihidroksi-C18-HSL u biološkim uzorcima. Opisane su i laktonaze vrste *B. cepacia* BCC4135 koje degradaju autoinducere komunikacije *P. aeruginosa* i inhibiraju ekspresiju faktora virulencije. Utvrđena je njihova supstratna specifičnost i ukazano na različitu biološku funkciju u zavisnosti od lokalizacije.

Ključne reči: međućelijska komunikacija bakterija, virulencija, biofilm, utišavanje međućelijske komunikacije bakterija, antivirulentni agensi, *Pseudomonas aeruginosa*

Biogenic silencers of *Pseudomonas aeruginosa* virulence

Milka Malešević¹, Branko Jovčić^{1,2}

¹Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia ²University of Belgrade Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

Correspondence: milkam@imgge.bg.ac.rs

166

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of nosocomial infections, whose therapeutic treatment with conventional antibiotics is increasingly ineffective due to antibiotic resistance. Innovative approaches of infection control, such as silencing the bacterial quorum sensing system and thus virulence and pathogenic phenotype inhibition are of great importance. In this study, there will be presented research based on natural feature of bacteria that share the same ecological niche to coordinate, but also to compete, based on which *Delftia tsuruhatensis* and *Burkholderia cepacia* that colocalize with *P. aeruginosa* during infections were analysed. *D. tsuruhatensis* 11304 has been shown to produce C18-HSL which inhibits *P. aeruginosa* virulence and reconstitutes antibiotic susceptibility, and the presence of dihydroxy-C18-HSL in biological samples has also been described for the first time in the literature. *B. cepacia* BCC4135 lactonases that degrade autoinducers of *P. aeruginosa* quorum sensing system and inhibit virulence factor expression have also been reported. Their substrate specificity was determined and different biological function depending on their localization was indicated.

Keywords: quorum sensing, virulence, biofilm, quorum quenching, antivirulence agents, *Pseudomonas aeruginosa*

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa je Gram-negativni bacil, koga odlikuje sposobnost kolonizacije raznolikih ekoloških niša i široka rasprostranjenost u okruženju [1]. Međutim, najnoviji podaci dobijeni meta-analizom ukazuju da je prisustvo ove bakterije u okruženju najučestalije na staništima usko povezanim sa ljudskom aktivnošću [2].

P. aeruginosa zauzima vodeće mesto među Gram-negativnim patogenim bakterijama kao uzročnik brojnih akutnih i hroničnih infekcija, naročito kod osoba sa oslabljenim imunskim sistemom. Predstavlja glavnog uzročnika smrtnih ishoda kod pacijenata obolelih od cistične fiboze i vodeći je uzročnik unutarbolničkih infekcija [1]. Široka rasprostranjenost ovog patogena u zdravstvenim ustanovama omogućena je zahvaljujući njegovoj mogućnosti transmisije sa pacijenta na pacijenta, sposobnosti dugotrajnog opstanka na živim i neživim površinama, kao i otpornosti na dezifikacije [3]. Smatra se da je za opstanak *P. aeruginosa* u različitim staništima naročito zaslužna izuzetna plastičnost genoma i sposobnost usvajanja stranih gena. Za patogenezu pseudomonasne infekcije odgovorni su brojni mehanizmi rezistencije na antibiotike kao i arsenal faktora virulencije. Usled sve veće prevalence rezistencije i neefikasnosti antibakterijskih agenasa koji se koriste u tretmanu infekcija izazvanih ovom bakterijom, vrsta *P. aeruginosa* uvrštena je na listu ESKAPE patogena (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp.), koji predstavljaju najveću opasnost po javno zdravlje [4]. Značaj ove bakterijske vrste potvrdila je Svetska zdravstvena organizacija 2017. godine kada je *P. aeruginosa* pozicionirala na listu od 12 patogena za koje je hitno potreban razvoj novih terapeutika [4].

Mehanizmi rezistencije na antibiotike kod *P. aeruginosa* mogu biti urođeni, stečeni i adaptativni. Na osnovu širine spektra rezistencije na antibiotike, izolati *P. aeruginosa* svrstani su u dve grupe: višestruko rezistentni (eng. *multi-drug resistant*, MDR) i ekstremno rezistentni (eng. *extensively drug-resistant*, XDR). Prema podacima Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti za 2016. godinu, 33,9% kliničkih izolata *P. aeruginosa* ispoljilo je rezistentan fenotip na najmanje jednu od grupa antibiotika koje se koriste za nadzor ovog patogena [5].

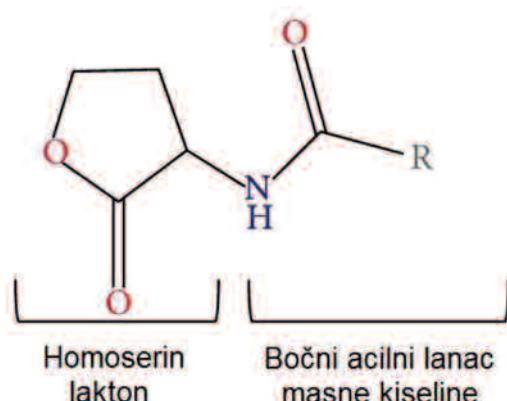
FAKTORI VIRULENCIJE VRSTE *P. AERUGINOSA*

Producija faktora virulencije predstavlja veoma važnu strategiju preživljavanja patogena, koja im omogućava odbranu od imunskog sistema domaćina i napredovanje patogeneze, posebno u ranim fazama kolonizacije domaćina i akutne infekcije [1]. U osnovi patogenosti *P. aeruginosa* leže brojni faktori virulencije, koji se na osnovu ćelijske lokalizacije mogu podeliti na: faktore virulencije vezane za površinu ćelije; faktore koji se oslobođaju iz ćelije i različiti tipovi sekretornih sistema. Međućelijska komunikacija bakterija vrši modulaciju signala iz spoljašnje sredine i reguliše produkciju faktora virulencije, dok je formiranje biofilma najkompleksniji i najznačajniji virulentni faktor zato što integriše sve preostale faktore u jednu celinu.

MEĐUĆELIJSKA KOMUNIKACIJA BAKTERIJA

Međućelijska komunikacija bakterija odnosno *quorum sensing* (QS) predstavlja obrazac ponašanja zasnovan na gustoći bakterijske populacije koji koriste jednoćelijski organizmi u cilju prilagođavanja uslovima životne sredine, u svrhu međusobne kompeticije kao i interakcije sa višećelijskim organizmima [6]. Signalni molekuli QS sistema-autoinduceri (AI) ostvaruju dvostruku ulogu: vezivanjem za receptore aktiviraju ekspresiju ciljnih gena i produkciju novih AI, čime se ostvaruje pozitivna povratna sprega koja omogućava sinhrono ponašanje ćelija u bakterijskoj populaciji.

Gram-negativne proteobakterije koriste hemijske signalne molekule *N*-acil-homoserin laktone (AHL) u svrhu međućelijske komunikacije. Strukturu AHL čini laktonski prsten za koji je amidnom vezom bočno vezan acilni lanac dužine od 4 do 20 C atoma (Slika 1). Acilni lanac može nositi nesaturisane dvostrukе veze ili posedovati modifikacije na C3 atomu (okso ili hidroksi supstituent) [7]. Po dostizanju kritične koncentracije AHL se vezuje za citoplazmatski transkripcioni regulator (receptor, R), pri čemu se uspostavlja kompleks AI/R. Ovaj kompleks potom, kod individualnih ćelija koje čine bakterijsku populaciju, omogućava simultanu aktivaciju transkripcije gena pod kontrolom QS sistema [8]. AHLom posredovan QS sistem bakterije prevashodno koriste za intraspecijsku komunikaciju. Osim što jedinke iste bakterijske vrste međusobno razmenjuju hemijske signale, bakterije imaju sposobnost "prisluškivanja" komunikacije dru-



Slika 1. Struktura *N*-acil-homoserin laktona.

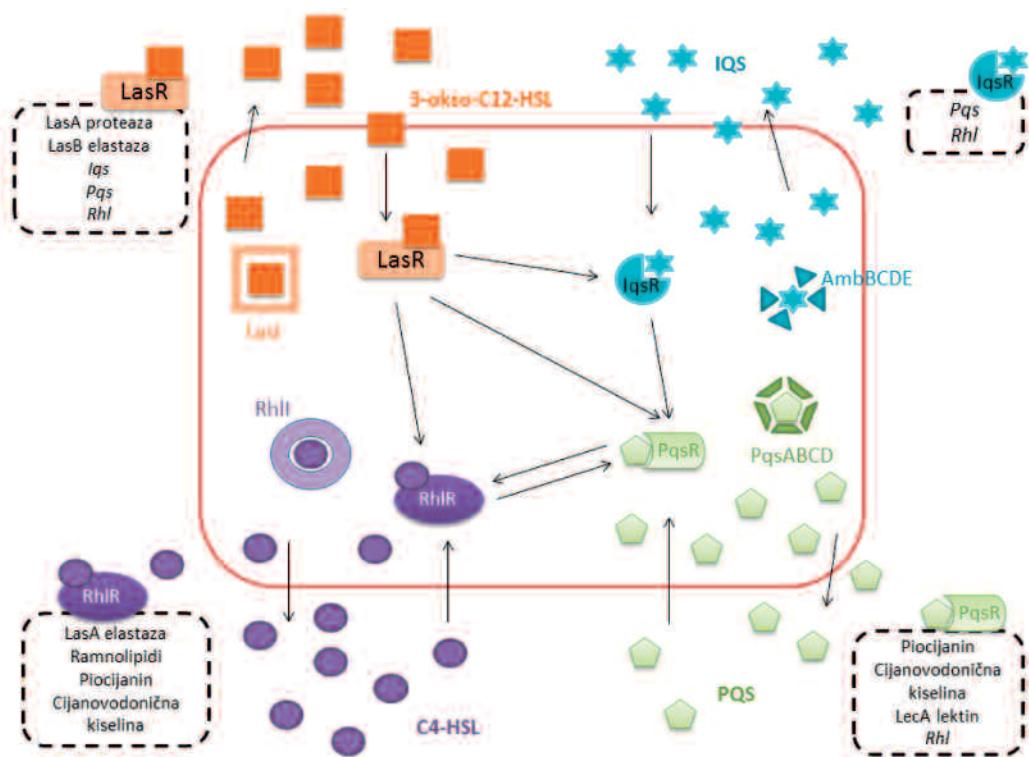
nih mikroorganizama, usklađujući svoje ponašanje kao odgovor na signalne molekule koje same ne sintetišu. Ovaj vid komunikacije karakterističan je za patogene bakterije koje koriste kooperativno ili kompetitivno ponašanje sa ciljem kolonizacije domaćina.

MEĐUČELIJSKA KOMUNIKACIJA VRSTE *P. AERUGINOSA*

QS sistem vrste *P. aeruginosa* veoma je kompleksna, hijerarhijski uređena mreža, koju čine četiri međusobno povezana sistema: *las*, *rhl*, *pqs* i *iqs* (Slika 2). QS sistem kod ovog patogena kontroliše formiranje biofilma, sintezu sekundarnih metabolita i faktora čija je uloga zaštita od imunskog sistema domaćina [9]. *P. aeruginosa* poseduje najsloženiju i najbolje istraženu QS signalnu mrežu [9]. Uloga međučelijske komunikacije u patogenezi *P. aeruginosa* ogleda se u činjenici da je više od 10% ukupnih gena i više od 20% eksprimiranog bakterijskog proteoma uključeno u QS sistem [1].

Prvi opisani QS sistem vrste *P. aeruginosa*, *las* sistem, čine *lasl* gen koji kodira LasI sintazu; *lasR* gen koji kodira transkripcioni aktivator LasR i *rsaL* gen koji kodira transkripcioni represor (RsaL) *lasl* gena. Signalni molekul *las* sistema je *N*-3-okso-dodecanoil-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL). Ovaj signalni put reguliše sintezu metaloproteinaze elastaze, egzotoksina A i alkalne proteaze [10]. QS sistem *rhl* odgovoran je za sintezu ramnolipida, a takođe kontroliše sintezu egzoprodukata piocijanina, cijanovodonične kiseline i elastaze [11]. Hemski molekul ovog signalnog puta je *N*-butiril-homoserin lakton (C4-HSL), a njegova sinteza je pod kontrolom *rhl* gena. Treći QS sistem, *pqs* sistem, je dobio naziv po svom signalnom molekulu PQS (eng. *Pseudomonas aeruginosa quinolone signal*). PQS je po svojoj strukturi 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolon, a njegova sinteza je pod kontrolom *pqsA* gena. Nakon vezivanja za PqsR receptor (označen i kao MvfR), PQS aktivira ekspresiju ciljnih gena odgovornih za sintezu PQS i piocijanina. Ovaj QS sistem je pored sinteze piocijanina, od suštinskog značaja za pokretljivost i formiranje biofilma [12]. Četvrti QS sistem označen je kao *iqs* (eng. *integrated quorum sensing*) i vrši integraciju signala iz spoljašnje sredine u kompleksnu QS mrežu [12]. Iako status ovog signalnog puta još nije potpuno razjašnjen, ustanovaljeno je da ima ulogu u regulaciji patogeneze *P. aeruginosa*.

Sva četiri QS sistema *P. aeruginosa* organizovana su u složenu hijerarhijsku mrežu (Slika 2). Na vrhu lestvice nalazi se *las* sistem koji koordiniše preostala tri, a svaki sistem ima sposobnost autoregulacije po principu pozitivne povratne sprege. Takođe, *rhl* sistem je pozicioniran najniže na lestvici i pod kontrolom je *las*, *pqs* i *iqs* sistema, i ujedno predstavlja mesto ukrštanja ostalih signalnih puteva. Odnosi između ova četiri QS sistema su znatno kompleksniji ukoliko se uzme u obzir da, osim što mogu biti regulisani međusobno, takođe mogu biti aktivirani pod uticajem sredinskih faktora kao što su niska koncentracija kiseonika, gladovanje i faktorima poreklom od domaćina [13].



Slika 2. Šematski prikaz hijerarhijske organizacije četiri QS sistema vrste *P. aeruginosa*, njihovih komponenata i produkata.

EKSTRACELULARNI FAKTORI VIRULENCIJE

Elastaze. Sposobnost *P. aeruginosa* da razgradi elastin smatra se glavnom odrednicom patogeneze tokom akutne infekcije. Proces razgradnje elastina, gradivne komponente tkiva pluća, odvija se usklađenom aktivnošću enzima LasA i LasB elastaze [10]. Sinteza ovih enzima pod kontrolom je *las* QS sistema. Ovi enzimi, osim razgradnje elastina, imaju takođe sposobnost razgradnje kolagena i proteina surfaktanta prisutnih na površini plućnog epitela [14]. Kao posledica elastazne aktivnosti, dolazi do narušavanja integriteta epitelne barijere, slabljenja imunskog sistema domaćina, kao i smanjenja mogućnosti zarastanja rana.

Piocijanin je plavozeleni pigment iz grupe fenazina. Njegova sinteza je pod kontrolom *pqs* QS sistema, a transport u lokalno okruženje posređovan je sekrecionim sistemom tipa II [11,12]. Producija ovog sekundarnog metabolita specifična je za *P. aeruginosa* i jedan je od glavnih mehanizama kojim ova bakterija ostvaruje citotoksičan efekat na ćelije domaćina izazivanjem oksidativnog stresa. Utvrđeno je, takođe, da je ozbiljnost pseudomonasne infekcije u direktnoj spremi sa koncentracijom piocijanina u sputumu pacijenata obolelih od cistične fibroze [15].

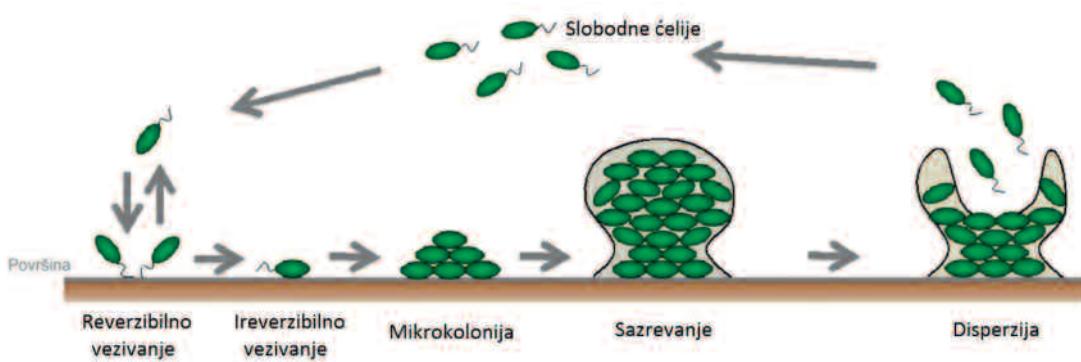
Ramnolipidi predstavljaju termostabilne glikolipide hemolizine, a njihova sinteza odvija se pod kontrolom *las* i *rhl* sistema međućelijske komunikacije. Ovi biosurfaktanti ostvaruju hemolitičku ulogu koja uključuje razgradnju lipida, narušavanje funkcije cilijarnog plućnog epitela i nekrozu ćelija domaćina, i na taj način daju doprinos invaziji tkiva domaćina [16]. Ramnolipidi, takođe, ostvaruju izuzetno važnu ulogu u nekoliko faza formiranja biofilma kao što su formiranje mikrokolonija, održavanje strukture biofilma i njegovo rasejavanje [17].

BIOFILM

Tokom istorije mikrobiologije, mikroorganizmi su prevashodno smatrani planktonskim, slobodnoživućim organizmima. Na osnovu istraživanja sprovedenih u poslednje tri decenije, nedvosmisleno je ustanovljeno da predominantna životna forma bakterija predstavlja život u zajednici biofilma, dok se planktonska forma smatra samo prelaznom fazom u životnom ciklusu bakterijske populacije. Biofilm po definiciji predstavlja visoko organizovanu zajednicu mikroorganizama pričvršćenih za površinu i uronjenih u ekstraćelijski matriks koji sami produkuju [18]. Može se formirati kako na živim, tako i na neživim površinama. Biofilm se, pored bakterijske populacije, sastoji od ekstraćelijskog matriksa koga čine polimeri kao što su egzopolisaharidi (EPS), ekstracelularna DNK (eDNK), RNK, lipidi, proteini i amiloidni agregati. U formiranju biofilma može učestvovati jedna ili veći broj bakterijskih vrsta. Procenjuje se da dentalni biofilm sadrži preko 500 različitih vrsta bakterija. Nasuprot tome, u poodmaklom stadijumu bolesti, u plućima pacijenata obolelih od cistične fibroze biofilm formira jedino *P. aeruginosa* [1].

