

Broj 4 • septembar 2024. N° 4 • September 2024.



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

228
GODINA • YEARS

Prva uspešna vakcina
First successful vaccine



Beograd • Belgrade • 2024.
IMGGI • IMGGE

Razvoj iRNK vakcina: od eksperimentalnih početaka do Nobelove nagrade	8
mRNA Vaccines Development: From Experimental Beginnings to the Nobel Prize	
Ivana Lukić, Rajna Minić, Luka Dragačević, Veljko Blagojević, Marina Stamenković, Katarina Petković, Katarina Radojević, Milan Kojić, Marko Panić	
The influence of genetic variations on the late effects in childhood cancer survivors	22
Jelena Roganović	
Molecular characterization of CYP21A2 mutations and clinical findings in Macedonian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency – twenty years experience	31
Violeta Anastasovska, Mirjana Kocova	
Genetika autizma	44
Genetics of autism	
Nina Marić, Jelica Predojević Samardžić, Dragana Malčić Zanić	
Uticaj promotorskih varijanti gena za uridin-difosfat-glukuronoziltransferazu 1A1 na metabolizam bilirubina i značaj UGT1A1*28 varijante kao farmakogenetičkog markera	55
Influence of promoter variants of uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 gene on bilirubin metabolism and significance of UGT1A1*28 variant as pharmacogenetic markers	
Marija Vuković, Branka Zukić, Sonja Pavlović	
Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma i supresijom oksidativne fosforilacije	67
Antitumor effect of glycolysis inhibition in combination with lysosome permeabilization and oxidative phosphorylation suppression	
Milica Kosić, Verica Paunović, Ljubica Harhaji Trajković	
Učestalost genetičkih varijanti asociiranih sa celijačnom bolešću i laktosnom intolerancijom i promene u sastavu crevne mikrobiote kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	86
Frequency of genetic variants associated with celiac disease and lactose intolerance and changes in intestinal microbiota in children with neurodevelopmental disorders	
Katarina Bojović, Đurđica Ignjatović	
Primena farmakogenetičkih markera odgovora na terapiju vinkristinom, metotreksatom i tiopurinskim lekovima kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije	102
The Application of Pharmacogenetic Markers of The Response to Vincristine, Methotrexate and Thiopurine Therapies in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia	
Bojan Ristivojević, Branka Zukić	
Neograničeni potencijal CRISPR/Cas9 tehnologije u biljnim naukama i poljoprivredi: ilustracija kroz primer mutagenoze dva mala, visoko homologna biljna gena DSS1	122
The unlimited potential of CRISPR/Cas9 technology in plant sciences and agriculture: an illustration through the example of mutagenesis of two small, highly homologous plant DSS1 genes	
Ivana Nikolić, Jelena Samardžić, Mira Milisavljević, Gordana Timotijević	
Razotkrivanje mehanizama unosa piocina: perspektive za razvoj antibiotika	139
Decoding Pyocin Import Mechanisms: Insights for Antibiotic Development	
Iva Atanasković	
Uloga glukoze-6-fosfat translokaze u procesu aktivacije autofagije kod glikogenoze tip Ib	156
Role of the glucose-6-phosphate translocase in the activation of autophagy in glycogen storage disease type Ib	
Nikola Jocić, Anita Skakić	
Karakterizacija ekstracelularnih vezikula porijeklom iz tiroidnih ćelijskih linija i plazme bolesnika sa tiroidnim nodusima	164
Characterisation of extracellular vesicles originating from thyroid cell lines and plasma of patients with thyroid nodules	
Nevena Bobar, Jelena Janković Miljuš	
Novi trendovi u dijagnostici prirode nodusa štitaste žlezde	170
New trends in the diagnosis of the nature of thyroid nodules	
Vasilije Živaljević, Anastasija Panić i Sonja Zafirović	
Uticaj varijanti u genima DIO1 i DIO2 na funkciju tiroidne žlezde	178
Influence of DIO1 i DIO2 gene variants on thyroid gland function	
Aleksa Timotijević, Vladimir Gašić	

Predgovor

Razvoj je imperativ za opstanak. Tako Zbornik "Trendovi u molekularnoj biologiji 4" ove godine donosi novine u svoj sadržaj. Pored radova internacionalno priznatih stručnjaka iz pojedinih oblasti, tu su i prvi radovi mladih istraživača, Z-molekularaca. Mladi naučnici su prikazali teme svojih istraživanja koja su otpočeli kao studenti master studija. Tako ovaj Zbornik postaje bogatiji sa tendencijom da ima što aktuelnije i zanimljivije teme.

Ove godine je vodeći rad posvećen vakcinama baziranim na RNK, otkriću koje je nagrađeno Nobelovom nagradom prošle godine. Rad su napisali naši naučnici koji takođe razvijaju ovaj tip vakcine. Vakcine su dale neverovatno veliki doprinos zdravlju na svetskom nivou. Razvijaju se već 228 godina, i od tada su spasile milione života. Poslednji uspešni iskorak vakcina je napravljen razvojem „vakcina“ protiv kancera. Uzimajući u obzir da jedan od pet ljudi oboli od kancera u toku svog života, ovaj inovativni terapijski pristup će doneti revolucionarni napredak medicini 21. veka.

Na kraju, jedna moderna basna o razgovoru dva virusa.

Prvi: „Ma kako je moguće da smo još živi kad ljudi imaju vakcine da nas unište?“

Drugi: „Ćuti, dobro je! Imamo sreću da živimo u civilizaciji u kojoj je naučna istina stvar ličnog mišljenja.“

TMB4 stoji kao čvrsta odbrana naučne istine zasnovane na naučnim dokazima.

Sonja Pavlović

Izvodi iz recenzija

Četvrti broj *Trendova u molekularnoj biologiji* tradicionalno nastavlja predstavljanje aktuelnih i zanimljivih tema kojima su se bavili mladi istraživači iz Srbije u svojim doktorskim disertacijama, kao i otkrića u molekularnoj biologiji koja su obeležila protekle godine. Pored toga, ovaj broj donosi i dve veoma značajne novine. Prva se odnosi na predstavljanje aktuelnih tema kojima se bave istraživači iz regiona, što govori o ugledu i inspirativnom uticaju ovog tematskog zbornika i doprinosu naučnoj saradnji i na širem planu. Druga novina je predstavljanje istraživanja mladih molekularnih biologa generacije Z, što je posebno značajno sa aspekta popularizacije ove nauke i podrške i podstreka mladim naraštajima molekularnih biologa u Srbiji.