Zajednice mikroorganizama u biofilmu razlikuju se od slobodnih ćelija na osnovu brzine rasta i ekspresije gena, usled toga što život u ovakvoj mikrosredini odlikuje povećana osmolarnost, ograničena dostupnost hranljivih materija i znatno veća gustina raznolikih bakterijskih vrsta. Povoljnosti koje obezbeđuje život u ovoj zajednici u odnosu na planktonsku formu su zaštita od delovanja faktora spoljašnje sredine kao što su isušivanje, delovanje antimikrobnih supstanci i kompeticije između različitih mikroorganizama. Međućelijska komunikacija je znatno olakšana, te biofilmovi predstavljaju idealnu nišu za razmenu informacija i sinhrono ponašanje. Smatra se da su bakterije u biofilmu do hiljadu puta tolerantnije na delovanje antibiotika u odnosu na planktonsku formu [18]. Procesi koji se odvijaju unutar ovih složenih struktura su pod direktnom kontrolom QS sistema.

Sposobnost formiranja biofilma predstavlja jednu od najznačajnijih virulentnih karakteristika *P. aeruginosa* i služan je za uspostavljanje hroničnih infekcija, i samim tim može direktno uticati na progresiju bolesti i dugotrajnu



Slika 3. Faze formiranja biofilma vrste *P. aeruginosa*.

perzistenciju [1]. Zahvaljujući tome, *P. aeruginosa* dominira u polimikrobnoj zajednici starijih osoba obolelih od cistične fibroze, istiskujući ostale članove te zajednice. Ova bakterijska vrsta uzeta je kao model sistem za proučavanje biofilmova kod Gram-negativnih bakterija. Formiranje biofilma je precizno regulisan, višestepeni proces koji čine sledeći događaji: (1) adsorpcija molekula, vezivanje bakterija za površinu (reverzibilno i ireverzibilno) i oslobođanje ekstracelularnih supstanci; (2) formiranje mikrokolonija i sazrevanje biofilma i (3) rasejanje (disperzija) (Slika 3).

ANTIVIRULENTNA TERAPIJA - TERAPIJA ZASNOVANA NA INHIBICIJI PATOGENOSTI BAKTERIJA

Iako se otkriće antibiotika smatra jednim od najznačajnijih dostignuća na polju medicine 20. veka, zlatna era antibiotika okončana je nekontrolisanom pojmom izolata rezistentnih na sve trenutno dostupne klase antibiotika među klinički značajnim bakterijskim vrstama [19]. Kao posledica toga, lečenje pojedinih infekcija postaje vrlo ograničeno ili čak onemogućeno, javljaju se i zarazne bolesti, čiji su uzročnici bakterije, koje su gotovo neizlečive konvencionalnom antibiotskom terapijom. U cilju poboljšanja efikasnosti antibiotika, pribegava se povećavanju njihovih doza ili primeni kombinovane antibiotske terapije, koja ima značajne posledice po zdravlje ljudi. Međutim, najviše zabrinjava činjenica da poslednjih decenija u kliničku praksu nije uvedena nijedna značajnija nova klasa antibiotika, te su svi trenutno dostupni antibiotici na tržištu derivati starijih generacija [19]. Zbog toga postoji urgentna potreba za razvojem i primenom novih pristupa koji bi obezbedili održivu i dugoročnu efikasnost u borbi protiv rezistentnih patogenih bakterija.

Tradicionalni antibiotici ciljaju vitalne ćelijske procese visoko konzervisane među bakterijama i time nameću snažan selektivni pritisak, što vodi ka razvoju mehanizama rezistencije, i vrlo često ka oštećenju i/ili disbiozi mikrobiote domaćina [20]. Jedan od predloženih novih pristupa cilja ćelijske procese bakterija odgovorne za virulenciju i patogenost, te je ovaj pristup označen kao "antivirulentna" ili "antipatogena" terapija. Prednost ovog pristupa ogleda se u tome što on vodi ka znatnom smanjenju selektivnog pritiska i samim tim manjoj mogućnosti razvoja rezistencije, te stoga ima značajnu prednost u pogledu kontrole infekcija. S obzirom da su antivirulentni agensi specifični za patogene, očekuje se da će imati zanemariv efekat na komensalne bakterije. Glavnu metu antivirulentne terapije predstavlja QS sistem koji koordiniše produkciju faktora virulencije i invaziju tkiva domaćina, te samim tim leži u osnovi patogenosti.

Razvoj antivirulentne terapije omogućilo je otkriće fenomena utišavanja međućelijske komunikacije bakterija. Ovaj fenomen nazvan *quorum quenching* (QQ) prvi put je opisan 2000. godine kada je identifikovan enzim AiiA laktoneaza [21]. Do danas su identifikovani brojni QQ mehanizmi koji se zasnivaju na prirodi molekula, načinu delovanja i ciljnim metama [21]. Na osnovu svoje prirode QQ molekuli su podeljeni na inhibitore *quorum sensing-a* (mali molekuli neproteinske prirode, QSI) i *quorum quenching* enzime (makromolekuli proteinske prirode).

MALI MOLEKULI UTIŠIVAČI MEĐUĆELIJSKE KOMUNIKACIJE BAKTERIJA

Mali molekuli utišivači međućelijske komunikacije bakterija (QSI) čine veoma raznoliku grupu molekula koje odlikuje sposobnost inaktivacije autoinducer sintaza i kompetitivnog vezivanja/strukturnih modifikacija receptora. U literaturi su opisani brojni QSI molekuli poreklom iz veoma različitih organizama uljučujući biljke, životinje, gljive i mikroorganizme [21]. Osim prirodnih, opisani su i brojni sintetički QSI molekuli [22]. Premda mnogi organizmi i ekstrakti pokazuju QSI aktivnost, aktivna jedinjenja su u potpunosti okarakterisana u nekolicini slučajeva. Značajno je naglasiti da je biohemijska priroda QSI veoma raznolika, i osim strukturalnih analoga signalnih molekula, koji najčešće deluju kao kompetitivni inhibitori, ne postoji direktna korelacija između hemijske strukture ili funkcionalne grupe QSI i njihovih ciljnih aktera iz QS sistema [21]. Na osnovu mehanizma delovanja, QSI su podeljeni na tri grupe:

Inhibitori sinteze signalnih molekula sprečavaju produkciju signalnih molekula posredstvom inhibicije sinteze prekursora ili same aktivnosti autoinducer sintaze. Identifikovana je nova klasa PqsD inhibitora koji značajno smanjuje koncentraciju PQS prekursora i blokira formiranje biofilma vrste *P. aeruginosa* [23].

Inhibitori transporta i razmene QS signalnih molekula doprinose smanjenju ili potpunom blokiranju transporta QS signalnih molekula. Neki od opisanih molekula imaju ulogu sekvestera autoinducera. Ustanovljeno je da anti-titela ostvaruju vrlo efikasno delovanje u sekvestraciji QS signala kod *S. aureus* i 3-okso-C12-HSL kod *P. aeruginosa* [24].

Inhibitori percepције QS signala sprečavaju vezivanje QS signala za receptor i/ili modifikuju konformaciju kompleksa signal-receptor, blokirajući njegovu dimerizaciju ili interakciju sa odgovarajućim DNK regionom. Najveći broj opisanih QSI molekula predstavljaju antagoniste QS signala. Različiti prirodni i sintetički analozi AHL molekula poput tiolaktona, laktama i halogenih furanona blokiraju *rhl* QS sistem *P. aeruginosa* [21]. Ustanovljeno je, takođe, da farnezol poreklom iz *Candida albicans* inhibira produkciju PQS signalnog molekula vezujući se za PqsR i uzrokujući konformacionu modifikaciju receptora čime se sprečava njegovo vezivanje za promotorsku sekvencu *pqsA* gena [25].

ENZIMI UTIŠIVAČI MEĐUĆELIJSKE KOMUNIKACIJE

Premda prema poreklu mogu biti veoma raznoliki, najveći broj opisanih QQ enzima izolovan je iz bakterija [26]. Iako ovi enzimi potiču od QS-emitujućih i QS-neemitujućih mikroorganizama, njihova fiziološka uloga vrlo često nije najjasnija. Filogenetskom analizom ustanovljeno je da bakterije producenti QQ enzima pripadaju trima kladama, među kojima su najzastupljeniji rodovi pripadnici β i γ proteobakterija i Gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus* i *Rhodococcus*). QQ enzimi su na osnovu mehanizma degradacije AHL signala kategorisani u tri grupe (Slika 4):

Laktonaze koje katalizuju otvaranje laktonskog prstena;

Acilaze koje hidrolizuju amidnu vezu, pri čemu dolazi do razdvajanja acilnog lanca (masne kiseline) od laktonskog prstena;

Oksidoreduktaze koje vrše oksidaciju/redukciju acilnog lanca.

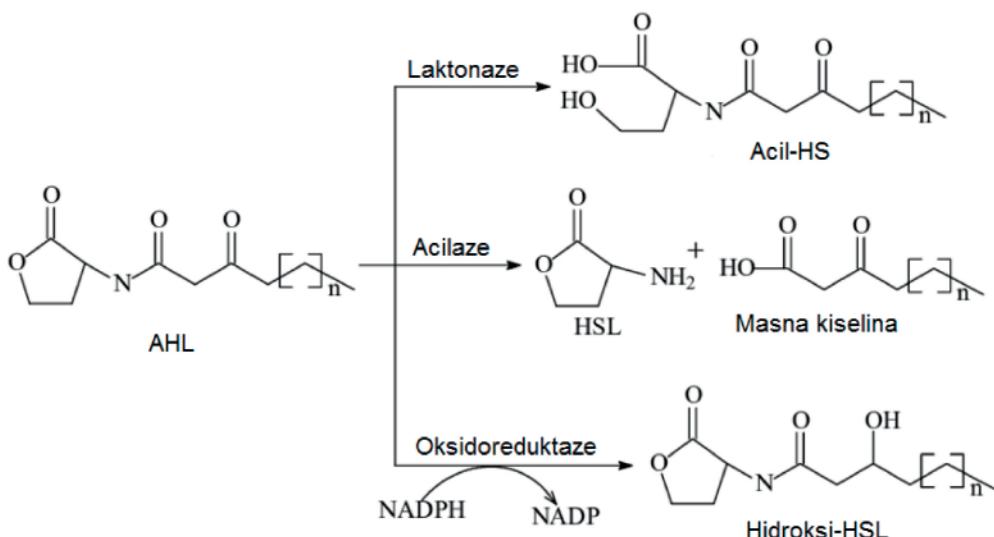
Ustanovljeno je da pojedini mikroorganizmi ne koriste QQ enzime isključivo kao deo odbrambene strategije protiv svojih kompetitora, već upotrebljavaju AHL i proekte njihove degradacije kao izvor ugljenika i azota za rast. Soj *P. aeruginosa* PAO1 i njemu blisko sroдne pseudomonade degradaju AHL dugog acilnog lanca (duže od 8 C atoma) koje potom koriste kao izvor energije [27].

Budući da pripadnici Gram-pozitivnih bakterija ne poseduju AHL-zavisan QS sistem, ekološka uloga QQ enzima poreklom iz *Bacillus* vrsta za sada nije u potpunosti razjašnjena [26]. Prepostavlja se da ovi enzimi pre imaju ulogu u detoksifikaciji AHL nego u njihovoј degradaciji, budući da je ova grupa mikroorganizama senzitivna na AHL. Stoga bi AHL za *Bacillus* mogli imati svojstvo antibiotika, dok bi laktonaze predstavljale determinante rezistencije na antibiotike [21].

Laktonaze su metaloproteini koji hidrolizuju estarsku vezu laktonskog prstena. Mehanizam delovanja AHL laktonaza je reverzibilan, a s obzirom da je identičan procesu pH-posredovane laktonolize, acidifikacija dovodi do ponovne ciklizacije laktona. Laktonaze mogu imati široku supstratnu specifičnost, s obzirom da je meta ovih enzima-laktonski prsten identičan kod svih AHL molekula [28]. Do danas je opisano preko 30 različitih tipova AHL laktonaza. Aminokiselinska sekvenca i struktura laktonaza veoma je raznovrsna, stoga su ovi enzimi svrstani u četiri superfamilije proteina: metalo- β -laktamaze, paraoksonaze, fosfotriesteraze i α/β -hidrolaze [26]. Bez obzira na veoma malu identičnost na aminokiselinskom nivou među različitim podgrupama, sve AHL laktonaze članovi superfamilije metalo- β -laktamaza poseduju visoko konzervisan HXHXDH cink-vezujući motiv neophodan za degradaciju signalnih molekula.

AHL laktonaze kao što su AiiA (poreklom iz *Bacillus* sp.), AttM (*Agrobacterium tumefaciens*), AidB (*Bosea* sp.), AidC (*Chryseobacterium* sp.), MomL (*Muricauda olearia*) i RmmL (*Ruegeria mobilis*) poseduju vrlo široku supstratnu specifičnost u pogledu dužine bočnog acilnog lanca AHL molekula [29,30], ali se razlikuju po svojim fizičko-hemijskim karakteristikama. Sposobnost ovih enzima da degradaju AHL i na taj način spreče formiranje biofilma i produkciju faktora virulencije *P. aeruginosa* potvrđena je brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama [29,31,32]. Imajući u vidu navedena svojstava, AHL laktonaze su selektovane kao dobri kandidati za antivirulentnu terapiju.

Nasuprot laktonazama, acilaze irreverzibilno hidrolizuju amidne veze između acilnog lanca i laktonskog prstena AHL, pri čemu nastaju masna kiselina i homoserin lakton. Irreverzibilna hidroliza smatra se dobrim svojstvom sa



Slika 4. Mehanizam delovanja enzima utišivača međućelijske komunikacije.

biotehnološkog aspekta, jer ne postoji mogućnost regeneracije funkcionalnog AHL. Supstratna specifičnost acilaza bazirana je na dužini acilnog lanca AHL kao i prisustvu strukturnih modifikacija na C3 atomu [28]. Do danas su identifikovane acilaze poreklom iz *Comamonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* i *Ochrobactrum* vrsta [26]. Kao i laktonaze, i ova grupa enzima ostvaruje značajan antivirulentni potencijal.

Enzimi pripadnici klase oksidoreduktaza ne vrše degradaciju AHL molekula, već ih modifikuju u neaktivn oblik oksidacijom ili redukcijom acilnog lanca. Sinteza oksidoreduktaza smatra se protektivnim mehanizmom kod pojedinih bakterijskih vrsta. Ustanovljeno je da BpiB09 oksidoreduktaza inaktivira 3-okso-C12-HSL, smanjujući produkciju pio-cijanina, pokretljivost i formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 [33].

PRIMENA MOLEKULA UTIŠIVAČA MEĐUČELIJSKE KOMUNIKACIJE

Strategija utišavanja međučelijske komunikacije bakterija dala je značajne rezultate u biotehnologiji uključujući borbu protiv biljnih patogena, u akvakulturi, u bioreaktorima korišćenim za prečišćavanje otpadnih voda kao i u medicinske svrhe. Kada je u pitanju primena u medicini, QQ molekuli su našli važno mesto prilikom izrade novih generacija medicinskih uređaja poput ortopedskih implantata, kontaktnih sočiva, zavoja i katetera [22].

Mada se mogu primenjivati pojedinačno, QQ molekuli su najbolje efekte dali kao deo kombinovane terapije u lečenju infekcija izazvanih kliničkim patogenima. Primena antivirulentnih agenasa u kombinaciji sa antibioticima pokazala se kao trenutno najefikasniji pristup u borbi protiv bolesti izazvanih bakterijama. Brojne studije povrdile su značaj sinergističkog delovanja antibiotika i antivirulentnih agenasa u smanjenju primenjene doze antibiotika i poboljšanja njihove efikasnosti [34,35].

U poslednje dve decenije istraživanja iz oblasti antivirulentne terapije dala su veoma značajne rezultate. Identifikovane su brojne nove mete antivirulentne terapije zasnovane na prirodnem fenomenu utišavanja QS sistema i uspešno su uspostavljene strategije pronalaska novih terapeutika. Imajući u vidu da je *P. aeruginosa* jedan je od najznačajnijih oportunističkih humanih patogena, čiji je tretman vrlo otežan usled ograničenih terapeutskih mogućnosti, aktuelna istraživanja usmerena su ka alternativnim terapeutskim pristupima i primeni bakteriofaga, vakcina i molekula koji za cilj imaju utišavanje međučelijske komunikacije.