Ovaj broj posvećen je vakcinama i posebno vakcinama baziranim na iRNK, za čije otkriće i razvoj je dodeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu za 2023. godinu. Među radovima istraživača iz Srbije i regiona dominiraju biomedicinske teme, vezane za molekularnu osnovu i dijagnostiku bolesti, a jedan rad posvećen je istraživanjima vezanim za razvoj i primenu piocina kao jedne nove potentne grupe antibiotika. Rad posvećen mogućnostima primene mutagenaze bazirane na CRISPR/Cas9 tehnologiji u poljoprivredi i funkcionalnoj karakterizaciji gena biljaka u potpunosti osvetljava i približava čitaocu ovu moćnu tehniku.

4 *Trendovi u molekularnoj biologiji 4* – aktuelno, zanimljivo, inspirativno.

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

Pred nama je četvrti broj *Trendova u molekularnoj biologiji*. Bliži se Sajam knjiga 2024, i svi očekujemo nove tekstove iz oblasti molekularne biologije koji su obeležili proteklu godinu, a koji će biti objavljeni u Zborniku radova TMB4 i promovisani na ovoj značajnoj kulturnoj manifestaciji. Ove godine je akcenat stavljen na značaj vakcina za zdravlje ljudi širom sveta. Odluka Uredništva da tu temu istakne je sama po sebi značajna. Pored toga, kao i svake godine, većina radova je posvećena istraživanjima naučnika u Srbiji iz oblasti biomedicine. Radovi autora iz zemalja iz našeg regiona su takođe posvećeni medicini. Tu su i tekstovi najmlađih istraživača, opet iz oblasti biomedicinskih nauka.

Zbornik TMB unapređuje i razvija svoju koncepciju i postaje sve zanimljivije štivo ne samo za medicinsku naučnu zajednicu, već i za lekare koji u svojoj praksi svakodnevno koriste saznanja iz molekularne biologije i tako unapređuju kliničku praksu. Zbornik TMB doprinosi da naša medicina usvoji najnovije trendove u dijagnostici i lečenju za dobrobit pacijenata u našoj zemlji.

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

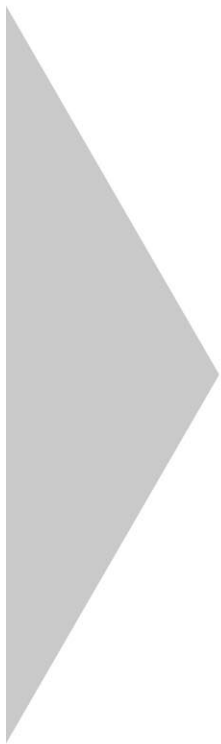
Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 4“ sadrži prikaze nekih od najznačajnijih tema u molekularnoj biologiji koje su obeležile prethodnu godinu. U uvodnom delu je istaknut značaj vakcina i uz podsećanje da je prošlo 228 godina od prve vakcine, posebno je prikazan razvoj tehnologije u ovoj oblasti koja je bazirana na iRNK, i to specifično vakcine protiv COVID-19, za šta je dodeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu u 2023. godini.

Po već uspostavljenom pristupu u prethodne tri godine, u Zborniku su prikazane aktuelnosti iz oblasti biomedicine. Ove godine su radovi sa fokusom na kancer, neurorazvojne poremećaje, autizam, kao i na istraživanja i primenu brojnih dijagnostičkih i farmakogenetičkih markera za različita patološka stanja. Važno je istaći da su u ovom delu, osim istraživača iz Srbije, ove godine učestvovali i kolege sa univerziteta i kliničkih centara iz regiona - iz Hrvatske, Crne Gore, Severne Makedonije i Bosne i Hercegovine. Zbornik tako osim edukativnog značaja ima i veliki potencijal da obezbedi povezivanje istraživača i uspostavljanje novih naučnih saradnji u regionu.

U realizaciji Zbornika su takođe učestvovali i istraživači iz oblasti molekularne biologije biljaka i molekularne biologije prokariota. Kao i do sada, značajan je doprinos mladih doktora nauka sa naučnih instituta (5) i fakulteta (2) iz Srbije, a on se ogleda u revijskim radovima proizašlim iz njihovih doktorskih disertacija odbranih u prethodnoj godini. Međutim, treba ukazati na novitet ovogodišnjeg Zbornika u odnosu na prethodne - i mlađe kolege, iz tzv. Generacije Z, dale su svoj doprinos objavljivanjem rezultata proisteklih iz odbranih master radova.

Sve navedeno ističe značaj ovog Tematskog zbornika. Posebno ohrabruje to što se u prikazivanju istraživanja koja se realizuju u našoj zemlji iz oblasti molekularne biologije, a koja su aktuelna u svetu, održava kontinuitet uz uključivanje i najmlađih istraživača.

**Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu**



**NOBELOVA NAGRADA ZA FIZIOLOGIJU
ILI MEDICINU 2023:
Vakcine bazirane na iRNK**

**THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY
OR MEDICINE 2023:
mRNA Vaccines**



Razvoj iRNK vakcina: od eksperimentalnih početaka do Nobelove nagrade

Ivana Lukić¹, Rajna Minić¹, Luka Dragačević¹, Veljko Blagojević¹, Marina Stamenković², Katarina Petković¹, Katarina Radojević¹, Milan Kojić, Marko Panić¹

¹ Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd, Srbija

² Medicinski fakultet – Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Kontakt: mpanic@torlak.rs

Apstrakt

Razvoj vakcina ima bogatu istoriju koja je obeležena revolucionarnim iskoracima i razvojem tehnologija koje su značajno uticale na javno zdravlje. Ovaj rad prikazuje istorijski razvoj vakcina, sa posebnim fokusom na nastanak i razvoj iRNK vakcina. Počevši od ranih inovacija u oblasti vakcina, rad pruža sveobuhvatan pregled kako je iRNK tehnologija unela revoluciju ovu oblast. Razmatra se jedinstveni aspekt imunološkog odgovora koji izazivaju iRNK vakcine, ističući njihovu sposobnost da proizvedu snažan i ciljan imunitet protiv patogena. Takođe, rad analizira proces proizvodnje iRNK vakcina, objašnjavajući korake od dizajna plazmida preko sinteze iRNK do enkapsulacije u lipidne nanopartikule. Diskusija uključuje analizu izazova tokom faza razvoja i kako su ti izazovi prevaziđeni. Praćenjem evolucije različitih tehnologija vakcina i naglašavanjem napretka koji su donele iRNK vakcine, ovaj rad naglašava njihov transformativni potencijal u prevenciji infektivnih i tretmanu malignih bolesti.