ULOGA BAKTERIJSKIH SOCIJALNIH INTERAKCIJA U USPOSTAVLJANJU NJIHOVOG PATOGENOG POTENCIJALA

Socijalne interakcije između različitih mikroorganizama unutar polimikrobnih zajednica su od izuzetne važnosti za oblikovanje patogenosti bakterija. Ove interakcije mogu ostvariti uticaj na patogenezu, otpornost na antibiotike i napredovanje bolesti. Međutim, često nije jednostavno utvrditi da li je klinička slika uzrok ili posledica ovih interakcija. Takođe, uloga nekih mikroorganizama u polimikrobnoj zajednici je mnogo suptilnija, što znači da ne moraju biti prepoznati kao patogeni *per se*, već patogeni potencijal ostvaruju kroz interakciju sa drugim mikroorganizmima. *P. aeruginosa* koristi kooperativnu i kompetitivnu strategiju u svrhu osvajanja različitih ekoloških niša. Itekako je poznato da sekundarni metaboliti *P. aeruginosa* ostvaruju uticaj na susedne mikroorganizme. Kao odgovor na prisustvo *P. aeruginosa*, prostorno bliski mikroorganizmi primenjuju raznolike odbrambene mehanizme. Jedna od tih odbrambenih strategija je utišavanje međučelijske komunikacije ovog patogena. Do danas su opisani brojni utišivači QS sistema. Ono što je, međutim, ostalo manje poznato jeste, kako mikroorganizmi koji tokom infekcije domaćina kolonizuju ista tkiva i organe kao i *P. aeruginosa*, kompetiraju za ograničene resurse posredstvom utišavanja njegove međučelijske komunikacije. Stoga je ideja ovog istraživanja bila potraga za novim, potencijalno efikasnim QQ molekulima poreklom od mikroorganizmima koji tokom infekcije domaćina dele istu ekološku nišu sa *P. aeruginosa*. Iako je ova bakterijska vrsta jedan od najkorišćenijih model sistema prilikom ispitivanja antivirulentnog potencijala QSI i QQ molekula, većina studija svoja istraživanja bazirala je na upotrebi laboratorijskih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i PA14 kao model sistema [31,32], dok su podaci o utišavanju QS sistema kliničkih izolata *P. aeruginosa* veoma oskudni. S tim u vezi, jedan od zadataka ovog istraživanja bio da se antivirulentni potencijal novih QSI/QQ molekula ispita na kliničkom izolatu *P. aeruginosa* MMA83, soju od izuzetnog kliničkog značaja, čiji je višestruko rezistentni fenotip u korelaciji sa teškim ishodom infekcije [36].

U okviru naših istraživanja sprovedenih u poslednjih pet godina [37,38] analizirano je prisustvo QQ fenotipa poreklom iz Gram-negativnih kliničkih izolata uzorkovanih na teritoriji grada Beograda. Analizirano je ukupno 633 kliničkih izolata, pripadnika 11 rodova. Prilikom selekcije, od 19 sojeva sa QQ fenotipom, izdvojila su se dva izolata *Delftia tsuruhatensis* 11304 i *Burkholderia cepacia* BCC4135 koja su na osnovu inicijalne analize pokazala najbolje rezultate. Pored toga, još jedan od kriterijuma za odabir ovih izolata za detaljnju karakterizaciju bila je i različita priroda QQ molekula koje producuju ovi sojevi.

DELFIA TSURUHATENSIS 11304 JE IZVOR QSI MOLEKULA

Iako je *Delftia tsuruhatensis* prvo bitno okarakterisana kao značajan bioremedijator [39], najnovija istraživanja ukazuju na značaj ove bakterijske vrste kao patogena odgovornog za povećano izazivanje infekcija kod ljudi, pre-vashodno u unutarbolničkim uslovima [40]. Budući da su literaturni podaci o *D. tsuruhatensis* veoma oskudni, nemoguće je sa sigurnošću govoriti o poreklu *D. tsuruhatensis* 11304 soja analiziranom u našoj studiji [37], bilo da je on porekлом iz bolničke sredine, ili je u pitanju sredinski izolat koji je u bolničku sredinu dospeo posredstvom pacijenta. Ono što ukazuje na mogući virulentni fenotip i sam klinički značaj ovog izolata jeste prisustvo genetičkih determinanti za sintezu faktora virulencije i rezistencije na antibiotike, što bi moglo doprineti sveukupnom patogenom potencijalu ovog soja i pružiti uvid u genetičku osnovu patogenosti *D. tsuruhatensis* uopšte.

Inicijalnom analizom ustanovljeno je da klinički izolat *D. tsuruhatensis* 11304 produkuje utišivače QS sistema ne-proteinske prirode, stoga je ideja ovog istraživanja bila identifikovati molekul(e) koji leže u osnovi njegove QSI aktivnosti. Ukupni etil-acetatni ekstrakt ostvario je značajno utišavanje QS sistema višestruko rezistentnog kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83, redukujući njegov virulentni fenotip kroz inhibiciju formiranja biofilma kao i smanjenje produkcije ekstracelularnih faktora virulencije.

Sposobnost *P. aeruginosa* da formira biofilm omogućava ovom patogenu uspešnu kolonizaciju, usled značajne tolerancije na antibiotike i otpornosti na imunski sistem domaćina. Stoga formiranje biofilma na različitim površinama služi kao značajan izvor infekcije. Smatra se da je oko 80% bakterijskih infekcija kod ljudi nastalo kao posledica sposobnosti bakterija da formiraju biofilme [18]. Stoga su predložena tri nebaktericidna pristupa u borbi protiv patogenih bakterija koje imaju sposobnost formiranja biofilma: (1) sprečavanje vezivanja bakterija za površinu, (2) uticaj na arhitekturu biofilma radi poboljšanja prodora antimikrobnih lekova, i (3) ometanje procesa sazrevanja biofilma i/ili indukcije njegove degradacije i rasejavanja [18]. Formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83 u značajnoj meri je smanjeno tretmanom 11304 QSI ekstrakta, a da pritom sam ekstrakt nije uticao na rast bakterijskih ćelija. Redukcija sposobnosti formiranja biofilma posredstvom QSI ekstrakta ostvarena je na dozno-zavisan način, i u skladu je sa dosadašnjim literaturnim podacima vezanim za primenu drugih QSI ekstrakata [41]. Dekompozicija biofilma ima veliki značaj sa terapeutskog aspekta jer podrazumeva intervencije koje se primenjuju nakon što je biofilm formiran. Ova strategija uključuje nekoliko pristupa čije su mete komponente matriksa biofilma (EPS, eDNK, lipidi, proteini i amiloidni agregati) i molekuli koji učestvuju u disperziji biofilma. Međutim, narušavanje strukture već formiranog biofilma nije postignuto primenom 11304 QSI ekstrakta, što bi moglo ukazivati na nepropusljivost matriksa biofilma za aktivne komponente ekstrakta kao i na drugačiji mehanizam delovanja *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta na QS sistem *P. aeruginosa* MMA83.

Patogeni profil *P. aeruginosa* takođe je u korelaciji sa njegovom sposobnošću produkcije ekstracelularnih faktora virulencije elastaza, piocijanina i ramnolipida koje ovom patogenu služe za invaziju tkiva domaćina i potpomažu formiranje biofilma kao i njegovo rasejavanje. Producija faktora virulencije je metabolički veoma zahtevan proces pod kontrolom *las*, *rhl* i *pqs* QS sistema, stoga je razumevanje regulatornih mehanizama zahvaljujući kojima *P. aeruginosa* upravlja ekspresijom gena odgovornih za sintezu faktora virulencije ključno za razvoj alternativnih terapeutskih opcija sa ciljem kontrole i sprečavanja infekcija. Do sada je literaturno potvrđeno da analozi C4-HSL porekлом iz *Rhizobium* sp. NAO1 smanjuju produkciju elastaza i siderofora, dok ekstrakt rizosferne biljke *S. maltophilia* sprečava pokretljivost i produkciju piocijanina kod *P. aeruginosa* [41,42]. Ustanovljen je dozno-zavisan efekat 11304 QSI ekstrakta na pro-duk-ciju elastaza, piocijanina i ramnolipida *P. aeruginosa* MMA83. Antivirulentni efekat 11304 ekstrakta potvrđen je i kroz značajno smanjenje ekspresije autoinducer sintaze i transkripcionog aktivatora analiziranih QS sistema- *las*, *rhl* i *pqs*. Budući da ovaj ekstrakt dovodi do promena na nivou transkripcije, jedan od prepostavljenih mehanizama delovanja bioaktivnih molekula iz ekstrakta je posredstvom njihove antagonističke aktivnosti. To znači da bioaktivni molekuli sprečavaju vezivanje QS signala za receptor i/ili menjaju konformaciju kompleksa signal-receptor, blokirajući njegovu dimerizaciju i interakciju sa odgovarajućim DNK regionom ili RNK polimerazom.

Uzveši u obzir da klinički izolati *P. aeruginosa* veoma često poseduju višestruko rezistentni ili čak ekstremno rezistentni fenotip, novi pristup u kliničkoj praksi prilikom lečenja infekcija izazvanih ovakvim sojevima bi mogao biti kombinovana upotreba antibiotika i druge neantibiotičke aktivne komponente. Imajući takođe u vidu da su antibiotici gotovo u potpunosti neefikasni prilikom tretiranja bakterija u biofilmu, novija istraživanja usmerena su ka primeni QQ agenasa koji bi onemogućili formiranje ili narušili strukturu formiranog biofilma i na taj način izložili bakterije direktnom delovanju antibiotika. Stoga se smatra da sinergističko delovanje antibiotika i antivirulentnih agenasa ima za cilj smanjenje primenjene doze antibiotika i povećanje njegove efikasnosti [9]. Utvrđeno je da primena QSI inhibitora furanona i galijuma u kombinaciji sa klinički relevantnim antibioticima kolistinom, meropenemom, ciproflokacinom i tobramicinom može dovesti do inhibicije rasta kod većine klonova *P. aeruginosa* rezistentnih na antibiotike [43]. Značaj primene QS inhibitora u smanjenju rezistencije *P. aeruginosa* PAO1 kroz sinergistički efekat sa klinički relevantnim antibioticima dokumentovan je u još nekoliko slučajeva [44,45]. Osetljivost višestruko rezistentnog kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 na meropenem i gentamicin znatno je povećana kroz sinergističko delovanje 11304 QSI ekstrakta

sa primjenjenim antibioticima, ukazujući da bi aktivne komponente iz ekstakta mogle imati primenu u kombinovanoj terapiji prilikom tretmana infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa*.

U okviru ove studije ustanovljeno je da sastav 11304 QSI ekstrakta čine *N*-acil-homoserin laktoni sa dužinom bočnog acilnog lanca od 12 do 18 C atoma, pri čemu je najdominantnije zastupljen *N*-oktadekanoil-homoserin lakton (C18-HSL). Po prvi put je, takođe, identifikovan dihidroksi-C18-HSL prirodnog porekla. Činjenica da komercijalni C18-HSL redukuje ekspresiju *lasI/QS* gena i produkciju piocijanina, ukazuje na njegov uticaj na virulentni potencijal *P. aeruginosa* MMA83. Ovim otkrićem potvrđena su prethodna istraživanja koja pokazuju da kod određenih bakterijskih vrsta AHL dugog lanca interferiraju sa QS sistemom posredovanim AHLom kratkog lanca. Poznato je da se AHL dugog lanca (C12-HSL i C14-HSL) vezuju sa istim afinitetom za receptor kao i C6-HSL, ali imaju antagonističko dejstvo, zato što indukuju konformacionu modifikaciju receptora, i na taj način sprečavaju njegovu interakciju sa RNK polimerazom onemogućavajući aktivaciju transkripcije [46]. Imajući ovo u vidu, postoji osnova za pretpostavku da AHL dugog lanca poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304 QSI ekstrakta mogu biti odgovorni za interferenciju sa QS sistemom *P. aeruginosa* MMA83 i ujedno za smanjenje njegovog virulentnog potencijala. Shodno tome, moguće je napraviti analogiju sa *C. violaceum* CV026 QS sistemom, s obzirom da *P. aeruginosa* ne produkuje AHL čiji su bočni lanci duži od C12 atoma [47]. Takođe, postoji nalazi koji tvrde da je dužina bočnog acilnog lanca jedna od ključnih odrednica u ostvarivanju antagonističkog delovanja sintetičkih AHL prilikom korišćenja *Agrobacterium tumefaciens* kao model sistema [48]. Međutim, ostvareni antivirulentni efekat nije moguće pripisati samo C18-HSL, već orkestriranoj akivnosti nekoliko aktivnih molekula iz 11304 QSI ekstrakta.

BURKHOLDERIA CEPACIA BCC4135 OSTVARUJE ANTIVIRULENTNU AKTIVNOST POSREDSTVOM QQ LAKTONAZA

Za opstanak *B. cepacia* u bolničkoj sredini naročito je zaslužna izuzetna otpornost predstavnika ove bakterijske vrste na klinički značajne antibiotike i dezifikijense, kao i njihova visokoefikasna transmisija između pacijenata, naročito kod obolelih od cistične fibroze. Klinički ishod kolonizacije i infekcije izazvane *Burkholderia* vrstama kod pacijenata sa cističnom fibrozom značajno varira i može se manifestovati kroz tranzitornu kolonizaciju, dugoročnu hroničnu infekciju ili brzo pogoršanje kliničke slike, što može voditi ka pojavi ozloglašenog "cepacia sindroma" [49]. Soj *B. cepacia* BCC4135 koji je bio predmet proučavanja naše studije [38] izolovan je iz pacijenta obolelog od cistične fibroze. Na osnovu *in silico* analize genomske sekvene BCC4135 ustanovljeno je da ovaj klinički izolat poseduje značajan broj gena koji pripadaju rezistomu i virulomu, što ukazuje na moguća svojstva adaptacije ovog soja na bolničku sredinu i domaćina [50].

Odnos kliničkih izolata *B. cepacia* sa drugim patogenim vrstama, naročito *P. aeruginosa* je vrlo kompleksan. S obzirom da su ova dva patogena najznačajniji uzročnici infekcija kod obolelih od cistične fibroze, primećeno je da kategoriraju u plućima izazivajući teške respiratorne bolesti [51]. Utvrđeno je, takođe, da pripadnici *Burkholderia* vrsta posredstvom QS sistema mogu ostvariti komunikaciju sa *P. aeruginosa* [52]. Uvezši u obzir da *P. aeruginosa* dominira u polimikrobnoj zajednici kod starijih osoba obolelih od cistične fibroze, jasno je da ovaj patogen koristi raznolike mehanizme za kolonizaciju tkiva i opstanak u disajnim putevima domaćina. Stoga, susedni mikroorganizmi reaguju aktivirajući svoje odbrambene sisteme. *B. cepacia*, drugi značajan kolonizator pluća kod obolelih od cistične fibroze koristi kooperativne i kompetitivne mehanizme kako bi se izborila za opstanak u zajednici sa *P. aeruginosa*. Poznato je da članovi *Burkholderia* vrsta formiraju biofilm sa *P. aeruginosa* tako što uspostavljaju kompleksnu mrežu interakcija koja čak dovodi do razmene genetičkog materijala [51]. Međutim, u literaturi su češće opisani primeri kompetitivnog delovanja ova dva patogena. Dosadašnja istraživanja ukazuju da populacija *Burkholderia* vrsta učestalo vrši invaziju populacije *P. aeruginosa* [53] i obrnuto [54]. Uvezši za osnovu ove prirodne fenomene, sekundarni metaboliti koje produkuju prirodni kompetitor i skorišćeni su za razvoj novih terapeutika kako bi se ciljali specifični uzročnici infekcija. U skladu sa time, polazna pretpostavka bila je da tokom infekcije *B. cepacia* opstaje u zajedničkoj niši sa *P. aeruginosa* tako što utišava QS sistem svog protivnika. U okviru naše studije identifikovane su dve QQ laktonaze (YtnP i Y2-aiiA) poreklom iz soja BCC4135 sa obećavajućim antivirulentnim potencijalom. Kao i većina AHL laktonaza, YtnP i Y2-aiiA pripadaju superfamiliji metalo-β-laktamaza i poseduju visoko konzervisani HXHxDH cink-vezujući motiv u aktivnom mestu. YtnP i Y2-aiiA dele oko 40% identičnosti aminokiselinske sekvene sa filogenetski najbližim AHL laktonazama, što potvrđuje veliki diverzitet ove grupe enzima [21]. Na osnovu predikcione analize utvrđeno je da bi Y2-aiiA mogla biti ekstracelularni enzim usled prisustva signalne sekvene, dok je za YtnP pretpostavljena unutarćelijska lokalizacija.

Termostabilnost se smatra jednim od najpoželjnijih biotehnoloških svojstava enzima koje ih čini pogodnim za proizvodnju u industriji i primenu u biomedicini. Ovo svojstvo daje enzimima mnoge prednosti kao što su brže i efikasnije prečišćavanje, duža stabilnost i pretpostavljena bolja aktivnost [30]. Temperaturni optimum YtnP i Y2-aiiA rekombinantnih enzima iznosi 40°C i je vrlo blizak fiziološkoj temperaturi (37°C) što nije iznenađujuće imajući u vidu

da su BCC4135 laktone poreklom iz kliničkog izolata, čija je optimalna temperatura kultivacije 37°C. U pogledu otpornosti na više temperature, obe QQ enzima pokazala su umerenu termostabilnost, koja je ipak značajna, imajući u vidu da je većina do sada identifikovanih termostabilnih AHL laktone izolovana iz termofilnih bakterijskih vrsta [55].

Ispitivanjem enzimskog potencijala YtnP i Y2-aiiA laktone utvrđeno je da, u pogledu dužine bočnog acilnog lanca AHL, obe laktone pokazuju širok spektar supstratne specifičnosti za AHL molekule. YtnP enzim pokazao je veću specifičnost za AHL kratkih i srednje dugih bočnih acilnih lanaca, dok je Y2-aiiA enzim pokazao značajnu efikasnost u degradaciji AHL i kratkih i dugih acilnih lanaca, sa većom specifičnošću za AHL dugog lanca. Takođe, uočeno je da jedino Y2-aiiA laktone vrši degradaciju C14-HSL. Time bi se mogla potvrditi naša pretpostavka da je razlika u supstratnoj specifičnosti ovih AHL laktone posledica njihove lokalizacije u ćeliji kao i funkcije. Poznato je da *B. cepacia* sintetiše AHL [56], stoga bi intracelularna YtnP laktone mogla biti uključena u kontrolu sopstvenih AHL signala, dok bi ekstracelularna Y2-aiiA laktone usled šire supstratne specifičnosti mogla biti uključena u odgovor na QS signale drugih bakterija iz okruženja. Na ovaj način *B. cepacia* bi mogla autoregulisati QS signale unutar svoje ćelije i istovremeno interferirati sa QS sistemima drugih mikroorganizama sa kojima deli istu ekološku nišu. Ova tvrdnja bi takođe mogla biti potkrepljena činjenicom da transkripcija *ytnP* gena kroz faze rasta bakterijske kulture u potpunosti prati transkripciju QS gena (*anol* i *anoR*) [38]. Zatim, *B. cepacia* ne produkuje AHL dugog acilnog lanca [57], stoga nema potrebu za laktonezama širokog spektra aktivnosti ukoliko su one uključene samo u regulaciju sopstvene QS mreže, te bi se razlika u supstratnoj specifičnosti ova dva enzima mogla smatrati posledicom njihove biološke uloge. Uočena zavisnost nivoa ekspresije gena i promotorske aktivnosti gena koji kodiraju laktone od faza rasta bakterijske kulture može ukazivati na različite metaboličke aktivnosti i regulaciju ovih laktone u QS/QQ mreži *B. cepacia* BCC4135 [58].

Poznato je da formiranje biofilma i produkcija drugih faktora virulencije mogu biti sprečeni ili makar oslabljeni kao posledica enzimske degradacije QS signala [21]. Efikasnost QQ laktone u degradaciji AHL molekula kroz smanjenje virulentnog potencijala analiziranih model sistema dokumentovana je u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama [32,55]. YtnP i Y2-aiiA ostvarile su značajno delovanje u smanjenju virulentnog fenotipa kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83, kroz inhibiciju formiranja biofilma i produkcije ekstracelularnih faktora virulencije. Y2-aiiA laktone ostvarila je znatniji efekat u sprečavanju formiranja biofilma, što je u korelaciji sa njenom većom supstratnom specifičnošću za AHL odgovorne za inicijalnu fazu formiranja biofilma *P. aeruginosa* [28]. Oba QQ enzima utiču na smanjenje virulentnog fenotipa kroz inhibiciju produkcije ekstracelularnih faktora virulencije elastaza, piocianina i ramnolipida *P. aeruginosa* i samim tim bi mogli sprečiti ili makar ublažiti bakterijsku infekciju. Antivirulentni efekat YtnP i Y2-aiiA laktone potvrđen je i na transkripcionom nivou. Pogođena su dva glavna QS sistema vrste *P. aeruginosa*- *las* i *rhl*, koja kontrolisu produkciju faktora virulencije i formiranje biofilma. Utisavanje QS sistema bilo je značajnije kada su YtnP i Y2-aiiA enzimi primjenjeni zajedno u odnosu na primenu svakog od enzima pojedinačno. Pored toga, BCC4135 rekombinantne laktone vrše utisavanje i *pqs* QS mreže *P. aeruginosa*, što je po prvi put otkriveno među laktonezama, pored opisanih QQ enzima acilaze i dioksigenaze [59]. Stoga se može zaključiti da obe laktone imaju značajan terapeutski potencijal ostvaren kroz smanjenje patogenosti *P. aeruginosa*.

Iako je do danas je identifikovano mnoštvo jedinjenja koja imaju sposobnost interferencije sa QS sistemom *P. aeruginosa*, većina okarakterisanih antivirulentnih agenasa je citotoksična ili pokazuje nepovoljna farmakološka svojstva, što ograničava njihovu primenu u kliničkoj praksi [60]. Među okarakteriziranim QQ enzimima, PvdQ acilaza poreklom iz *P. aeruginosa* nije ostvarila citotoksičan efekat na ćelije plućnog epitela, te predstavlja dobrog kandidata za razvoj antivirulentnih lekova [61]. Stoga je od velike važnosti bilo ispitati da li *B. cepacia* BCC4135 rekombinantne laktone poseduju najznačajnije svojstvo u medicinskoj primeni, odnosno odsustvo citotoksičnosti na ćelije čoveka. S obzirom da smo u okviru našeg istraživanja utvrdili da YtnP i Y2-aiiA laktone ne ostvaruju citotoksični efekat na ćelijsku liniju HaCaT humanih keratinocita, one se kandiduju za potencijalnu primenu u kliničkoj praksi.

Bitno je naglasiti da *B. cepacia* BCC4135 takođe poseduje QS sistem. Sposobnost ove bakterijske vrste da preživi u veoma heterogenim uslovima životne sredine može se u znatnoj meri pripisati međućelijskoj komunikaciji [49]. QS sistem posredstvom AHL signalnih molekula kod ovog patogena igra centralnu ulogu u regulaciji virulencije i drugih fenotipskih svojstava kao što su kolonizacija i invazija niše. QS sistem kod *Burkholderia* vrsta kontroliše veći broj funkcija uključujući pokretljivost, formiranje biofilma i produkciju faktora virulencije proteaza, toksina i antifungalnih jedinjenja. *B. cepacia* BCC4135 koristi Cepl/R (Anol/R) globalni regulatorni QS sistem koji je visoko konzervisan među *Burkholderia* vrstama [62]. Budući da je nivo transkripcije BCC4135 QS gena u skladu sa nivoom ekspresije gena koji kodira intracelularnu laktonazu YtnP i njenom promotorskom aktivnošću, potvrđuje postulaciju da ovaj enzim ima važnu ulogu u autoregulaciji QS sistema ovog soja. Imajući u vidu da je sposobnost čišćenja i recikliranja sopstvenih QS signalnih molekula kod QS-emitujućih organizama već opisana kod brojnih Gram-negativnih bakterijskih vrsta [58], ovaj fenomen bi mogao biti opšte prihvaćeni mehanizam za samokontrolu QS sistema. Iako fiziološka uloga YtnP laktone kod *B. cepacia* BCC4135 nije u potpunosti definisana, buduća istraživanja je neophodno usmeriti ka proučavanju uloge QQ aktivnosti u kontroli QS regulatorne kaskade ovog soja.

ZAKLJUČAK

Rezultati naših istraživanja doprineli su sagledavanju kompleksnih odnosa unutar polimikrobine zajednice patogenih bakterija kroz fenomen utišavanja međučelijske komunikacije i potencijalnu iskoristivost ove strategije u terapeutske svrhe. Ustanovljeno je da mikroorganizmi koji dele istu ekološku nišu usklađuju svoje ponašanje kao odgovor na intraspecijsku komunikaciju svojih kompetitora posredstvom ometanja njihove međučelijske komunikacije. Imajući u vidu da je QQ relativno redak fenomen u prirodi, te činjenicu da je u okviru ovih istraživanja konstatovano prisutvo QQ fenotipa kod 19 od 633 testiranih izolata, ukazuje na uspešnost pristupa baziranog na bakterijama kompetitorima kao značajnom izvoru QQ molekula. Sumiranjem prikazanih podataka, može se zaključiti da klinički izolati predstavljaju veoma značajan izvor molekula utišivača međučelijske komunikacije bakterija.

Pored toga, značaj dobijenih rezultata naših istraživanja ogleda se u činjenici da je utišavanje QS sistema vrste *P. aeruginosa* postignuto AHL signalnim molekulima dugog lanca poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304, te bi se mogla napraviti analogija sa utišavanjem QS sistema *C. violaceum* CV026. Takođe, po prvi put identifikovana je nova AHL vrsta dihidroksi-C18-HSL iz uzorka biološkog porekla.

Drugi važan segment naših istraživanja odnosi se na utvrđivanje potencijalno nove biološke uloge YtnP i Y2-aiiA laktonaza poreklom iz *B. cepacia* BCC4135 bazirane na različitoj supstratnoj specifičnosti ovih enzima, činjenici da je transkripcija gena koji kodiraju ove QQ enzime precizno regulisana kroz fazu rasta bakterijske kulture, kao i razlikama u AHL molekulima koje produkuju vrste *B. cepacia* i *P. aeruginosa*. Stoga je moguće govoriti o postojanju autoregulacije QS/QQ mreže soja BCC4135 kroz različitu ekspresiju i aktivnost YtnP i/ili Y2-aiiA laktonaza.

Zatim, detaljna karakterizacija biološke aktivnosti molekula poreklom iz *D. tsuruhatensis* 11304 i *B. cepacia* BCC4135 sojeva na model sistem *P. aeruginosa* MMA83 kliničkog izolata ukazuje na mogući terapeutski potencijal QSI i QQ molekula, i doprinosi ideji da ovi molekuli mogu biti potencijalni kandidati u antivirulentnoj terapiji.

ZAHVALNICA

Ovaj rad finansiran je od strane Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (451-03-9/2021-14/200042). Jeden deo ovog rada realizovan je na Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II, Napulj, Italija pod rukovodstvom prof dr Antonio Molinaro i dr Flaviana Di Lorenzo, kojima se ovom prilikom zahvaljujem. Hvala dr sci med Zorici Vasiljević sa Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" koja je obezbedila kliničke izolate korišćene u ovom radu, kao i dr Milanu Kojiću i drugim saradnicima Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo za izuzetnu pomoć tokom izrade eksperimenta.

LITERATURA

1. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017;7(2).
2. Crone S, Vives-Florez M, Kvich L, Saunders, AM, Malone M, et al. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 2019;128(3):220–231.
3. Russotto V, Cortegiani A, Rainieri SM, Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care* 2015;3(54).
4. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 2020;33(3):e00181-19.
5. Bassetti M, Vena A, Croatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context* 2018;7:212527.
6. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005;21:319–346.
7. Thiel V, Kunze B, Verma P, Wagner-Döbler I, Schulz S. New structural variants of homoserine lactones in bacteria. *Chembiochem* 2009;10(11):1861–1868.
8. Guo J, Yoshida K, Ikegame M, Okamura, H. Quorum sensing molecule N-3oxododecanoyl-L-homoserine lactone: An all-round in mammalian cell modification. *Journal of Oral Biosciences* 2020;62(1):16–29.
9. Jiang Q, Chen J, Yang C, Yin Y, Yao K. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International* 2019;15.
10. Castillo-Juárez I, Maeda T, Mandujano-Tinoco EA, Tomás M, Pérez-Eretza B, et al. Role of quorum sensing in bacterial infections. *World journal of clinical cases* 2015;3(7):575–598.
11. Pessi G, Haas D. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 2000;182(24):6940–6949.
12. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell* 2015;6(1):26–41.

13. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2017;27(6):1053-1064.
14. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005;171(11):1209-1223.
15. Hunter RC, Klepac-Ceraj V, Lorenzi MM, Grotzinger H, Martin TR, et al. Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2012;47(6):738-745.
16. Jensen PØ, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2010;59(3):292-305.
17. De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 2009;11(2):279-288.
18. Sharma D, Misra L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial resistance and infection control* 2019;8:76.
19. Fernandes P, Martens E. Antibiotics in late clinical development. *Biochemical Pharmacology* 2017;133:152-163.
20. Heras B, Scanlon MJ, Martin JL. Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials. *British journal of clinical pharmacology* 2015;79(2):208-215.
21. Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews* 2016;40(1):86-116.
22. Rémy B, Mion S, Plener L, Elias M, Chabrière E, Daudé D. Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Frontiers in pharmacology* 2018;9:203.
23. Storz MP, Maurer CK, Zimmer C, Wagner N, Brengel, C, de Jong, JC, et al. Validation of PqsD as an anti-biofilm target in *Pseudomonas aeruginosa* by development of small-molecule inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* 2012;134(39):16143-16146.
24. Park J, Jagasia R, Kaufmann GF, Mathison JC, Ruiz DL, et al. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chemistry & biology* 2007;14(10):1119-1127.
25. Hornby JM, Jensen EC, Lisick AD, Tasto JJ, Jahnke B, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology* 2001;67(7):2982-2992.
26. Fetzner S. Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology* 2015;201:2-14.
27. Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology* 2003;69(10):5941-5949.
28. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and molecular biology reviews* 2013;77(1):73-111.
29. Tang K, Su Y, Brackman G, Cui F, Zhang Y, et al. MomL, a novel marine-derived N-acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*. *Applied and environmental microbiology* 2015;81(2):774-782.
30. Zhang JW, Xuan CG, Lu CH, Guo S, Yu JF, et al. AidB, a novel thermostable N-acylhomoserine lactonase from the bacterium *Bosea* sp. *Applied and environmental microbiology* 2019;85(24):e02065-19.
31. Fan X, Liang M, Wang L, Chen R, Li H, Liu X. Aii810, a Novel Cold-Adapted N-Acylhomoserine Lactonase Discovered in a Metagenome, Can Strongly Attenuate *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors and Biofilm Formation. *Frontiers in microbiology* 2017;8:1950.
32. Dong W, Zhu J, Guo X, Kong D, Zhang Q, et al. Characterization of AiiK, an AHL lactonase, from Kurthia huakui LAM0618T and its application in quorum quenching on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Scientific Reports* 2018;8:6013.
33. Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International journal of molecular sciences* 2013;14(9):17477-17500.
34. Furiga A, Lajoie B, El-Hage S, Baziard G, Roques C. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Antibiotics by Combining the Drugs with a New QuorumSensing Inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015;60(3):1676-1686.
35. Kim C, Hesek D, Lee M, Mobashery S. Potentiation of the activity of β-lactam antibiotics by farnesol and its derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2018;28(4):642645.
36. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, et al. Emergence of NDM-1 metallo-β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(8):3929-3931.
37. Malešević M, Di Lorenzo F, Filipić B, Stanislavljević N, Novović K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones. *Scientific Reports* 2019;9:16465.
38. Malešević M, Stanislavljević N, Novović K, Polović N, Vasiljević Z, et al. *Burkholderia cepacia* YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit virulence of *Pseudomonas aeruginosa* via quorum quenching activity. *Microbial Pathogenesis* 2020;149:104561.
39. Juárez-Jiménez B, Manzanera M, Rodelas B, Martínez-Toledo MV, Gonzalez-López J, et al. Metabolic characterization of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. *Biodegradation*, 2010;21(3):475-489.
40. Ranc A, Dubourg G, Fournier PE, Raoult D, Fenollar F. *Delftia tsuruhatensis*, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen. *Emerging infectious diseases* 2018;24(3):594-596.
41. Singh VK, Kavita K, Prabhakaran R, Jha B. Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and antibiofilm activities. *Biofouling* 2013;29(7):855-867.
42. Chang H, Zhou J, Zhu X, Yu S, Chen L, et al. Strain identification and quorum sensing inhibition characterization of marine-derived Rhizobium sp. NAO1. *Royal Society open science* 2017;4(3):170025.
43. Rezzoagli C, Archetti M, Mignot I, Baumgartner M, Kümmelri R. Combining antibiotics with antivirulence compounds can have synergistic effects and reverse selection for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv* 2019;861799.
44. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(6):2655-2661.
45. Yang YX, Xu ZH, Zhang YQ, Tian J, Weng LX, Wang LH. A new quorum sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiolog*, 2012;50(6):987-993.
46. Swem LR, Swem DL, O'Loughlin CT, Gatmaitan R, Zhao B, et al. A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Molecular cell* 2009;35(2):143-153.
47. Soukarieh F, Williams P, Stocks MJ, Cámará M. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry* 2018;61(23):10385-10402.
48. Zhu J, Beabe JW, Moré MI, Fuqua C, Eberhard A, Winans SC. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* 1998;180(20):5398-5405.

49. Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annual Review of Phytopathology 2001;39:225-258.
50. Tedesco P, Visone M, Parrilli E, Tutino ML, Perrin E, et al. Investigating the Role of the Host Multidrug Resistance Associated Protein Transporter Family in *Burkholderia cepacia* Complex Pathogenicity Using a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. PloS one 2015;10(11):e0142883
51. Eberl L, Tümler B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. International Journal of Medical Microbiology 2004;294(2-3):123-131.
52. Leitão JH, Sousa SA, Ferreira AS, Ramos CG, Silva IN, Moreira LM. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. Applied Microbiology and Biotechnology 2010;87(1):31-40.
53. Schwab U, Abdullah LH, Perlmutt OS, Albert D, Davis CW, et al. Localization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis lungs and interactions with *Pseudomonas aeruginosa* in hypoxic mucus. Infection and immunity 2014;82(11):4729-4745.
54. Costello A, Reen FJ, O'Gara F, Callaghan M, McClean S. Inhibition of colonizing cystic fibrosis-associated pathogens by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia multivorans*. Microbiology 2014;160(7):1474-1487.
55. Bergonzi C, Schwab M, Naik T, Daudé D, Chabrière E, Elias M. Structural and Biochemical Characterization of AaL, a Quorum Quenching Lactonase with Unusual Kinetic Properties. Scientific reports 2018;8(1):11262.
56. Aguilar C, Friscina A, Devescovi G, Kojic M, Venturi V. Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. Journal of bacteriology 2003;185(21):64566462.
57. Sokol PA, Sajjan U, Visser MB, Gingues S, Forstner J, Kooi C. The CepLR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. Microbiology 2003;149(12):3649-3658.
58. Mayer C, Muras A, Romero M, López M, Tomás M, Otero A. Multiple Quorum Quenching Enzymes Are Active in the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC17978. Frontiers in cellular and infection microbiology 2018;8:310.
59. Pustenny C, Albers A, Buldt-Karentzopoulos K, Parschat K, Chhabra SR, et al. Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Chemistry & Biology 2009;16(12):1259-1267.
60. D'Angelo F, Baldelli V, Halliday N, Pantalone P, Polticelli F, et al. Identification of FDA-Approved drugs as antivirulence agents targeting the pqs quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2018;62:e01296-18.
61. Utari PD, Setirokromo R, Melgert BN, Quax J. PvdQ Quorum Quenching Acylase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in a Mouse Model of Pulmonary Infection. Frontiers in cellular and infection microbiology 2018;8:119.
62. Venturi V, Friscina A, Bertani I, Devescovi G, Aguilar C. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. Research in Microbiology 2004;155(4):238-244.

MOLEKULARNA BIOLOGIJA BILJAKA MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS



Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra

Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić

Laboratorija za molekularnu biologiju biljaka, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,

Univerzitet u Beogradu

Kontakt: dragana.bosnic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt: Bakar (Cu) je esencijalan mikroelement za biljke ali ukoliko je prisutan u višku ima fitotoksično dejstvo izazivajući oksidativni stres. Silicijum (Si) ne spada u esencijalne ali je jedini element koji ispoljava protektivan efekat na biljke u uslovima stresa. Primena silicijumove kiseline kod biljaka tretiranih toksičnim koncentracijama bakra ublažava štetna dejstva i povećava toleranciju na prisustvo bakra u višku. Mehanizmi delovanja silicijuma kod biljaka krastavca su detaljno proučeni i obuhvataju: smanjenje akumulacije Cu u biljkama preko snižene ekspresije gena odgovornih za njegovo usvajanje, imobilizaciju Cu u ćeljskim zidovima, povećanje sinteze Cu-liganada: organskih kiselina (citrat, malat i aconit) i aminokiselina (nikotianamin i histidin) koji smanjuju koncentraciju slobodnih, reaktivnih jona Cu unutar ćelije. Primena Si je uslovila smanjenje ekspresije mikro RNK (miR398 i miR408) koje predstavljaju glavne regulatore ekspresije gena i proteina koji sadrže Cu kao kofaktor. Posledično, akumulacija Cu-proteina Cu/Zn superoksid-dismutaze i plastocyanina koji vezujući Cu doprinose skladištenju viška jona Cu u biljnim ćelijama, je izraženija kod biljaka gajenih sa silicijumom. Razumevanje uloge i mehanizama delovanja Si u biljkama će doprineti njegovoj širokoj praktičnoj primeni u cilju povećanja rezistencije i tolerancije biljaka na stres.