Ključne reči: **iRNK, vakcina, imunitet, prevencija bolesti, javno zdravlje**

mRNA Vaccines Development: From Experimental Beginnings to the Nobel Prize

Ivana Lukić¹, Rajna Minić¹, Luka Dragačević¹, Veljko Blagojević¹, Marina Stamenković², Katarina Petković¹, Katarina Radojević¹, Milan Kojić¹, Marko Panić¹

¹ Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak" Belgrade, Serbia

² Faculty of Medicine – University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: mpanic@torlak.rs

Abstract

The development of vaccines has a rich history marked by groundbreaking innovations and evolving technologies that have significantly improved public health. This paper explores the historical progression of vaccines, with a particular focus on the emergence and development of mRNA vaccines. Starting from early vaccine innovations, the study provides a comprehensive overview of how mRNA technology has revolutionized the field. It delves into the unique aspects of the immune response elicited by mRNA vaccines, highlighting their ability to produce robust and targeted immunity against pathogens. Additionally, the paper examines the production process of mRNA vaccines, from plasmid design and the synthesis of mRNA strands to their encapsulation in lipid nanoparticles. The discussion includes an analysis of the challenges faced during the development phases and how these have been addressed. By tracing the evolution of vaccine technology and emphasizing the advancements brought by mRNA vaccines, this paper underscores their transformative potential in preventing infectious diseases and treating various conditions. The findings suggest that mRNA vaccines represent a pivotal shift in vaccine development, offering new avenues for future research and application in both infectious diseases and personalized medicine.

Keywords: **mRNA, vaccine, immunity, disease prevention, public health**

Uvod

Uspeh vakcinacije i pronalazak vakcina smatra se jednim od najznačajnijih civilizacijskih dostignuća (1). Vakcinacija je duboko transformisala javno zdravlje značajno smanjujući stope smrtnosti i morbiditeta od infektivnih bolesti (2,3). Opsežne epidemiološke studije pokazuju da su globalni naponi koji se kontinuirano ulažu u programe imunizacije u poslednjih 50 godina spasili oko 154 miliona života, od čega 101 milion beba (4). Od tada do danas ustanovljene su brojne inicijative koje imaju za cilj globalno povećanje dostupnosti vakcina, razvoj novih tehnologija za proizvodnju, smanjenje učestlosti i eradikaciju zaraznih bolesti. Zahvaljujući vakcinaciji u svetu je proglašena eradikacija velikih boginja 1980. godine, dok je incidencija poliomijelitisa koja je 40-tih i 50-ih godina prošlog veka bio vodeći uzrok smrti, pogotovo kod dece, drastično smanjen (4).

Pandemija COVID19 je dodatno ukazala na veliki značaj vakcina u borbi protiv zaraznih bolesti. Zanimljivo je da su u borbi protiv SARS-CoV2 razvijene mnogobrojne vakcine korišćenjem različitih tehnologija – od tradicionalnih inaktivisanih virusa (Sinopharm), preko genetičkih vakcina sa virusima kao nosačima (AstraZeneca i SputnikV) do najnovije tehnologije iRNK vakcina (Pfizer BioNTech i Moderna). U ovom radu ćemo pokriti istorijat razvoja vakcina sa fokusom na razvoju iRNK vakcina kao i mehanizam delovanja iRNK vakcina. Takođe ćemo, gde je moguće, ukazati na različite prednosti i potencijalne nedostatke različitih tehnologija proizvodnje vakcina i osvrnućemo se na pravce istraživanja i usavršavanja vakcina u budućnosti.

Istorija i razvoj vakcina

Zarazne bolesti predstavljaju veliki izazov sa kojim se čovečanstvo suočava od svojih samih početaka. Hipokrat je opisao zauške, difteriju, epidemiju žuticu (hepatitis A) još 400 godina pre nove ere kao pretnju po ljudsko zdravlje. Vekovima je istican značaj zaštite od zaraznih bolesti i istraživale su se prakse i metode koje imaju zaštitno delovanje na stanovništvo. U srednjem veku opisana je praksa namernih izlaganja zdravih pojedinaca virusu velikih boginja sa ciljem postizanja kolektivnog imuniteta i sprečavanja širenja zaraze, neki izvori sugerišu da su se ove prakse primenjivane još 200. godine pre nove ere. Drevne civilizacije beleže otpornost na velike boginje kod dece nakon inhalacije praha poreklom od sprasjenih krasta pacijenata koji su preležali bolest (5). Ipak, treba imati na umu da iako su ove prakse izlaganja patogenu često postizale željeni efekat tj. otpornost na bolest, često su i dovodile do samog oboljenja, a nekad i do smrti, upravo zato što su se tretirani ljudi dovodili u kontakt sa živim patogenom. Otkriće Edvarda Dženera (eng. Edward Jenner) 1796. godine da se otpornost na velike boginje postiže i izlaganjem relativno bezopasnom patogenu – kravljim boginjama, predstavlja početak razvoja procesa koji je Džener nazvao "vakcinacija" (od latinske reči za kravu - vacca) a vakcinom je nazvao tečnost iz rana kojom je izlagao pacijente. Naime, Džener je primetio da tretiranjem dece i odraslih gnojem iz rana krava koje boluju od kravljih boginja postiže otpornost na velike boginje. Ove godine se obeležava 228 godina od Dženerove vakcine protiv velikih boginja a viševjekovni naponi su rezultovali progresivnim razvojem vakcina u 20. veku.

Iako je ovaj tip vakcinacije tj. inokulacija bila već široko primenjivana, sve do kraja 19. veka nije bilo poznato šta je zapravo uzrok zaraznih bolesti a samim tim nije bio moguć uvid u mehanizam delovanja vakcinacije. Sredinom 19. veka postaje jasno da su mikroorganizmi uzročnici zaraznih bolesti i to saznanje otvara vrata razvoju moderne nauke o vakcinama kao i masovnoj proizvodnji vakcina protiv brojnih zaraznih bolesti uključujući besnilo (Luj Paster 1885), difterija (1914), tetanus (1927) i poliomijelitis (1955) (6).

Od prvih početaka do danas, razvijene su mnogobrojne vakcine koje omogućavaju razvijanje stečenog imuniteta na brojne zarazne, ali i maligne bolesti. Ukoliko govorimo o podeli vakcina prema generacijama, prva generacija podrazumeva vakcine napravljene od atenuiranih ili inaktivisanih patogena. Druga generacija vakcina su proizvodi koji se sastoje iz proteinske i/ili subjedinica patogena, a treća generacija obuhvata tzv. genske vakcine tj. vakcine koje su bazirane na principu unosa nukleinskih kiselina (DNK ili RNK) u same ćelije. Sve vakcine deluju tako što stimulišu imunski sistem kako bi vakcinisane osobe bile zaštićene od mikroorganizma izazivača bolesti. Ali treba uočiti značajnu razliku u kontekstu antigena kod prve dve generacije vakcina u odnosu na treću. Naime, antigen se kod prve dve generacije proizvodi eksterno dok se u slučaju treće generacije genskih vakcina antigen proizvodi u samim ćelijama osobe koja se vakciniše (prema instrukcijama iz nukleinskih kiselina) (7).

Imunski odgovor na vakcine

Vakcinacija predstavlja oblik veštačke aktivne imunizacije, koji se ostvaruje izlaganjem pojedinca oslabljenom ili inaktivisanom patogenu, njegovom specifičnom delu ili produktu, poznatom kao antigen. Ovi antigeni su dizajnirani tako da pokrenu imunski odgovor bez izazivanja bolesti, čime se indukuje zaštitni imunitet i stvara dugotrajna imunološka memorija (7).

Osnovni mehanizam delovanja vakcina podrazumeva pokretanje bezbednog imunskog odgovora kroz aktivaciju ćelija imunskog sistema i produkciju zaštitnih antitela. Sposobnost vakcina da uspešno pokrenu adekvatan imunski odgovor i na taj način obezbede zaštitu od infekcije i/ili bolesti nakon izlaganja određenom patogenu naziva se imunogenost (8). Na imunogenost vakcina utiču brojni faktori među kojima su tip vakcine, prisustvo adjuvanasa u njihovim formulacijama, način primene vakcine kao i genetski faktori primaoca. Poznato je da žive atenuisane vakcine poput MMR vakcine (morbili, zauške, rubela) pokreću najsnažniji imunski odgovor uzevši u obzir da se imunizacija sprovodi živim ali oslabljenim patogenima čime se imitira prirodna infekcija (9,10). Sa druge strane, vakcine koje podrazumevaju primenu samo delova patogena poput subjediničnih vakcina (npr. vakcina protiv hepatitisa B), vrlo često u svojoj formulaciji sadrže i adjuvans – supstancu koja poboljšava prezentaciju antigena i pojačava imunogenost same vakcine (11). Interesantno je, da je i za lipidne nanočestice (*eng.* lipid nanoparticle LNP) koje se kod RNK vakcina koriste kao nosači i omogućavaju dopremanje nukleinske kiseline u ćeliju primaoca, takođe pokazano da imaju adjuvantna svojstva (12). Način primene vakcina takođe značajno utiče na sposobnost aktivacije imunskog odgovora, pri čemu se intramuskularna primena smatra najpraktičnijom zbog uspostavljenog balansa između visoke imunogenosti i bezbednosti primene, što je ujedno čini i najpoželjnijim izborom za većinu standardnih vakcina. Naravno, i drugi načini primene vakcina imaju svoje prednosti poput oralne ili intranazalne primene (npr. vakcine protiv rotavirusa ili gripa) kojima se na najbolji način imitira prirodan put infekcije i omogućava nastanak mukoznih antitela (IgA) sa sposobnošću neutralizacije patogena na samom mestu njihovog prodora, što direktno sprečava nastanak infekcije (13).

Imunski odgovor na većinu vakcinalnih antigena ostvaruje se kroz saradnju između komponenti urođene i adaptivne imunosti. U zavisnosti od svoje prirode ovi antigeni mogu da pokrenu T-zavisni ili T-nezavisni imunski odgovor. T-zavisni imunski odgovor pokreću prvenstveno proteinski antigeni koje nakon primene vakcine preuzimaju lokalne dendritske ćelije (glavne antigen-prezentujuće ćelije) i potom ih nose do regionalnih limfnih čvorova gde ih u sklopu MHC molekula prikazuju naivnim T-limfocitima. Na ovaj način aktivirani T-limfociti imaju mogućnost da se diferenciraju u efektorske i memorijske pomoćničke (CD4+) i citotoksične (CD8+) T-ćelije, kao i da ostvare kontakt sa B-limfocitima. Kooperacija između T- i B-limfocita nalazi se u osnovi T-zavisnog imunskog odgovora i odgovorna je za nastanak dugoživećih plazma ćelija koje proizvode visokoafinitetna antitela kao i memorijskih B-ćelija. U kontekstu zaštite, krajnji cilj imunizacije je aktivacija stečenog imunskog odgovora i stvaranje imunološke memorije kroz diferencijaciju naivnih u memorijske T- i B-limfocite i dugoživeće plazma ćelije. Na ovaj način obezbeđuje se brži jači i efikasniji imunski odgovor prilikom ponovnog izlaganja istom patogenu (sekundarni imunski odgovor). Većina modernih vakcina prvenstveno pokreće T-zavisni humoralni imunski odgovor, što rezultira stvaranjem visokoafinitetnih antitela promenjenog izotipa (najčešće IgG1 i IgG3) koja mogu da neutrališu patogene ili da aktiviraju efektorske mehanizme imunskog sistema, kao što su opsonizacija i aktivacija sistema komplementa. Određene vakcine sposobne su da pokrenu i jak odgovor citotoksičnih CD8+ T-limfocita kao što je to slučaj kod živih virusnih vakcina. Sa druge strane, vakcine koje sadrže neproteinske antigene poput polisaharidnih, karakteristične su po tome da pokreću T-nezavisni imunski odgovor koji se odigrava bez učesća i pomoći T-limfocita. U T-nezavisnom odgovoru veliki polisaharidni antigeni vezuju se unakrsno za veći broj receptora na naivnim B-limfocitima i na taj način dovode do njihove aktivacije i nastanka kratkoživećih B-ćelija uz odsustvo promene izotipa, sazrevanja afiniteta i nastanka memorijskih ćelija. U ovom odgovoru prvenstveno se proizvode niskoafinitetna antitela IgM ili IgG2 izotipa (1). Imunski odgovor na vakcine zasnovane na primeni informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) najbolje je proučen kod vakcina odobrenih za prevenciju COVID-19. Nakon primene, iRNK se preuzima procesom endocitoze od strane antigen prezentujućih ćelija (dendritskih ćelija, makrofaga i B-limfocita). Endocitoza i oslobađanje u ćeliju je olakšano primenom lipidnih nanočestica koje se koriste kao nosači iRNK i ujedno štite ovaj lako razgradiv molekul. Nakon translacije antigena (S protein ili RBD) i njihove obrade u proteazomima, nastali