Ključne reči: silicijum, toksičnost bakra, oksidativni stres, Cu-ligandi, Cu-proteini, mikro RNK

Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić

Laboratory for Plant Molecular Biology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,

University of Belgrade

Correspondence: dragana.bosnic@imgge.bg.ac.rs

180

Abstract: Although copper (Cu) is an essential microelement for plants, if present in excess it has a phytotoxic effect causing oxidative stress. Silicon (Si) is not essential, but it is the only element with protective effect to plants under stress. Application of silicic acid to plants treated with toxic concentrations of copper alleviates the harmful effects of excess copper, which results in increase tolerance in these plants. The protective mechanisms of Si in cucumber plants have been studied in more details and include a decrease in accumulation of Cu by downregulation of genes responsible for Cu uptake in plants, immobilization of Cu in the root cell walls as well as higher biosynthesis of Cu-ligands: organic acids (citrate, malate and aconitate) and amino acids (nicotianamine and histidine) that decrease the concentration of free, reactive Cu ions within the cell. The application of Si caused lower expression of microRNAs (miR398 and miR408) which are the main regulators of the expression of genes and proteins containing Cu as a cofactor. Consequently, the accumulation of Cu-proteins: Cu/Zn superoxide dismutase and plastocyanin, which are buffering sinks for excess Cu ions in plant cells, is more pronounced in plants grown with silicon. Better understanding the Si-mediated mechanisms in plants exposed to stress will contribute to its wider agronomic application in order to increase plant resistance and tolerance to stress.

Key words: silicon, Cu toxicity, oxidative stress, Cu-ligands, Cu-proteins, micro RNAs

Za rast, razviće i reprodukciju biljaka, pored vode, ugljen-dioksida i sunčeve svetlosti, neophodno je 14 esencijalnih elemenata. Esencijalnost podrazumeva njihovu direktnu ulogu u metabolizmu koja ne može biti u potpunosti zamjenjena nekim drugim elementom [1]. Iako su fiziološki gledano podjednako važni, prema sadržaju u biljkama elementi su podeljeni na makro- i mikroelemente. Makroelementi su u biljkama zastupljeni u relativno visokim koncentracijama ($>0,1\%$ suve mase), dok su mikroelementi prisutni u znatno manjim količinama ($<0,01\%$ suve mase). Mikroelementima, između ostalih, pripadaju metali bakar (Cu), gvožđe (Fe), cink (Zn) i mangan (Mn), koji imaju ulogu kofaktora u metaloproteinima, koji čine trećinu ukupnih proteina [2]. Metaloproteini obavljaju raznovrsne funkcije u ćeliji i u ovu grupu spadaju transkripcioni faktori, metaloenzimi, kao i proteini koji učestvuju u elektron-transfer reakcijama. S obzirom na ulogu metala u biljkama, održavanje njihove homeostaze je krucijalno za pravilno funkcionisanje osnovnih ćelijskih procesa.

SILICIJUM U BILJKAMA

Pored esencijalnih, u biljkama postoje i drugi elementi koji iako ne zadovoljavaju sve kriterijume esencijalnosti, povoljno utiču na fiziološke procese i označeni su kao korisni elementi [3]. Za posebne grupe biljaka ili pod određenim uslovima, ovi elementi čak mogu imati esencijalnu ulogu. Takve karakteristike poseduje silicijum (Si). Si je esencijalan za alge dijatomeje kao i biljke familije rastavića, ali kod većine biljaka koje žive u optimalnim uslovima nije bila poznata njegova direktna uloga u metabolizmu stoga je izostavljen iz grupe esencijalnih elemenata. Kod nekih vrsta i rodova sadržaj Si je naročito visok, čak do 10% suve mase, prevazilazeći najzastupljenije makroelemente. Smanjen sadržaj Si kod određenih vrsta dovodi do abnormalnosti u rastenuju i razmnožavanju, što ukazuje da se Si ne može potpuno isključiti kao esencijalan za biljke [4]. Si je jedini element koji ima protektivan efekat na biljke izložene različitim stresnim faktorima pa se može posmatrati kao „antistres“ element.

Silicijum je drugi element po zastupljenosti u zemljinoj kori, gde se najčešće nalazi u vidu silicijum-dioksida ili minerala silikata. U zemljišnom rastvoru i u vodi, Si je u prisutan kao nenaelektrisana ortosilikijumova kiselina, H_4SiO_4 , što je jedini hemijski oblik Si koji biljke mogu da usvajaju [4]. Sadržaj Si u biljkama varira u zavisnosti od biodostupnosti Si ali i od filogenetske pozicije u okviru biljnog carstva. Vrste koje hiperakumuliraju Si (sadrže $>4\%$ suve mase), pripadaju monokotilama iz familije trava (oštice, žitarice, a naročito pirinač). Dikotile uglavnom sadrže manje Si, ali se pojedine familije, kao što je fam. *Cucurbitaceae* (npr. krastavac), ističu višim sadržajem (2-4%) i pripadaju umerenim akumulatorima Si. Ostale vrste koje imaju $<0,5\%$ Si označene su kao neakumulatori (npr. paradajz i arabiropsis) [5].

Visoka zastupljenost Si posledica je aktivnog usvajanja Si putem specifičnih transporterata. Za influx Si u ćelije korena odgovoran je Lsi1 (eng. Low silicon 1), membranski protein sličan akvaporinima. Dalje sprovođenje Si iz korena ka nadzemnom delu, obavlja efluksni tip transporterata Lsi2, po principu protonskog gradijenta. Lokalizacija i polaran raspored ovih transporterata u određenim tipovima ćelija korena su presudni faktori odgovorni za usmeren transport i visoku akumulaciju Si, kao što je slučaj kod pirinča [6]. Kod krastavca (*Cucumis sativus* L.) su za razliku od onih u pirinču, Lsi1 i Lsi2 raspoređeni uniformno u ćelijama korena, bez polarnosti, što čini ovu vrstu umerenim akumulatorom Si [7].

Proces transpiracije obezbeđuje protok Si ksilemom, a distribuciju u ćelije listova omogućavaju drugi tipovi transporterata. Terminalni događaj jeste polimerizacija silicijumove kiseline i formiranje silicijumskih tela odnosno fitolita ($SiO_2 \cdot nH_2O$), koji svojom rigidnošću pružaju mehaničku podršku biljkama [4].

ULOGA SILICIJUMA U ZAŠТИTI BILJAKA OD BIOTIČKOG I ABIOTIČKOG STRESA

Uprkos visokoj zastupljenosti, metabolička uloga silicijuma u biljkama predstavljava je svojevrsnu enigmu za naučnike još od početka XX veka [8]. Zapažanja da dodavanje Si u vidu silikatne šljake povoljno utiče na rast i produktivnost biljnih vrsta od značaja za poljoprivredu i hortikulturu, otvorilo je novu eru istraživanja [9]. Pojedine biljne vrste pokazuju izuzetne razlike u prinosu u zavisnosti od količine dostupne forme Si u zemljišnom rastvoru [10]. Zemljišta u tropskim regionima se karakterišu ograničenom količinom rastvorljivog Si, dok su intenzivna poljoprivreda i uklanjanje žetvenih ostataka doprineli konstantnom smanjenju biodostupnog Si u zemljištu [11]. Fitoliti iz reciliranih ostataka biljaka mogu biti dragoceni izvor Si ali i dodavanje silicijuma u vidu đubriva je potpuno opravdano, imajući u vidu i da Si nije toksičan za biljke čak ni ukoliko je prisutan u višku [4].

Korisno dejstvo silicijuma na biljke naročito se uočava u uslovima stresa. S obzirom da se prisustvo stresnih faktora u prirodi teško može izbeći, usvajanje Si se može posmatrati kao adaptivna osobina biljaka koja je uslovljena sredinskim izazovima i stoga, ako Si i nije *per se* esencijalan, za biljke je od ogromnog značaja [12].

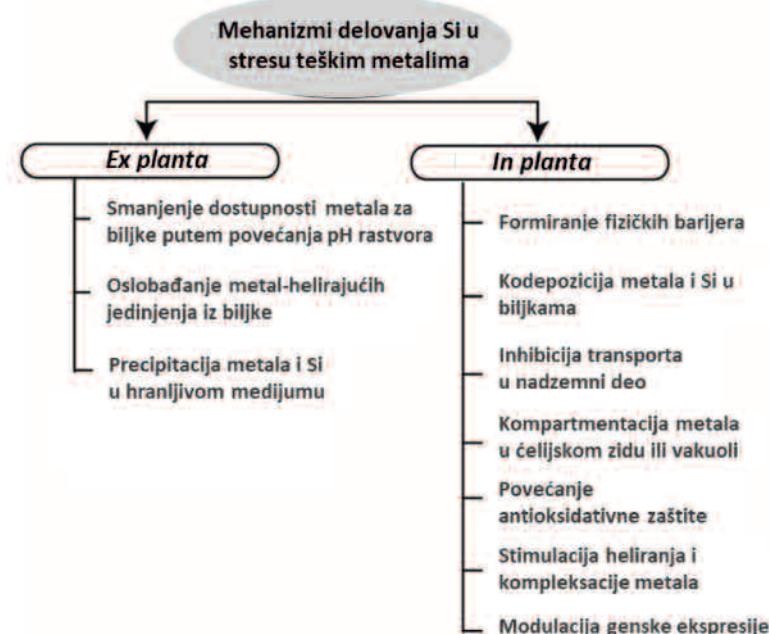
Mnogobrojne publikacije u poslednje dve decenije posvećene su razjašnjenju mehanizama delovanja Si kod biljaka izloženih različitim biotičkim i abiotičkim stresnim faktorima. Depoziti silicijuma u biljkama predstavljaju fizičku

barijeru za napad herbivora, nematoda, kao i za širenje patogenih gljiva i bakterija. Pored toga, istraživanja su pokazala da Si ima i aktivnu ulogu u zaštitu biljaka jer stimuliše endogene odbrambene mehanizme biljaka [13].

Primena silicijuma redukuje efekte abiotičkih stresnih faktora, kao što su fizički faktori (UV zračenje, suša, poleganje, niske i visoke temperature) i hemijski faktori stresa (zaslanjenost, nedostatak hraniva, toksičnost metala). Kao mehanička podrška listovima i stabljikama, Si ih održava u uspravnom položaju i time smanjuje mogućnost poleganja biljaka. Depozicija Si u kutikuli lista sprečava gubitak vode transpiracijom i povećava otpornost na sušu ali i utiče na smanjenje transmisije UV zračenja na epidermis [13].

Nasuprot tome, korisni efekti Si kod biljaka suočenih sa nedostatkom ili viškom esencijalnih elemenata ne mogu se objasniti isključivo njegovom mehaničkom ulogom. Kod biljaka koje rastu u uslovima nedostatka Fe, pokazano je da Si utiče na efikasnije iskorišćavanje apoplastnih rezervi gvožđa, povećavajući njegov sadržaj u listovima i smanjujući hlorozu listova što je uslovljeno promenom ekspresije gena odgovornih za ove procese [14,15]. Nedostatak fosfora može biti ublažen primenom Si, a sam mehanizam delovanja obuhvata stimulaciju jedinjenja koja vrše mobilizaciju i usvajanje fosfora povećavajući njegov sadržaj u biljkama [16].

Uloga Si u ublažavanju toksičnosti metala u biljkama obuhvata različite spoljašnje i unutrašnje mehanizme delovanja, što zavisi od vrste metala i intenziteta stresa (**Slika 1**). Stimulacija rasta biljaka uprkos prisustvu metala u višku, poboljšanje fiziološkog stanja i smanjenje toksičnih efekata metala dokumentovano je kod različitih biljnih vrsta gađenih sa Si. Mechanizmi delovanja Si su proučavani kod toksičnosti kadmijuma, aluminijuma, cinka, mangana, natrijuma [17]. Bakar je esencijalni element, ali kada je prisutan u višku znatno je toksičniji za biljke od pomenutih metala i stoga zahteva posebnu pažnju [18].



Slika 1. Mehanizmi delovanja silicijuma na ublažavanje toksičnosti metala kod biljaka. Slika je modifikovana prema Bhat et al. (2019).

ULOGA BAKRA U BILJKAMA

Bakar je prelazni metal i lako osciluje između oksidovanog Cu^{2+} i redukovaniog Cu^+ stanja što ga čini idealnim ko-faktorom proteina u redoks-reakcijama. Ipak, zbog ovog svojstva, Cu je visoko-reaktivan i moćan generator reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i otuda potiče potencijalna toksičnost ovog metala. Bakar je kofaktor u tzv. Cu-proteinima, koji imaju značajnu ulogu u metabolizmu ćelije, a preko stotinu takvih proteina postoji u biljkama [19]. Fotosinteza i respiracija su dva najvažnija procesa u biljkama bazirana na reakcijama prenosa elektrona u kojima učestvuju Cu-proteini [3]. Najznačajniji Cu-proteini su plastocijanin, citohrom-c-oksidaza, Cu/Zn superoksid-dismutaza, lakaza [20].

Plastocijanin (PC) je esencijalan za proces fotosinteze kod biljaka i spada u najzastupljenije Cu-proteine. Ima ulogu u elektron-transportnom lancu fotosistema I (PSI) kao mobilni nosač elektrona u lumenu tilakoida u hloroplastima [21,22]. Citohrom-c-oksidaza (CCO) je transmembranski proteinski kompleks koji učestvuje u elektron-transportnom lancu tokom respiracije kod svih eukariota, arheia i bakterija [23]. Superoksid-dismutaza (SOD) je enzim koji učestvuje

u antioksidativnoj zaštiti kod aerobnih organizama. U zavisnosti od metala koji služi kao kofaktor, razlikuju se Fe SOD, Mn SOD i Cu/Zn SOD izoenzimi. Iako su funkcionalno komplementarni, Cu/Zn SOD se sa svoje tri izoforme (citosolna CSD1, plastidna CSD2 i peroksizomalna CSD3) smatraju najvažnijim za proces detoksifikacije od ROS-a [24,25]. Lakaze (LAC) pripadaju superfamiliji enzima oksido-reduktaza koji katalizuju oksidaciju mnoštva različitih supstrata (fenoli, amini i aromatični amini itd.) omogućavajući njihovu polimerizaciju, a takav tip reakcija je zastupljen u mnogim biološkim procesima [26]. Lakaze kod biljaka učestaju u biosintezi lignina, struktturnog konstituenta čelijskih zidova, kojima pruža mehaničku i struktturnu potporu. Ligin omogućava funkciju ksilema u sprovodjenju vode i hraniva od korena naviše ali je njegova uloga značajna i u formiranju mehaničke barijere prema prođoru patogena i teških metala u biljna tkiva [27].

USVAJANJE I DISTRIBUCIJA BAKRA

Koncentracija bakra u biljkama je u opsegu 2-50 µg/g suve mase, zavisno od biljne vrste i stadijuma razvića [20]. Na varijacije u sadržaju bakra u biljkama utiče bioraspoloživost bakra u zemljištu ali i zastupljenost drugih esencijalnih elemenata. Biodostupnost bakra zavisi od fizičko-hemijских osobina, pre svega pH zemljišta kao i bioloških procesa u regionu rizosfere. Bakar je uglavnom imobilisan u mineralima a manji procenat ukupnog bakra je u zemljišnom ras-tvoru u formi dvovalentnog jona [28]. Mechanizam usvajanja Cu kod dikotila sličan je usvajaju Fe, što podrazumeva redukciju jona na plazma-membrani i usvajanje redukovane forme [29]. Članovi familije metaloreduktaza FRO (eng. Erric Reductase, FRO) obavljaju redukciju Fe^{3+} i Cu^{2+} ; FRO2 u korenu je najznačajnija za gvožđe, dok su FRO4 i FRO5 uključene u homeostazu bakra [30,31].

Transport Cu^+ forme obavljaju visoko-afinitetni transporteri konzervisane familije COPT (eng. Copper Protein Transporter), koja postoji kod svih eukariota [32]. Najznačajniji za usvajanje Cu^+ putem korena je plazma-membranski COPT1 [33]. Za distribuciju Cu unutar ćelije do ciljnih proteina čiji je kofaktor, odgovorni su pomoćni proteini, Cu-šaperoni [34]. U transport bakra u ćeljske kompartmane, eksport bakra iz ćelije, kao i ubacivanje u ksilem uključene su ATPaze P-tipa odnosno HMA (eng. Heavy Metal ATPases) [35].

Glavni helator Cu u ksilemu koji omogućava translokaciju i distribuciju Cu unutar listova floemskim putem, je nikeljanamin (NA) [36,37]. NA je neproteinska aminokiselina koja vezuje i druge metale osim bakra, a kompleks NA-metal ulazi u ćelije putem YSL transportera (eng. Yellow Stripe-Like). Dakle, uloga NA i YSL je u lateralnom transportu, distribuciji metala u listovima, ali i remobilizaciji metala tokom senescencije i njihovo skladištenje u semenu [37,38].