peptidi biće prezentovani u sklopu molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti I i II klase na površini ćelija. Na ovaj način pokreće se snažan odgovor CD8+T ćelija, sa uravnoteženim CD4+ Th1/Th2 odgovorom što dovodi do proizvodnje inflamatornih citokina i naknadne indukcije humoralnog imunskog odgovora sa visokim nivoima specifičnih IgG i neutrališućih antitela (14).

Razvoj iRNK vakcina

Iako su široj javnosti poznate tek od COVID19 pandemije, razvoj iRNK vakcina traje već duže od 30 godina sa ciljem dobijanja bezbedne vakcine koja može brzo da se razvije i proizvodi. Sam koncept iRNK vakcina ima mnoge prednosti u odnosu na konvencionalne, ali i DNK vakcine. Ukoliko se porede sa ostalim tehnologijama proizvodnje vakcina, najveća razlika jeste što iRNK vakcine mogu da se proizvedu u potpunosti *in vitro*. Samim tim nema potrebe za bilo kojom vrstom kulture ćelija ili mikroorganizama i kao ni za velikim fermentorima i bio-reaktorima. Poređenja radi, za potrebe proizvodnje milion doza konvencionalne (npr. bakteriološke ili virusne) vakcine je često potrebno i do nekoliko meseci (uz potrebu za fermentorom od minimum 50L). Ista ta količina doza iRNK vakcine može da se proizvede u reaktoru od 5L u roku od par nedelja (15). Takođe, proizvodnja iRNK vakcina je standardizovana tj. ista ili slična procedura može da se primenjuje nezavisno od toga da li se proizvodi iRNK vakcina protiv SARS-CoV2 ili RSV (respiratory syncytial virus) ili protiv specifičnog malignog oboljenja. To svakako nije slučaj u kontekstu konvencionalnih vakcina, tj. svaka pojedinačna vakcina zahteva specifičan proizvodni proces koji često zahtevan u smislu optimizacije za veće prinose. Ipak, postojali su i određeni nedostaci iRNK vakcina koje je bilo neophodno rešiti da bi ovaj tip vakcina mogao široko da se primenjuje.

Počeci razvoja iRNK kao terapeutika počinju 1989. godine kada su objavljeni prvi dokazi da *in vitro* transkribovana RNK može da dostavi informaciju za proizvodnju proteina u okviru ćelija u kulturi ali i organizmu (slika 1) (16,17). Ovi eksperimenti su pokazali da iRNK ima dovoljnu stabilnost da se koristi *in vivo* (uprkos prisutnom skepticizmu u to vreme) i počinje da se javlja ideja da se iRNK koristi kao nosilac informacije kao bezbednija alternativa u odnosu na plazmidnu DNK (pDNK), iako je DNK značajno stabilnija. RNK kao takva ima prednost u odnosu na DNK prvenstveno zato što ne može da se integriše u genom domaćina, ali i u kontekstu dostave je dovoljno da se dostavi u citoplazmu i nema potrebe za dostavom u nukleus. Na početku razvoja ove tehnologije se fokusiralo na korišćenje iRNK za tranzijentnu ekspresiju nedostajućih ili neispravnih proteina. Ali početkom 1990-ih je predloženo da iRNK može da se koristi za dostavu informacije o antigenu. Kao dokaz koncepta za ovu ideju pokazano je da iRNK može specifično da aktivira ćelijski imuni odgovor (konkretno citotoksične T-limfocite), ali i humoralni imuni odgovor (18,19). Ukoliko imamo na umu inicijalne eksperimente u vezi sa korišćenjem iRNK kao izvora antigena, čitalac bi lako došao do zaključka da je odmah trebalo da bude očigledno da iRNK ima veliki potencijal u kontekstu proizvodnje vakcina. Ali postojao je tehnički nedostatak koji je sprečavao širu primenu iRNK. Naime, od ranije je poznato da "strane" tj. eksterno ubačene nukleinske kiseline (uključujući iRNK) aktiviraju imuni sistem i izazivaju veliku proizvodnju interferona (naročito IFN- α i IFN- β) što svakako nije poželjno u kontekstu korišćenja iRNK u svakodnevnoj praksi. Iako je ova činjenica poznata još od 1960-ih (slika 1) (20), ćelijski i molekularni mehanizam je opisan tek početkom 2000-ih. Naime, ustanovljeno je da egzogena iRNK aktivira dendritske ćelije, koje prepoznaju jednolančanu nemođifikovanu iRNK kao "stranu" preko TLR7 i TLR8 (toll-like receptor) koji se nalaze u endozomima, dok dvolančanu iRNK (koja je u suštini artefakt *in vitro* transkripcije) prepoznaju preko TLR-3 (21–23). Nakon dešifrovanja molekularnog mehanizma postaje jasno da ukoliko se pronađe način da se "zaobiđe" aktivacija TLR -3, -7 i -8, postoji mogućnost da se omogući šira upotreba iRNK u kliničkoj praksi. Prvo je zapravo ustanovljeno da dendritske ćelije gajene *ex vivo* reaguju aktiviranjem jakog citokinskog odgovora na iRNK iz bakterija i *in vitro* transkribovanu iRNK, dok pokazuju toleranciju na iRNK izolovanu iz sisarskih ćelija. Ustanovljeno je da endogene RNK imaju modifikacije (kao što su metilovani nukleozidi i pseudouridin) i da RNK sa koje odsustvuju te modifikacije dendritska ćelija prepoznaje kao „stranu“ i aktivira citokinski odgovor. Stoga je predloženo da *in vitro* transkribovana iRNK u kojoj je uridin substituisan sa pseudouridinom može da se koristi za izbegavanje jakog imunog odgovora domaćina i samim tim da može da se koristi u kliničkoj praksi (24). Osim što se inkorporacijom modifikovanih nukleozida izbegava citokinski odgovor, pokazano je da iRNK sa modifikovanim nukleozidima imaju značajno veći translatorni kapacitet jer mogu da izbegnu ćelijske puteve za degradaciju strane tj. viralne

RNK. Značaj modifikacije nukleozida se najbolje ilustruje u studiji gde je poređen nivo ekspresije eritropoetina kao markera od *in vitro* transkribovane standardne iRNK u odnosu na iRNK sa modifikovanim nukleozidima. Naime, pokazano je da standardna RNK samo uzrokuje značajnu aktivaciju citokinskog odgovora, dok ne povećava značajno nivo eritropoetina dok modifikovana iRNK povećava nivo eritropoetina 5 puta a ne uzrokuje neželjenu aktivaciju imunog odgovora (25). Osim korišćenja modifikovanih nukleotida, vremenom su ustanovljene brojne metode kako može da se poveća translacija sa IVT iRNK *in vivo*. Pokazano je da korišćenje netranslatirajuće sekvence (5'-UTR ali i 3'-UTR) od prirodno dugoživećih RNK molekula može da se produži stabilnost same iRNK u citoplazmi ćelija (26,27). U poslednje vreme u fokusu istraživanja je potencijal korišćenja samo-replikujuće iRNK koja je izvedena od RNK sekvence alfavirusa (koja prirodno ima mogućnost samoreplikacije). Korišćenjem samo-replikujuće iRNK pokazano je da se dobija i do 10 puta veća ekspresija proteina koja se održava u dužem vremenskom periodu (i do 10 dana) u odnosu na iRNK koja nema mogućnost samo-replikacije (28,29). Ipak, i dalje se smatra da je najveći naučni i tehnološki iskorak u kontekstu primene iRNK vakcina u široj kliničkoj praksi bilo rešenje da se koriste modifikovani nukleotidi da bi se izbegao preterani imuni odgovor. Zbog ovog otkrića, naročito u kontekstu COVID19 pandemije, dodeljena je Nobelova nagrada za medicinu 2020. godine Katalin Kariko i Dru Vajsmanu (slika 1) (Katalin Karikó, Drew Weissman).

Proizvodnja iRNK vakcina

Jedna od ključnih prednosti iRNK vakcina je njihova brzina i fleksibilnost proizvodnje. Dok tradicionalne vakcine mogu zahtevati godine za razvoj i proizvodnju, tehnologija proizvodnje iRNK vakcina omogućava brzu i efikasnu proizvodnju u znatno kraćem vremenskom periodu. Pored toga, modularna priroda iRNK tehnologije omogućava brzo prilagođavanje na nove varijante patogena, uz korišćenje istih proizvodnih pogona, opreme i reagenasa što je posebno značajno u pandemijskim situacijama (30,31).

Tehnologija proizvodnje iRNK vakcina je višefazni proces koji uključuje nekoliko ključnih koraka (slika 2):

a) Dizajn i proizvodnju plazmidne DNK

Precizan dizajn plazmidne DNK (pDNK) doprinosi optimizaciji ekspresije gena i efikasnosti procesa proizvodnje iRNK vakcina. Stoga je prvi korak identifikacija antigena ili epitopa koji mogu da indukuju odgovarajući imunološki odgovor upotrebom različitih metoda, kao što su genomika, proteomika i bioinformatika. Nakon identifikacije, kodirajuća sekvenca se klonira u odgovarajući klonirajući vektor – plazmid, koji se transformiše odgovarajuća bakterija za umnožavanje. Nakon umnožavanja vrši se selektovanje i prečišćavanje željene pDNK hromatografijom ili precipitacijom, dok se sekvenciranjem pDNK potvrđuje tačnost i kvalitet (32–34).

b) Linearizacija prečišćenih plazmida i *in vitro* transkripcija

Prečišćena i okarakterisana pDNA se dejstvom restrikcionih enzima linearizuje na 3' kraju iza niza uzastopnih adenina (poliA rep) i u daljim koracima koristi kao matrica za sintezu iRNK molekula. Za sintezu iRNK molekula osim pDNK, u enzimskoj reakciji *in vitro* transkripcije (IVT) koriste se iRNK polimeraze (kao što su T7, SP6 ili T3), nukleotidi, kofaktor MgCl₂, pufer sa poliaminima i antioksidanti. Pored toga, proces sinteze može uključivati modifikovane ribonukleotide kako bi se smanjila njihova prirodna imunogenost. Najčešće se koriste N1-metil pseudouridin (m1Ψ), 5-metilcitridin ili 5-metiluridine (35,36).

U cilju poboljšavanja stabilnosti iRNK, povećanja efikasnosti translacije i smanjenja imunogenosti, molekuli iRNK nakon IVT se obrađuju tako da sadrže osnovne komponente: strukturu kape (eng. cap structure) na 5' kraju, 5' i 3' netranslatirane regije (eng. untranslated regions – UTRs), otvoreni okvir čitanja (eng. open reading frame – ORF) i 3' poli(A) rep (33).

c) Prečišćavanje

Potreba za prečišćavanjem iRNK nakon svake specifične reakcije zavisi od prirode reakcije, zahteva kvaliteta iRNK i namene.

Nakon svake reakcije sintezue i obrade u reakcionoj smeši se mogu naći različiti kontaminanti poput preostale DNK, kraćih ribonukleotidnih sekvenci, nukleotida, proteina i drugih komponenti reakcije, a koji

mogu uticati na kvalitet i integritet iRNK molekula. Stoga, u proizvodnji iRNK vakcina, a u skladu sa zahtevima regulative i važećih standarda, iRNK koja se proizvodi mora proći kroz više faza prečišćavanja. Izbor metode prečišćavanja u procesu proizvodnje iRNK vakcine zavisi od različitih faktora, uključujući željeni nivo čistoće, skalabilnost i isplativost. Protokoli prečišćavanja najčešće obuhvataju metode prečišćavanja na bazi hromatografija (jonoizmenivačka, afinitetna hromatografija, hromatografija visokih performansi i druge), tangencijalnom protočnom filtracijom, fenol-hloroformska ekstrakcija ili prečišćavanje pomoću magnetskih kuglica. Pokazano je da kombinacija precipitacije sa tangencijalnom protočnom filtracijom i hromatografijom pokazuje značajno poboljšanje efikasnosti i može doprineti smanjenju troškova (33,37).

d) Formulacija i završna obrada

S obzirom da je iRNK inherentno nestabilna u vanćelijskom okruženju, korak formulacije je ključan za zaštitu iRNK molekula od degradacije i efikasnu dostavu do ciljnih ćelija. Za sada, lipidne nanočestice (LNP) i polimerne nanočestice su dva najčešće korišćena nosača iRNK vakcina (38).