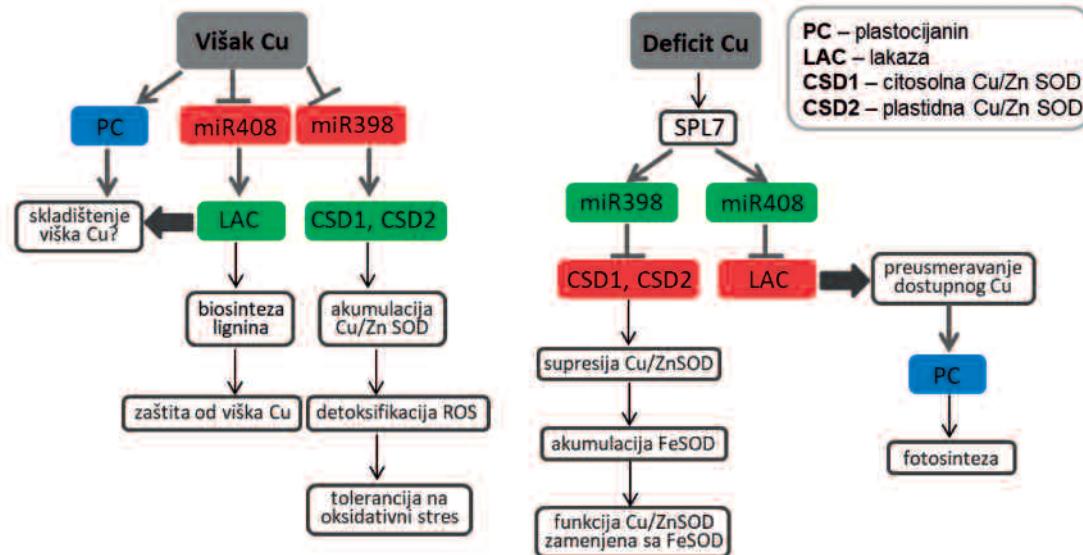
REGULACIJA HOMEOSTAZE BAKRA U BILJKAMA

Homeostaza bakra se postiže održavanjem balansa između procesa usvajanja, skladištenja i izlaska Cu iz ćelije za šta su zaduženi različiti akteri. Stroga kontrola distribucije Cu je neophodna kako bi se obezbedile trenutne potrebe biljaka za Cu, ali i da bi se biljke zaštitive od štetnog prisustva Cu u višku. Promene ekspresije gena i proteina uključenih u homeostazu Cu reguliše transkripcioni faktor SPL7 (eng. SQUAMOSA Promoter-binding protein-Like), uključujući i post-transkripcionu regulaciju putem mikro RNK [39]. Biljne miRNK, za razliku od animalnih, nakon komplementarnog sparivanja, iRNK vode u degradaciju i na taj način ostvaruju ulogu u brojnim biološkim procesima bitnim za rast i razviće, određivanje ćelijskog identiteta, signalnu transdukciju ali i odgovor na stres [40,41]. Čak i kratkotrajna promena ekspresije miRNK tokom stresa može da rezultira značajnim fiziološkim efektima [42].

miR398 i miR408 su visoko konzervisane u biljkama, a njihova ekspresija zavisi od sadržaja Cu u biljkama pa su označene kao Cu-miRNK [39]. Targeti miR398 su izoforme Cu/Zn SOD citosolna CSD1 i plastidna CSD2, šaperon (CCS) koji dostavlja Cu ovim enzimima kao i COX5b-1 subjedinica citochrom-c-oksidaze [40,43]. S obzirom da reguliše Cu/Zn SOD, koja je deo antioksidativne odbrane, miR398 je angažovana u odgovoru na različite biotičke i abiotičke faktore koji izazivaju oksidativni stres [42]. Targeti miR408 su lakaze i grupa Cu-proteina označena kao fitocijanini [44]. miR408 omogućava pravilan vegetativni razvoj biljaka, ali takođe učestvuje u odgovoru na različite stresne faktore [42,45,46].

Sinhronizovana regulacija ekspresije gena, koji kodiraju Cu-proteine, putem miRNK ima fiziološki smisao u prioritetskoj raspodeli bakra u biljci, ukoliko su količine ovog elementa ograničene (**Slika 2**). Snižena ekspresija neesencijalnih Cu-proteina omogućava usmeravanje Cu ka plastocijaninu koji je esencijalan za proces fotosinteze [47]. Neesencijalni Cu-proteini se zamjenjuju funkcionalnim parnjacima, koji obavljaju istu ulogu, kao što su Cu/Zn SOD i Fe SOD izoenzimi. Njihova ekspresija je koordinisano regulisana na transkripcionom nivou u zavisnosti od dostupnosti Cu odnosno Fe u biljkama. Nivo transkriptata i proteina Cu/Zn SOD i Fe SOD, kao i količina plastocijanina su pouzdani indikatori statusa Cu u biljkama. Kada je Cu u nedostatku, povišena ekspresija miR398 utiče na sniženje ekspresije CSD1 i CSD2, dok je istovremeno Fe SOD visoko eksprimirana [44,47]. Takođe, miR408 snižava ekspresiju svojih targeta i na taj način učestvuje u preusmeravanju Cu ka plastocijaninu [45].

Nasuprot tome, miRNK bi u uslovima bakra u višku mogle da učestvuju ne samo u odbrani od oksidativnog stresa, nego i u povećanju ekspresije Cu-proteina, koji uz svoju primarnu funkciju, mogu poslužiti i kao skladišta reaktivnih Cu jona, i time uticati na smanjenje fitotoksičnost [48].



Slika 2. Regulatorna mreža Cu-miRNK i njihovih targeta zavisno od nivoa Cu u ćelijama (zeleni pravougaonici označavaju povišenu ekspresiju a crveni sniženu). Slika modifikovana prema Leng et al. (2017).

TOKSIČNOST BAKRA KOD BILJAKA

Toksični efekti bakra na biljke su bili prepoznati pre nego što je dokazana njegova esencijalna uloga. Fitotoksičnost je primetna na morfološkom, fiziološkom i molekularnom nivou već pri koncentraciji Cu od 20 µg/g suve mase [3]. Bakar se prvenstveno akumulira u korenju pa su štetni efekti Cu izraženiji u ovom biljnog organu u vidu progresivnog smanjenje rasta, razvoja, grananja i tamne obojenosti korenja. U nadzemnom delu simptomi toksičnosti obuhvataju inhibiciju rasta, hlorozu i nekrozu listova, promene u reproduktivnim organima koje vode ka redukciji veličine ploda i smanjenoj klijavosti semena [20]. Bakar u višku deluje antagonistički na usvajanje i translokaciju drugih esencijalnih elemenata kao što su Fe, Zn i Mn [49–51]. Na ćelijskom nivou, Cu višestruko negativno utiče na najbitnije procese, fotosintezu i respiraciju [3,20], i izaziva promene u propustljivosti ćelijske membrane što dovodi do curenje ćelijskog sadržaja [52,53]. Bakar ima visok afinitet ka proteinima sa kojima može direktno da interaguje ili da izmesti druge esencijalne kofaktore sa svojih mesta, inhibirajući tako katalitičku, struktturnu ili transportnu ulogu proteina [54].

Višak redoks-aktivnih Cu jona katalizuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) što za posledicu ima oksidativni stres u ćelijama. ROS višestruko utiču na makromolekule, izazivajući oštećenje nukleinskih kiselina, inhibiciju enzima, oksidaciju proteina, peroksidaciju lipida, što vodi ka aktivaciji programirane ćelijske smrti [55].

MEHANIZMI ZAŠTITE BILJAKA OD TOKSIČNOG BAKRA

Biljke poseduju različite mehanizme tolerancije prema toksičnim metalima koji su orijentisani ka smanjenju akumulacije reaktivnih jona kako bi se suzbila direktna oštećenja ćelijskih struktura. Spoljašnji mehanizmi su usmereni ka smanjenju usvajanja metala putem formiranja ektomikorize ili kompleksiranjem metala sa ekstraćelijskim eksudatima koji se aktivno izbacuju iz ćelija korenja u rizosferu. Zadržavanje metala u korenju je mehanizam kojim se ograničava translokacija u nadzemni deo, a samim tim i negativan uticaj na fotosintetske organe [19,56]. Unutrašnji, ćelijski mehanizmi odbrane od toksičnosti uključuju imobilizaciju metala u ćelijskom zidu, ograničen influks kroz ćelijsku membranu i pojačan efluks iz ćelije, što se postiže regulacijom ekspresije transporteru odgovornih za ove procese. Mehanizmi za detoksifikaciju od metala podrazumevaju vezivanje metala za različite ligande i skladištenje takvih kompleksa unutar ćelije, u vakuoli, ili u posebnim strukturama kakve su trihome. Jedinjenja koja sadrže tiolnu grupu, kao što su metalotioneini i fitohelatini, imaju jak afinitet ka Cu i stoga imaju važnu ulogu u detoksifikaciji. Sekvestracija metala u vakuolama vezivanjem za organske kiseline je značajan mehanizam tolerancije, koji je naročito izražen kod biljaka hiperakumulatora metala. Pored toga, akumulacija slobodnih aminokiselina smatra se aktivnim odgovorom biljaka na stres teškim metalima. Aminokiseline kao što su histidin i nikotijanamin su snažni helatori bakra koji mogu imati presudnu ulogu u zaštiti od toksičnosti ovog metala [56–58].

TOKSIČNOST BAKRA U ZEMLJIŠTU KAO AGROEKOLOŠKI PROBLEM I PRIMENA SILICIJUMA KAO REŠENJE

Različite antropogene aktivnosti, a naročito prekomerna upotreba fungicida na bazi Cu, uzrokovale su kontaminaciju agroekološkog zemljišta i pijaci voda bakrom [59]. Bakar kao perzistentan polutant, ima svojstvo akumulacije u životnoj sredini i ulazi u lance ishrane. Brojna istraživanja su pokazala da silicijum u biljkama može redukovati simptome stresa izazvanog toksičnim metalima. Korisni efekti delovanja Si često su specifični za biljnu vrstu/rod i obično su izraženiji kod vrsta koje akumuliraju veće količine Si u svojim tkivima. Razumevanje uloge i mehanizama delovanja Si u biljkama će doprineti njegovoj širokoj praktičnoj primeni u cilju povećanja rezistencije i tolerancije biljaka na stres. Mehanizmi delovanja Si u biljkama izloženim stresu toksičnim koncentracijama bakra, obuhvataju kompleksne efekte vidljive na fiziološkom, biohemiskom i molekularnom nivou (**Tabela 1**).

Biljne vrste	Biomasa korenja	Biomasa lista	Ekspresija COPT1	Ekspresija FRO4	Konc. Cu u korenju	Konc. Cu u listu	Konc. Fe u listu	Konc. Mn u listu	Konc. Zn u listu	Sadržaj hlorofila	Ekspresija aktivnosti PAL u korenju	Lipidna peroksidacija	Aktivnost APX	Aktivnost CAT	Aktivnost SOD	Ekspresija SOD	Ekspresija miR398	Ekspresija miR408	Ekspresija MT	Ekspresija PCS	Konc. malata	Konc. citrata	Konc. akonitata	Konc. nikocijananina	Konc. histidina	reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	↑	↑	↓		–	–	–	–	–	↓			↑		↑									[63,86]		
<i>Antirrhinum majus</i>	–	–			↓	–	–	–	–	–	–													[68]		
<i>Zinnia elegans</i>	↑	↑			↓	↓	–	↑	–	↓														[68]		
<i>Erica arborea</i>	↑	↑			↑	↓	–	–	↑															[70]		
<i>Phyllostachys fastuosa</i>	–	–			–	–																			[62]	
<i>Oryza sativa</i>	↑	↑			↓				↑		↑		↓												[61]	
<i>Spartina densiflora</i>	↑	–			–	↓		↑		↑															[65]	
<i>Triticum turgidum</i>					↓	↓		↓	↓	–										↑	↑	↑		[72]		
<i>Gossypium hirsutum</i>	↑	↑			↓	↓			↑		↓	↑	↑	↑	↑									[67]		
<i>Nicotiana tabacum</i>	↑	↑	↓		↓	–														↓	↓				[69]	
<i>Cucumis sativus</i>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	[60,64,77]	

↑ stimulacija, ↓ supresija, – bez uticaja

Tabela 1. Uticaj silicijuma na ispitivane parametre kod različitih biljnih vrsta izloženih toksičnom bakru

UTICAJ SILICIJUMA NA FIZIOLOŠKE PARAMETRE STRESA KOD BILJAKA IZLOŽENIH TOKSIČNOM BAKRU

Inhibitorni efekat na rastenje biljaka krastavca primetan je pri tretmanu različitim koncentracijama Cu, od umero, do srednje i visoko toksične [60]. Primena Si u vidu 1,5 mM silicijumove kiseline doprinosi povećanju ukupne biomase biljka, bez obzira na dozu bakra u tretmanu. Analizirajući pojedinačne organe, Si ima veći uticaj na biomasu lista krastavca dok na nivou korenja nije primećeno značajnije poboljšanje [60]. Sličan efekat je zabeležen i kod pirinča [61] i bambusa [62], biljnih vrsta koje se odlikuju hiperakumulacijom Si, ali i kod arabidopsisa, koji nije izrazit Si-akumulator [63]. Inhibitorni uticaj na proces fotosinteze jedan je od glavnih simptoma toksičnosti Cu kod biljaka, stoga se uticaj Si na povećanje biomase lista može povezati sa većim intenzitetom fotosinteze kod biljaka gajenih sa Si. U skladu sa tim, izmeren je povećan sadržaj hlorofila kod krastavca i to u svim listovima različite starosti [64]. Kod vrste *Spartina densiflora*, koja toleriše visoke koncentracije Cu, pokazano je da primena Si smanjuje inhibitorni uticaj Cu na aktivna mesta RUBISCO enzima i da povećava koncentraciju biljnih pigmenata, što je rezultovalo povećanjem intenziteta fotosinteze i biomase tretiranih biljaka [65].

Iako Si ne pokazuje značajniji uticaj na biomasu korenja biljaka, doprinosi očuvanju strukture i funkcije korenja. Teški metali kakav je bakar narušavaju permeabilnost ćelijske membrane i izazivaju akutno curenje elektrolita iz ćelija korenja [53]. Ovaj fenomen je povezan sa otvaranjem različitih tipova jonskih kanala i efluksom K⁺, kao i formiranjem ROS-a, što vodi ka programiranoj ćelijskoj smrti [66]. Curenje elektrolita iz korenja krastavca se detektuje već u prvim satima od početka tretmana bakrom i vremenom se povećava, dok kod biljaka gajenih sa Si takav efekat izostaje [64]. Na mikroskopskim preseциma korenja pirinča primetna su manja oštećenja ćelijskih struktura usled prisustva Si, što može da ima uticaj i na samo usvajanje Cu [61].

ROS izazivaju peroksidaciju lipida ćelijske membrane, ali u prisustvu Si nije zabeleženo povećanje nivoa lipidne peroksidacije u krastavcu [60] i pamuku [67] uprkos povišenim koncentracijama Cu, što ukazuje na smanjen nivo ok-

sidativnog stresa. Zajednička karakteristika vrsta/genotipova tolerantnijih na oksidativni stres uzrokovani teškim metalima jeste efikasna antioksidativna zaštita, što predstavlja adaptivni mehanizam odbrane od stresa [55]. Protektivno delovanje Si ostvaruje se i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima, kao što su superoksid-dismutaza, askorbat peroksidaza i katalaza koji smanjuju nivo ROS-a [61,64,67] Povišeni nivo antioksidativne zaštite usled primene Si zabeležen je i u prisustvu drugih stresora: UV zračenje, niske i visoke temperature, zaslanjenost zemljišta, suša itd. [17]. Ovakvi podaci ukazuju da je mehanizam delovanja Si i univerzalnog karaktera, bez obzira na uzrok stresa kojem je biljka izložena.

UTICAJ SILICIJUMA NA USVAJANJE I DISTRIBUCIJU BAKRA U BILJKAMA

Bitan aspekt korisnog delovanja Si jeste smanjenje koncentracije reaktivnih jona unutar biljke kao posledica smanjenog usvajanja, pojačanog izbacivanja ali i efikasnog skladištenja odnosno imobilizacije metala unutar biljke. Akumulacija bakra u korenu tretiranih biljaka krastavca je više destina puta povećana, dok primena Si značajno smanjuje koncentraciju Cu [60], što je potvrđeno i u eksperimentima sa pamukom, pirinčem i cinijom [61,67,68]. Ipak, ovaj efekat se ne može posmatrati kao opšti mehanizam delovanja Si, jer Si nije uticao na usvajanje Cu kod drugih analiziranih biljaka, kao što su arabidopsis i bambus [62,63,65]. Najznačajniji za proces usvajanja Cu je COPT1, koji je visoko-afinitetni transporter Cu⁺ forme, i čija se ekspresija reguliše putem SPL7 TF a direktno zavisi od nivoa Cu u biljkama [33]. U korenu krastavca ustanovljena je snižena ekspresija COPT1, dok je kod biljaka gajenih sa Si ekspresija ovog gena dodatno smanjena [64]. Sličan profil ekspresije COPT1 zabeležen je u biljkama duvana [69]. Imajući u vidu strogu regulaciju i funkciju COPT1 transportera, uticaj Si na ekspresiju COPT1 kod navedenih vrsta dikotila se može smatrati odgovornim za smanjenje koncentracije Cu u korenu.

Usvajanju Cu⁺ prethodi hemijska redukcija na plazma-membrani koju vrše FRO reduktaze. Analizom transkriptoma u uslovima nedostatka Cu, ustanovljena je izrazito povišena ekspresija FRO4 u korenu arabidopsisa [31]. U literaturi za sada nema podataka o ekspresiji ovog gena kod biljaka izloženih povišenim koncentracijama Cu. Rezultati na krastavcu su pokazali da tretman 10 μM Cu snažno utiče na ekspresiju FRO4 u korenu, a primena Si utiče na još izraženije smanjenje ekspresije ovog gena, slično ekspresiji COPT1 [64]. Ovakav profil ekspresije nedvosmisleno ukazuje da je smanjenje akumulacije Cu u korenu krastavca posledica uticaja Si na glavni sistem za usvajanje Cu za koji su odgovorni zajedno COPT1 i FRO4.