Lipidne formulacije za enkapsulaciju iRNK vakcina najčešće sadrže katjonske lipide koji poseduju pozitivno naelektrisane grupe koje pomažu u stvaranju kompleksa sa negativno naelektrisanom iRNK i olakšavaju njen ulazak u ćeliju; holesterol koji pomaže u stabilizaciji lipidne membrane i poboljšava integritet nanočestica; polietilen glikol (PEG) lipidi poboljšavaju farmakokinetiku, poboljšavaju biokompatibilnost i smanjuju citotoksičnost čime doprinose smanjenju imunog odgovora protiv lipidnih nanočestica. PEG lipidi sa drugim neutralnim lipidima pomažu u formiranju stabilnijih nanočestica

Polimerne nanočestice kao što su polipleksi nude alternativu lipidnim nanočesticama za enkapsulaciju iRNK i imaju svoje prednosti u pogledu stabilnosti. Polipleksi (npr. poli(laktid-ko-glikolid) – PLGA ili poli(etilenim amin) – PEI) su katjonski polimeri koji vezuju molekule iRNK i pomažu u stabilizaciji iRNK čime omogućavaju njen ulazak u ciljne ćelije (38).

Osim navedenih, za formulaciju iRNK vakcina se mogu koristiti i neorganske nanopartikule (silikonske nanopartikule, zlatne nanopartikule), virus-like partikule (VLPs), micelle i dr.

Nakon procesa formulacije iRNK vakcina sledi korak prečišćavanja odnosno uklanjanja prisutnih nečistoće kao što su lipidi, polimeri, ili ostaci drugih reagensa i korak zamene pufera kako bi se osigurala stabilnost iRNK tokom formulacije i kako bi se pripremila za sterilnu filtraciju, punjenje, pakovanje i skladištenje.

e) Kontrola kvaliteta

Proizvodnja iRNK vakcina mora se pridržavati strogih regulatornih standarda i smernica (kao što su one koje postavlja FDA, EMA i druge regulatorne agencije) kako bi se obezbedilo da je proizvod bezbedan za upotrebu. Stoga, svaki korak mora biti strogo kontrolisan i dokumentovan kako bi se osigurala bezbednost, efikasnost i konzistentnost kvaliteta iRNK vakcina. Najčešći testovi kontrole kvaliteta iRNK vakcina uključuju ispitivanje čistoće (potvrda odsustva kontaminanata poput rezidualne DNK, proteina ili endotoksina), analizu integriteta iRNK molekula i odsustvo dodatnih ili degradacionih proizvoda (39); testiranje potence kako bi se potvrdila sposobnost vakcine da izazove željeni imunološki odgovor; testiranje sterilnosti odnosno odsustva mikrobiološke kontaminacije, analiza veličine i distribucije čestica za LNP-formulisane vakcine kako bi se osigurala konzistentnost (31).

Iako su razvijene različite platforme iRNK vakcina, i dalje je u toku optimizacija procesa proizvodnje, formulacije i razvoja iRNK vakcina sa različitim specifičnostima. Navedena optimizacija uključuje precizno prilagođavanje svih aspekata procesa proizvodnje kako bi se postigla maksimalna efikasnost, stabilnost, i sigurnost vakcine, dok se istovremeno zadovoljavaju svi regulatorni i klinički standardi. To uključuje optimizaciju reakcijskih uslova, prečišćavanje iRNK kako bi se postigla željena količina i kvalitet. Formulacije takođe mogu biti optimizovane kako bi se osigurala veća efikasna enkapsuliraja iRNK. uz povećanje stabilnosti iRNK vakcine tokom čuvanja i transporta. Ujedno, optimizacija može uključivati dizajniranje formulacija koje ciljno deluju na specifične tipove ćelija ili tkiva.

Perspektive iRNK vakcina i zaključak

Razvoj iRNK vakcina traje već duže od 30 godina sa ciljem dobijanja bezbedne vakcine koja može brzo da se razvije i proizvodi. Konceptualno, ova tehnologija omogućava izuzetno brz razvoj i proizvodnju vakcina. Ove osobine iRNK vakcina su se pokazale izuzetno korisnim tokom COVID19 pandemije, i iRNK vakcine su postale dominantne vakcine u odnosu na konvencionalnije tehnologije.

Trenutno se istraživanja i unapređenja iRNK vakcina vrše u dva dominantna pravca: unapređivanje tehnologije iRNK vakcina i klinička ispitivanja već razvijenih iRNK vakcina. U kontekstu kliničkih ispitivanja i dostupnosti iRNK vakcina na tržištu, svakako da su iRNK vakcine protiv SARS-CoV2 najviše poznate široj javnosti i najviše ispitivane vakcine. Ali trenutno se vrše klinička istraživanja za brojne druge vakcine od kojih će sigurno makar nekoliko izaći na tržište. Trenutno je izlasku na tržište najbliža mRESVIA vakcina protiv RSV (Respiratory Syncytial Virus) od proizvođača Moderna. Osim ove vakcine, očekuje se još velik broj vakcina baziranih na iRNK tehnologiji u budućnosti. Trenutno se npr. samo za iRNK vakcinu protiv gripa sprovodi 52 aktivna klinička ispitivanja i to četiri različite farmaceutske kompanije (Pfizer, Sanofi, Moderna, Mitsubishi Tanabe Pharma). Razvoj vakcina protiv virusnih patogena jeste trenutno dominantan, ali treba napomenuti da se razvijaju i vakcine protiv bakterijskih patogena. Kao primer može da posluži razvoj iRNK vakcine protiv tuberkuloze. Trenutno su aktivna 2 klinička ispitivanja u fazi 1/2 (BNT164a1 i BNT614b1, BioNTech).