Primena Si takođe smanjuje koncentraciju Cu u listu krastavca, ali ta razlika nije toliko značajna kao u korenu [60]. Kod arabidopsisa nije bilo razlike u koncentraciji Cu u listu između tretmana bez i sa Si [63]. Manji sadržaj Cu u listovima vrste *Erica andevalensis*, koja toleriše visoke koncentracije Cu, zabeležen je u prisustvu Si što je objašnjeno smanjenom translokacijom Cu iz korena u listove [70]. Sprečavanje translokacije metala može biti posledica Si-stimulisanog formiranja dodatne kasparijeve trake kao i pojačane depozicije lignina u endodermisu korena, koji služe kao fizička barijera za transport metala [71]. Smatra se da je uticaj Si na smanjenu translokaciju Cu kod pšenice, ostvaren putem Si-stimulisanog debljanja endodermisa zajedno sa povećanjem adsorbcije Cu na površini korena i imobilizacijom Cu u epidermisu [72].

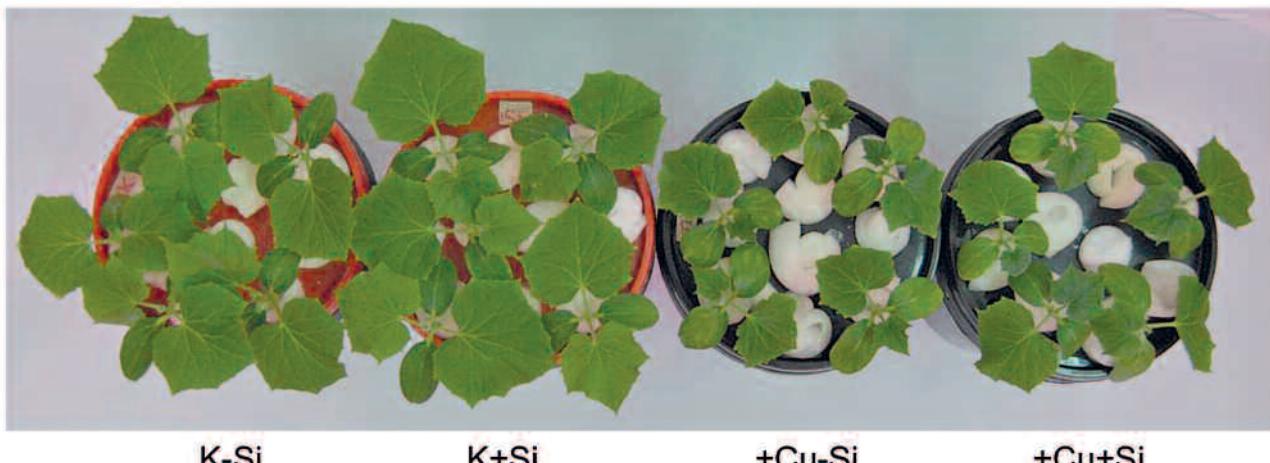
Akumulacija lignina je rezultat povećane aktivnosti enzima peroksidaza i lakaza koji učestvuju u polimerizaciji fenolnih jedinjenja - prekursora lignina, koji se sintetišu u fenilpropanoidnom putu a prvi i najvažniji enzim u tom putu je fenilalanin-amonijum-liaza (PAL) [27,73]. Istraživanja su pokazala da su aktivnost PAL, količina fenola i lignina u pozitivnoj korelaciji sa dozom primjenjenog bakra i nivoom stresa [74,75]. Intenzivna lignifikacija u korenu krastavca je detektovana nakon pet dana tretmana Cu. Međutim, biljke gajene sa Si odlikuju niži nivo lignifikacije, kao i manji sadržaj fenola i niža ekspresija PAL, što ukazuje na smanjeni nivo stresa, i u saglasnosti je sa nižom lipidnom peroksidacijom u korenu takvih biljaka [60].

Bakar u višku inhibira akumulaciju drugih esencijalnih elemenata, pre svega Fe, Zn i Mn zbog nespecifičnih mehanizama regulacije selektivnog usvajanja jona u uslovima disbalansa i kompeticije za iste transportere [76]. Naročito je izražena antagonistička interakcija između Cu i Fe koji su označeni kao metabolički parnjaci, što je posledica sličnosti hemijskih osobina i bliske evolutivne povezanosti metaboličkih puteva ovih metala [49,50].

Pored Cu, i Si utiče na celokupan mineralni sastav tretiranih biljaka. Kod travske *Spartina densiflora*, Si povećava koncentraciju Mn, koja je zbog tretmana viškom Cu bila smanjena [65]. Takođe, antagonistički efekat viška Cu na sadržaj Zn u listovima, je umanjen u određenoj meri dodatkom Si kod vrste *Erica andevalensis* [70]. Primena Si je značajno uticala na povećanje sadržaja Fe, Zn i Mn u listovima Cu-tretiranog krastavca [77]. U navedenoj studiji je po prvi put pokazano da Si smanjuje Cu-indukovani nedostatak gvožđa u biljkama. Sa druge strane, uloga Si kod biljaka koje se primarno suočavaju sa nedostatkom Fe detaljnije je proučena. Pokazano je da Si utiče na povećanje apoplastnog depoa Fe u korenu i stimuliše translokaciju Fe do listova zahvaljujući indukovanoj biosintezi Fe-helirajućih jedinjenja, kao što je citrat [14,78]. Citrat je glavni helator gvožđa u ksilemu, a povećanje njegove koncentracije je zabeleženo i kod

biljaka krastavca tretiranih bakrom u prisustvu Si [64]. Ovi podaci potkrepljuju hipotezu o postojanju univerzalnih mehanizama delovanja Si bez obzira na vrstu stresa sa kojim se biljka primarno suočava. Glavni simptom smanjenja koncentracije Fe zbog prisustva Cu jona u višku, je pojava hloroze listova. Kod biljaka gajenih sa Si, povećani sadržaj Fe kao i sadržaj hlorofila smanjili su hlorozu i doprineli povećanju biomase listova uprkos prisustvu bakra u višku (**Slika 3**).

Uticaj Si na preraspodelu metala unutar biljke, kao i njegovo direktno vezivanje metala važni su mehanizmi kojima Si utiče na povećanje tolerancije biljaka prema prisustvu metala u višku [17]. Značajan procenat Cu se nalazi vezan u ćelijskom zidu, čak do 60% ukupnog Cu u ćeliji, čime se obezbeđuje imobilizacija Cu jer su joni metabolički inaktivirani pošto ne ulaze u protoplast ćelije već ostaju izvan [79]. U korenu krastavca primena Si doprinosi povećanju zastupljenosti Cu u ćelijskom zidu, što utiče na procentualno smanjenje sadržaja Cu unutar ćelije [64]. Slični rezultati su zabeleženi i kod stresa Cd [71]. Takođe, uticaj na distribuciju Mn se smatra glavnim mehanizmom delovanja Si kod prevezilaženja toksičnosti Mn. Povećanje zastupljenosti Mn u frakciji ćelijskog zida u listovima biljaka sa Si, direktno utiče na smanjenje sadržaja ROS i nivoa oksidativnog stresa [80]. U skladu sa tim, povećano vezivanje Cu u ćelijskom zidu a smanjeno prisustvo unutar ćelije kod biljaka krastavca gajenih za Si doprinelo je smanjenju nivoa oksidativnog stresa zajedno sa povećanom aktivnosti antioksidativnih enzima [64]. Iako je pokazano da Si ima uticaja na metabolizam Cu do sada nije dokumentovana njihova kolokalizacija [72].



Slika 3. Biljake krastavaca gajene pri optimalnoj koncentraciji Cu (kontrola, K) bez Si (K-Si) i sa 1,5 mM Si (K+Si), kao i biljaka tretiranih pet dana 10 μ M Cu bez Si (+Cu-Si) i sa 1,5 mM Si (+Cu+Si).

UTICAJ SILICIJUMA NA EKSPRESIJU MIR398, MIR408 I Cu-PROTEINA

Lakaze učestvuju u biosintezi lignina pa je kod biljaka tretiranih bakrom, povećana aktivnost ovog enzima praćena povećanim sadržajem lignina u korenu [81]. Lakaza je, kao Cu-protein, uključena i u homeostazu bakra [44]. Neki predstavnici familije lakaza su konstitutivno eksprimirani i u tkivima koja su minimalno lignifikovana što sugerise da imaju i dodatne uloge [82]. Ekspresija lakaza je post-transkripciono regulisana putem miRNK. Istraživanja na krastavcu su pokazala da je miR408 smanjena u korenu biljaka tretiranih bakrom, što je u saglasnosti sa povišenim nivoom transkriptata *LAC3*, implicirajući da je ekspresija *LAC3* regulisana ovom miRNK kada je Cu prisutan u višku [64]. U odnosu na njih, kod biljaka gajenih sa Si, zabeležen je još niži nivo miR408 koje su posledično imale i višu ekspresiju *LAC3*. Zanimljivo je da ovi rezultati nisu u korelaciji sa nižim stepenom lignifikacije koja je zabeležena kod biljaka sa Si [60]. To sugerise da LAC3 obavlja i druge funkcije u stresu toksičnim Cu, koje nisu povezane sa lignifikacijom, a mogu biti u vezi sa potencijalnom ulogom Cu-proteina u skladištenju viška jona Cu [48], a koje je dodatno stimulisano prisustvom Si.

Silicijum ima uticaj i na ekspresiju drugih Cu-proteina, Cu/Zn SOD izoformi i plastocijanina. Cu/Zn SOD se smatraju najvažnijim izoenzimima SOD, sa centralnom ulogom u odgovoru biljaka na stres [25]. Citosolna CSD1 i plastidna CSD2 su ključne izoforme u biljnim tkivima [44]. Ipak, CSD1 i CSD2 u uslovima stresa ne odgovaraju na isti način. Visok intenzitet oksidativnog stresa često ne stimuliše nego dovodi do inhibicije aktivnosti CSD1 [25,83]. Zapravo, ekspresija CSD1 izoforme odražava opšti odgovor biljaka na stres [24]. Upravo je u korenu krastavca pokazano da je količina CSD1 izrazito snižena zbog tretmana bakrom, što je u skladu sa nižom aktivnosti SOD enzima i ukazuje na visok intenzitet stresa kod ovih biljaka [60]. Očekivano, primena Si je dovela do povećanja CSD1 u korenu, a što je u saglasnosti sa ukupnom aktivnosti SOD. Stoga se može izvesti zaključak da je stimulacija ekspresije CSD1 važna komponenta Si-posredovanog mehanizma tolerancije biljaka i ublažavanja stresa uprkos prisustvu visoke koncentracije Cu u korenu.

S druge strane, CSD2 izoforma je bila povećana u korenu kod obe grupe biljaka tretiranih Cu, ali je ipak zastupljenija kod biljaka gajenih sa Si [60]. Smatra se da CSD2 može da skladišti Cu i na taj način obavlja detoksifikaciju od viška Cu jona. To potvrđuju istraživanja gde je pokazano da CSD2 nije ključna komponenta antioksidativne zaštite u hloroplastima [84], kao i da overekspresija CSD2 ne može značajno da poboljša odgovor na stres na nivou cele biljke [85]. Različiti faktori stresa ne utiču na količinu proteina kao i aktivnost CSD2, mada povećavaju nivo transkriptata [24]. Izuzetak je stres viškom Cu koji dovodi do povećanja CSD2 i na transkripcionom i na proteinском nivou [84]. Kod biljaka krastavca je pokazano da profil ekspresije CSD2 proteina u potpunosti odražava gensku ekspresiju [64]. Pored toga, analiza miR398, koja targetuje Cu/Zn SOD izoforme i predstavlja glavni modulator homeostaze Cu, potvrdila je ovaj rezultat. Smanjen nivo miR398 je u saglasnosti sa višom ekspresijom *CSD2* target gena kod Cu-tretiranih biljaka sa Si [64]. U navedenom radu, po prvi put je predstavljena paralelna analiza ekspresije gena i proteina i njihove aktivnosti, kao i regulatornih miRNK, u uslovima toksičnog bakra i primene silicijuma. Jedino je kod arabidopsisa pokazano da Si dodatno povećava ekspresiju i *CSD1* i *CSD2*, što je u saglasnosti sa ukupnom aktivnosti SOD enzima u listovima, mada u ovom radu nije predstavljen nijedan indikator oksidativnog stresa a razlike u koncentraciji Cu u listovima bez i sa Si nije bilo [63,86].

Polovina ukupnog bakra unutar ćelija zelenih tkiva vezana je za tri proteina: CSD1, CSD2 i plastocijanin [22]. Regulacija homeostaze bakra putem miRNK prvenstveno ima za cilj da omogući distribuciju Cu plastocijaninu, naročito ukoliko je ograničen sadržaj Cu u ćelijama. Ekspresija plastocijanina nije regulisana na transkripcionom nivou putem miRNK i dakle, ne zavisi od statusa Cu u ćeliji. Međutim, pokazano je da količina proteina PC prati povećanje sadržaja Cu od sub-optimalnog do optimalnog [44]. S obzirom da je relativno mala količina funkcionalnog plastocijanina dovoljna za maksimalan intenzitet fotosinteze, dodatna akumulacija plastocijanina se zapravo dešava kao odgovor na prisustvo Cu [22,44]. Pored toga, plastocijanin može da vezuje slobodne Cu jone u *in vitro* uslovima i da tako smanji produkciju opasnog hidroksilnog radikal [87]. Rezultati istraživanja na krastavcu su pokazali da se količina plastocijanina kod biljaka tretiranih bakrom povećava, i to u znatno većoj meri ako su biljke gajene sa Si [60]. Ovi rezultati potvrđuju da se plastocijanin akumulira u prisustvu bakra u višku, kao što je pretpostavljeno u literaturi. Time je po prvi put pokazano da primena Si doprinosi akumulaciji PC koji vezuje i skladišti višak Cu u listovima i na taj način smanjuje opasnost od reaktivnih Cu jona što zajedno sa ostalim mehanizmima delovanja doprinosi boljem fitnesu biljaka gajenih sa silicijumom.

UTICAJ SILICIJUMA NA LIGANDE I HELATORE BAKRA

188

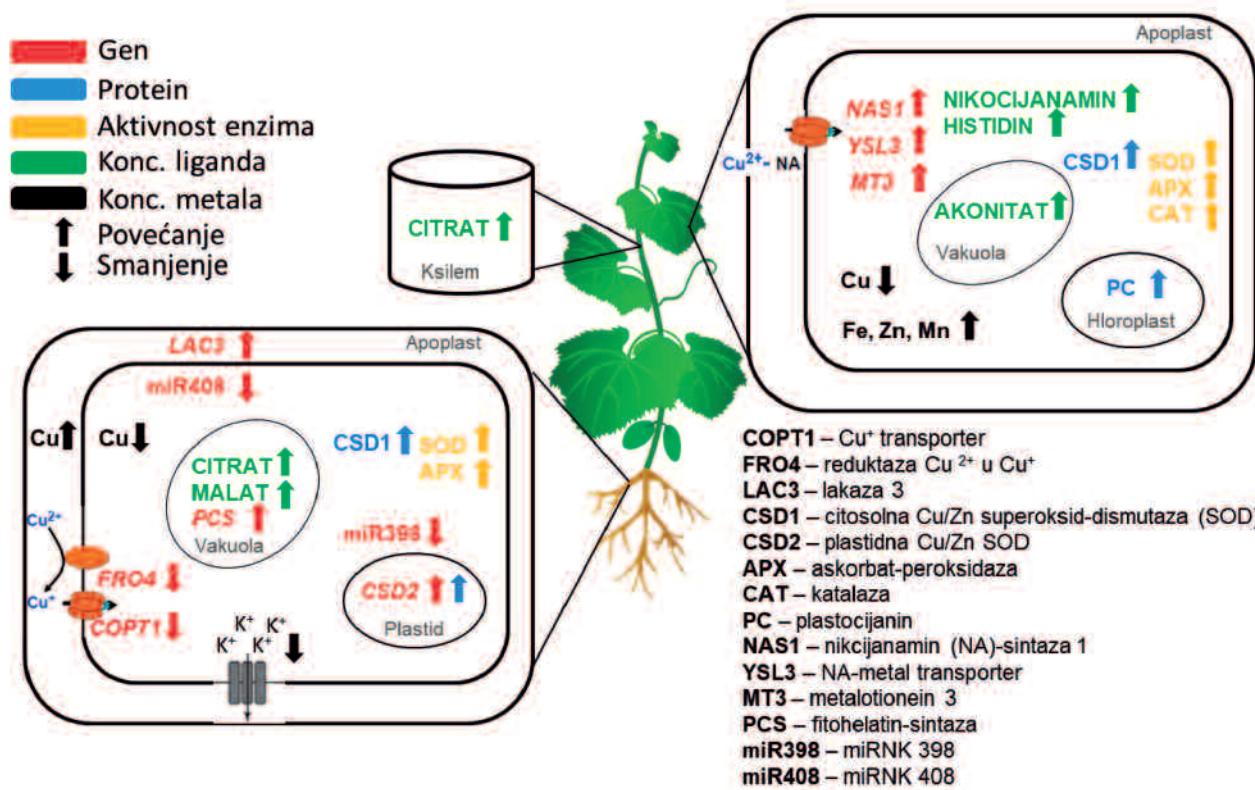
S obzirom na visoku reaktivnost u ćeliji ne sme postojati nijedan slobodan jon bakra [88]. Stoga su različiti organski molekuli uključeni u održavanje homeostaze ali i detoksifikaciju od bakra prisutnog u višku. Među najznačajnijim su tiolna jedinjenja (S-ligandi), organske kiseline (O-ligandi), kao i aminokiseline (N-ligandi) [56,57].

Bakar ima visok afinitet prema tiolnoj grupi stoga su metalotioneini među najvažnijim ligandima bakra u biljkama [58]. Kod krastavca, tretman bakrom dramatično povećava ekspresiju *MT3* u korenu, više od 1000 puta, ukazujući na značajnu ulogu metalotioneina u detoksifikaciji Cu [64]. Međutim, Si nije uticao dodatno na ekspresiju *MT3*, moguće zbog manjeg usvajanja a samim tim i manje koncentracije Cu u korenu. Nasuprot tome, ekspresija *MT2a* i *MT2b* u listu arabidopsisa je stimulisana primenom Si [86]. Iako kod arabidopsisa nije bilo razlike u koncentraciji Cu između tretiranih grupa biljaka, zaključeno je da Si indukuje MT koji mogu da uklone višak Cu [63,86]. Spektroskopske metode su pokazale da Si pospešuje vezivanje Cu za S-ligande (metalotioneine ili fitohelatine) u listu bambusa [62]. Fitohelatini vrše detoksifikaciju i skladištenje u vakuolama vezivanjem metala kakvi su Cd ili As, dok u slučaju Cu, tek u odsustvu drugih odbrambenih mehanizama mogu biti od značaja [89]. Si nema značajnijeg uticaja na aktivaciju *fitohelatin-sintaze*, što je pokazano kod krastavca [64] i arabidopsisa [86].

S druge strane, Si utiče na akumulaciju organskih kiselina kao što su citrat, malat i akonitat [64]. Njihova uloga je važna ne samo u transportu metala, već i u toleranciji prema metalima prisutnim u višku. Povećanje koncentracije citrata u korenu smatra se glavnim odbrambenim mehanizmom kod Cu-tolerantnih vrsta/genotipova [53]. U korenu bambusa pokazano je da je značajan ideo ukupnog Cu vezan za malat, kod biljaka i bez i sa Si [62]. Pored akumulacije citrata i malata u korenu, Si je uticao na akumulaciju akonitata u listu biljaka krastavca [60]. Formiranje kompleksa Cu sa organskim kiselinama, naročito sa akonitatom, je među najvažnijim mehanizmima korisnog efekta Si kod pšenice [72]. Akumulacija akonitata u listovima krastavca i pšenice ukazuje da je to važna organska kiselina za zaštitu biljaka od toksičnog Cu u prisustvu Si.

Aminokiseline kao što su histidin (His) i nikotijanamin (NA) formiraju veoma stabilne komplekse sa Cu i njihova sinteza je indukovana u prisustvu visokih koncentracija Cu kod biljaka [90,91]. NA ima jedinstvenu ulogu u homeostazi Cu [36,37], dok heliranje metala jakim ligandima, kakav je NA, predstavlja glavnu strategiju za detoksifikaciju kod biljaka koje nisu tolerantne na prisustvo metala u višku [57,58]. Za razliku od NA, histidin je aminokiselina koja je odgovorna za hipertoleranciju i hiperakumulaciju metala kod mnogih biljnih vrsta [19].

U listu krastavca detektovana je povećana koncentracija NA i His usled tretmana bakrom u višku, a primena Si je dodatno pospešila akumulaciju NA i His, što potvrđuju i molarni odnosi NA:Cu i His:Cu koji premašuju vrednosti kontrolnih biljaka [77]. Takođe, pokazana je i povećana ekspresija gena koji kodira NA-sintazu (NAS), glavnog enzima u biosintetskom putu NA, kao i *YSL3* koji je odgovoran za transport NA-metal kompleksa unutar listova [64]. Kod bambusa tretiranog bakrom detektovani su kompleksi Cu sa N-ligandima, kao i povećanje akumulacije His u korenju biljaka sa Si [62]. Heliranje jona pomoću NA i His važi za vodeći mehanizam kojim se efikasno kontroliše koncentracija slobodnih jona i postiže tolerancija prema metalima prisutnim u višku [57]. U skladu sa tim, može se izvesti zaključak da je stimulacija helatora u cilju povećanja tolerancije prema toksičnom bakru jedan od najvažnijih mehanizama korisnog delovanja Si u listu biljaka krastavca (**Slika 4**).



Slika 4. Mehanizmi delovanja Si na ublažavanje stresa izazvanog toksičnom koncentracijom Cu kod krastavca.

ZAKLJUČAK

Uobičajeni agroekološki uslovi, čak i oni koji se definišu kao povoljni za rastenje biljaka, podrazumevaju prisustvo bar nekog stresnog faktora koji može značajno uticati na kvalitet i prinos poljoprivrednih kultura. Ublažavanja efekata stresa kao i povećanja tolerancije biljaka prema stresu je imperativ u savremenoj poljoprivredi. Upečatljiva i jedinstvena uloga silicijuma potpuno opravdava njegovu primenu i u skladu je sa strategijom održivog razvoja, koja zahteva razvijanje ekološki prihvatljivih i ekonomičnih alternativa za zaštitu biljaka od višestrukih faktora stresa. Na tržištu su prisutne različite formulacije đubriva bazirane na Si ali je njihova primena i dalje ograničena [17]. Razlog tome je visoka cena ovih đubriva, kao i niska efikasnost (biodostupnost Si) posebno u nekim tipovima zemljišta. Bolje razumevanje mehanizama delovanja Si u biljkama izloženim stresu, omogućiće napredak u razvijanju đubriva na bazi Si i promovisati njihovu širu upotrebu kao efikasnog sredstva za zaštitu biljaka od stresa.

LITERATURA

- Arnon DI, Stout PR. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol.* 1939;14(2):371.
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. Metalloproteins and metal sensing. *Nature.* 2009;460(7257):823–30.

3. Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press; 1995. (Special Publications of the Society for General Microbiology).
4. Epstein E. Silicon. *Annu Rev Plant Biol.* 1999;50(1):641–64.
5. Hodson MJ, White PJ, Mead A, Broadley MR. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Ann Bot.* 2005;96(6):1027–46.
6. Ma JF, Yamaji N. A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci.* 2015;20(7):435–42.
7. Sun H, Duan Y, Qi X, Zhang L, Huo H, Gong H. Isolation and functional characterization of CsLsi2, a cucumber silicon efflux transporter gene. *Ann Bot.* 2018;122(4):641–8.
8. Hall AD, Morison CGT. On the function of silica in the nutrition of cereals. Part I. *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character.* 1906;77(520):455–77.
9. Lewin J, Reimann BEF. Silicon and plant growth. *Annu Rev Plant Physiol.* 1969;20(1):289–304.
10. Winslow MD, Okada K, Correa-Victoria F. Silicon deficiency and the adaptation of tropical rice ecotypes. *Plant Soil.* 1997;188(2):239–48.
11. Meunier JD, Guntzer F, Kirman S, Keller C. Terrestrial plant-Si and environmental changes. *Mineral Mag.* 2008;72(1):263–7.
12. Frew A, Weston LA, Reynolds OL, Gurr GM. The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approach. *Ann Bot.* 2018;121(7):1265–73.
13. Ma JF. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci Plant Nutr.* 2004 Feb 1;50(1):11–8.
14. Pavlovic J, Samardzic J, Maksimović V, Timotijevic G, Stevic N, Laursen KH, et al. Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytol.* 2013;198(4):1096–107.
15. Nikolic DB, Nesic S, Bosnic D, Kostic L, Nikolic M, Samardzic JT. Silicon Alleviates Iron Deficiency in Barley by Enhancing Expression of Strategy II Genes and Metal Redistribution. *Front Plant Sci.* 2019;10:416.
16. Kostic L, Nikolic N, Bosnic D, Samardzic J, Nikolic M. Silicon increases phosphorus (P) uptake by wheat under low P acid soil conditions. *Plant Soil.* 2017;419(1–2).
17. Liang Y, Nikolic M, Bélanger R, Gong H, Song A. Silicon-mediated tolerance to metal toxicity. In: *Silicon in Agriculture.* Dordrecht: Springer; 2015. p. 83–122.
18. Kopittke PM, Blamey FPC, Asher CJ, Menzies NW. Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *J Exp Bot.* 2010;61(4):945–54.
19. Krämer U, Clemens S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification.* Berlin: Springer; 2005. p. 215–71.
20. Yruela I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol.* 2009;36(5):409–30.
21. Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, et al. Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31286–9.
22. Abdel-Ghany SE. Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta.* 2009 Mar;229(4):767–79.
23. Castresana J, Lübben M, Saraste M, Higgins DG. Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J.* 1994;13(11):2516–25.
24. Kliebenstein DJ, Monde R-A, Last RL. Superoxide Dismutase in *Arabidopsis*: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. *Plant Physiol.* 1998 Oct 21;118(2):637–50.
25. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 2002;53(372):1331–41.
26. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev.* 1996;96(7):2563–606.
27. Frei M. Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *Sci World J.* 2013;2013.
28. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC Press; 2001. 403 p.
29. Ryan BM, Kirby JK, Degryse F, Harris H, McLaughlin MJ, Scheiderich K. Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. *New Phytol.* 2013;199(2):367–78.
30. Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot M Lou. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature.* 1999;397(6721):694–7.
31. Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang H, et al. Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2012;24(2):738–61.
32. Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem.* 2002;277(29):26021–30.
33. Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcey E, Thiele DJ, Peñarrubia L. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15348–55.
34. Harrison MD, Jones CE, Dameron CT. Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *JBIC J Biol Inorg Chem.* 1999;4(2):145–53.
35. Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell.* 2005;17(4):1233–51.
36. Pich A, Scholz G. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J Exp Bot.* 1996;47(1):41–7.
37. Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, et al. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell.* 2003;15(6):1263–80.
38. Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot.* 2009;103(1):1–11.
39. Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2009;21(1):347–61.
40. Sunkar R, Zhu J-K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2004;16(8):2001–19.
41. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
42. Sunkar R, Li Y-F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* 2012;17(4):196–203.
43. Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell.* 2004;14(6):787–99.
44. Abdel-Ghany SE, Pilon M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):15932–45.
45. Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L. MicroRNA408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *Plant Cell.* 2014;26(12):4933–53.

46. Zhang H, Li L. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *A rabidopsis*. *Plant J.* 2013;74(1):98–109.
47. Cohu CM, Pilon M. Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiol Plant.* 2007;129(4):747–55.
48. Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2007;282(22):16369–78.
49. Schmidt W, Bartels M, Tittel J, Fühner C. Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytol.* 1997;135(4):659–66.
50. Michaud AM, Chappellaz C, Hinsinger P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant Soil.* 2008;310(1–2):151–65.
51. Ouzounidou G. Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environ Exp Bot.* 1994;34(2):165–72.
52. De Vos CHR, Schat H, Vooijs R, Ernst WHO. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J Plant Physiol.* 1989;135(2):164–9.
53. Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian L V, Taiz L. Early copper-induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol.* 1999;121(4):1375–82.
54. Van Assche F, Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 1990;13(3):195–206.
55. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* 2012;2012.
56. Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 2002;53(366):1–11.
57. Anjum NA, Hasanuzzaman M, Hossain MA, Thangavel P, Roychoudhury A, Gill SS, et al. Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants—an overview. *Front Plant Sci.* 2015;6:192.
58. Mijovilovich A, Leitenmaier B, Meyer-Klaucke W, Kroneck PMH, Götz B, Küpper H. Complexation and toxicity of copper in higher plants. II. Different mechanisms for copper versus cadmium detoxification in the copper-sensitive cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype). *Plant Physiol.* 2009;151(2):715–31.
59. Komárek M, Čádková E, Chrastný V, Bordas F, Bollinger J-C. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int.* 2010;36(1):138–51.
60. Bosnić D, Nikolić D, Timotijević G, Pavlović J, Vaculík M, Samardžić J, et al. Silicon alleviates copper (Cu) toxicity in cucumber by increased Cu-binding capacity. *Plant Soil.* 2019;441:629–41.
61. Kim Y-H, Khan AL, Kim D-H, Lee S-Y, Kim K-M, Waqas M, et al. Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones. *BMC Plant Biol.* 2014;14(1):13.
62. Collin B, Doelsch E, Keller C, Cazeveille P, Tellia M, Chaurand P, et al. Evidence of sulfur-bound reduced copper in bamboo exposed to high silicon and copper concentrations. *Environ Pollut.* 2014;187:22–30.
63. Li J, Leisner SM, Frantz J. Alleviation of copper toxicity in *Arabidopsis thaliana* by silicon addition to hydroponic solutions. *J Am Soc Hortic Sci.* 2008;133(5):670–7.
64. Bosnić D. Uloga silicijumove kiseline u modulaciji odgovora krastavca (*Cucumis sativus* L.) na oksidativni stres izazvan toksičnim koncentracijama bakra. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; 2020.
65. Mateos-Naranjo E, Gallé A, Florez-Sarasa I, Perdomo JA, Galmés J, Ribas-Carbó M, et al. Assessment of the role of silicon in the Cu-tolerance of the C4 grass *Spartina densiflora*. *J Plant Physiol.* 2015;178:74–83.
66. Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *J Exp Bot.* 2014;65(5):1259–70.
67. Ali S, Rizwan M, Ullah N, Bharwana SA, Waseem M, Farooq MA, et al. Physiological and biochemical mechanisms of silicon-induced copper stress tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Physiol Plant.* 2016;38(11):262.
68. Frantz JM, Khandekar S, Leisner S. Silicon differentially influences copper toxicity response in silicon-accumulator and non-accumulator species. *J Am Soc Hortic Sci.* 2011;136(5):329–38.
69. Flora C, Khandekar S, Boldt J, Leisner S. Silicon alleviates long-term copper toxicity and influences gene expression in *Nicotiana tabacum*. *J Plant Nutr.* 2019;42(8):864–78.
70. Oliva SR, Mingorance MD, Leidi EO. Effects of silicon on copper toxicity in *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera: a potential species to remediate contaminated soils. *J Environ Monit.* 2011;13(3):591–6.
71. Vaculík M, Landberg T, Greger M, Luxová M, Stoláriková M, Lux A. Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. *Ann Bot.* 2012;110(2):433–43.
72. Keller C, Rizwan M, Davidian J-C, Pokrovsky OS, Bovet N, Chaurand P, et al. Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 µM Cu. *Planta.* 2015;241(4):847–60.
73. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 1995;7(7):1085.
74. Ali MB, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek K-Y. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Sci.* 2006;171(1):147–54.
75. Kováčik J, Klejdus B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Rep.* 2008;27(3):605–15.
76. Wintz H, Fox T, Wu Y-Y, Feng V, Chen W, Chang H-S, et al. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem.* 2003;278(48):47644–53.
77. Bosnić D, Bosnić P, Nikolić D, Nikolić M, Samardžić J. Silicon and Iron Differently Alleviate Copper Toxicity in Cucumber Leaves. *Plants.* 2019;8(12).
78. Bityutskii N, Pavlovic J, Yakkonen K, Maksimović V, Nikolic M. Contrasting effect of silicon on iron, zinc and manganese status and accumulation of metal-mobilizing compounds in micronutrient-deficient cucumber. *Plant Physiol Biochem.* 2014;74:205–11.
79. Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant.* 2011;33(1):35–51.
80. Dragičić Maksimović J, Mojović M, Maksimović V, Römhild V, Nikolic M. Silicon ameliorates manganese toxicity in cucumber by decreasing hydroxyl radical accumulation in the leaf apoplast. *J Exp Bot.* 2012 Apr 1;63(7):2411–20.
81. Lin C-C, Chen L-M, Liu Z-H. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci.* 2005;168(3):855–61.
82. Gavnhold B, Larsen K. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol Plant.* 2002;116(3):273–80.
83. Baum JA, Chandlee JM, Scandalios JG. Purification and partial characterization of a genetically-defined superoxide dismutase (SOD-1) associated with maize chloroplasts. *Plant Physiol.* 1983;73(1):31–5.

84. Sagasti S, Bernal M, Sancho D, B. del Castillo M, Picorel R. Regulation of the chloroplastic copper chaperone (CCS) and cuprozinc superoxide dismutase (CSD2) by alternative splicing and copper excess in *Glycine max*. *Funct Plant Biol.* 2014 Jan;141(2):144–55.
85. Pilon M, Ravet K, Tapken W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2011 Aug 1;1807(8):989–98.
86. Khandekar S, Leisner S. Soluble silicon modulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes involved in copper stress. *J Plant Physiol.* 2011;168(7):699–705.
87. Zhou X-T, Wang F, Ma Y-P, Jia L-J, Liu N, Wang H-Y, et al. Ectopic expression of SsPETE2, a plastocyanin from *Suaeda salsa*, improves plant tolerance to oxidative stress. *Plant Sci.* 2018;268:1–10.
88. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran T V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science (80-).* 1999;284(5415):805–8.
89. Guo W-J, Meetam M, Goldsbrough PB. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol.* 2008;146(4):1697–706.
90. Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant Soil.* 2000;223(1):243–52.
91. Irtelli B, Petrucci WA, Navari-Izzo F. Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess. *J Exp Bot.* 2008;60(1):269–77.
92. Bhat JA, Shivaraj SM, Singh P, Navadagi DB, Tripathi DK, Dash PK, et al. Role of Silicon in Mitigation of Heavy Metal Stresses in Crop Plants. *Plants (Basel, Switzerland).* 2019 Mar 21;8(3):71.
93. Leng X, Wang P, Zhao P, Wang M, Cui L, Shangguan L, et al. Conservation of microRNA-mediated regulatory networks in response to copper stress in grapevine. *Plant Growth Regul.* 2017;82(2):293–304.

IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izдавач

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

Uređivački odbor

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

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 **Dušanka 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
200 primeraka

Autori

Anđelković Marina	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana	180
Djisalov Mila	21
Đorić Ilona	133
Gadjanski Ivana	21
Gašić Vladimir	113
Išić Denčić Tijana	96
Janjušević Ljiljana	21
Janković Miluš Jelena	133
Janković Radmila	96
Jovčić Branko	166
Keckarević Dušan	54
Keckarević Marković Milica	54
Kecmanović Miljana	54
Knežić Teodora	21
Kojadinović Milica	152
Kokanov Nikola	123
Komazec Jovana	84
Kosijer Petar	21
Kotur Nikola	6
Kožik Bojana	123
Krajnović Milena	123
Malešević Milka	166
Nikolić Dragana	180
Panić Marko	33
Perić Stojan	60
Pešović Jovan	60
Popović D. Željko	21
Radenković Lana	60
Rakićević Ljiljana	146
Rakočević-Stojanović Vidosava	60
Ristić Nina	96
Samardžić Jelena	180
Savić-Pavićević Dušanka	60
Šelemetjev Sonja	133
Skakić Anita	42
Spasovski Vesna	107
Stanković Biljana	6
Stojiljković Maja	42
Tošić Nataša	113
Ugrin Milena	84
Vreća Miša	107
Zukić Branka	6

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

TRENDovi u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Current Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929