Osim iRNK vakcina u borbi protiv infektivnih bolesti, jedan od glavnih pravaca razvoja i kliničkih istraživanja su iRNK vakcine protiv malignih obolenja. Za iRNK vakcine protiv malignih obolenja se koriste dva pristupa tretmanu: *ex vivo* učitavanje iRNK u dendritske ćelije i njihova re-infuzija, ili direktna injekcija iRNK sa ili bez nosača (40). *Ex vivo* učitavanje nudi precizniju kontrolu ćelijske mete i efikasnost transfekcije, ali je skup i dugotrajan proces, što otežava njegovu široku primenu u trenutnim okolnostima. U fiziološkim uslovima, DC mogu internalizovati čistu iRNK endocitozom, dok *ex vivo* transfekcija uključuje primenu elektroporacije kako bi postigla visoku efikasnost transfekcije bez nosača. Ovako se promovise ćelijski posredovan imunski odgovor, što je povoljno za tretman protiv kancera (41). Unutar iRNK se mogu kodirati kostimulatorni molekuli poput CD83 i TNFRSF4 što postiže značajno izraženiju stimulaciju DC, a same DC se funkcionalizuju kodiranjem proinflamatornih citokina, poput IL-12, u iRNK sekvencu (42–44). Direktno ubrizgavanje je brži i ekonomičniji metod, ali je manje precizan i efikasan. Intradermalne ili intranodalne injekcije preferencijalno ciljaju APC, ali je i u ovom slučaju prepreka kratak poluživot čiste iRNK. Radi prevazilaženja ovog problema, razvijeni su raznovrsni viralni i neviralni nosači. Viralni vektori unose vakcine bazirane na nukleinskim kiselinama u ćelije, ali ograničenje im je uspostavljena anti-vektorska imunost (45). U kontekstu lipidnih nanočestica, fokus je na pronalaženju odgovarajuće formulacije koja povećava efikasnost ciljanja DC i postoji nekoliko predloga modifikovanja lipida uključujući i primenu manozilovanih lipida i manozno-holesterolski konjugati (46,47).

Sam put primene iRNK vakcina zavisi od željenog ishoda i ciljanih tkiva. Trenutno je velika većina iRNK vakcina dizajnirana za intramuskularnu primenu, međutim radi se na razvoju formulacija koje bi mogle da se primenjuju intravenski, kao i *per os* (48). Za potrebe antitumorske iRNK terapije, novija istraživanja su pokazala obećavajuće rezultate i za intradermalne i subkutane injekcije (49,50). Intravenski put primene se može koristiti za pasivno ciljanje jetre i slezine, usled činjenice da se opsonizovane LNP lako usvajaju od strane makrofaga marginalne zone slezine i Kupferovih ćelija jetre (51), kao i da se LNP u cirkulaciji okruže apolipoproteinima-E čiji su visokoafinitetni receptori eksprimirani upravo na hepatocitama (52). Sa druge strane, ponavljajuća intravenska primena nosi i izvesne probleme sa opstankom i stabilnošću LNP u cirkulaciji, usled imunogenosti jonizovanih lipida (poput PEG) . Najveće prepreke uspešnoj primeni LNP iRNK terapeutika postoje pri oralnoj primeni – samu strukturu čestica je nemoguće održati usled visoke kiselosti želudačnih tečnosti, a dodatnu fizičku barijeru predstavlja relativno izražen sloj mucina koji štiti epitel gastrointestinalnog trakta od stranih tela (53).

Na lokalnom nivou u Republici Srbiji se aktivnosti u vezi sa iRNK vakcinama mogu podeliti na primenu samih vakcina kao i na istraživanja (bazična i primenjena) u vezi sa iRNK vakcinama. U kontekstu primene i distribucije vakcina iRNK vakcina, pre svega treba napomenuti da je za dugoročno skladištenje iRNK vakcina neophodna značajno niža temperatura u odnosu na konvencionalne vakcine. Tako je npr. Pfizer BioNTech Sars-CoV-2 iRNK vakcinu neophodno skladištiti na -80°C, dok vakcine proizvedene konvencionalnim

tehnologijama mogu da se skladište na -20°C ili čak $4-8^{\circ}\text{C}$. Zbog zahteva za izuzetno niskim temperaturama, „Torlak“ Institut ima značajnu ulogu u distribuciji ovog tipa vakcina ne samo u Srbiji već i u regionu, i to upravo zbog posedovanja velikog kapaciteta za skladištenje na izuzetno niskim temperaturama.

U kontekstu istraživanja i razvoja koje se sprovode u Srbiji u vezi sa iRNK vakcinama, treba napomenuti da je Republika Srbija deo globalnog programa transfera iRNK tehnologije, podržan od strane Ministarstva zdravlja i Ministarstva nauke, organizacije Medicines Patent Pool (MPP) i Svetske Zdravstvene Organizacije. Trenutno 15 zemalja učestvuje u ovom programu koji za cilj ima uspostavljanje kapaciteta za lokalnu proizvodnju iRNK vakcina(54). Očekivani rezultat transfera tehnologije za proizvodnju iRNK vakcina jeste smanjivanje zavisnosti od nekoliko proizvođača iRNK vakcina i na taj način povećati dostupnost ovog tipa vakcina na globalnom nivou. Institut za Virusologiju, Vakcine i Serume je nosilac aktivnosti u vezi sa ovim programom na nivou Republike Srbije. U vezi sa fundamentalnim istraživanjima iRNK vakcina, jedini trenutno aktivni projekat ove vrste u Srbiji je „Role of macroautophagy in lipid nanoparticle mRNA delivery and adjuvanticity – REDIRECT“ (55). Autofagija je proces intracelularne razgradnje i reciklaže dotrajalih ćelijskih komponenti koji kontroliše ćelijsku homeostazu i zapaljenje. Ovaj proces ima značajnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora i inflamacije u fiziološkim i patološkim uslovima i modulacija autofagije predstavlja novi terapijski pristup u lečenju pojedinih bolesti(56,57). Zanimljivo je da do sada nije ispitivana uloga autofagije u kontekstu transporta i dopremanja iRNK vakcina i potencijal modulacije autofagije za bolju efikasnost i bezbednost iRNK vakcina u budućnosti.

Iz svih navedenih činjenica možemo izvući zaključak da iRNK vakcine predstavljaju značajan napredak u borbi protiv infektivnih bolesti i tumora, nudeći priliku za bržu i efikasniju proizvodnju vakcina koje ciljaju specifične antigene. Njihova sposobnost da izazovu snažan imunološki odgovor i potencijal za personalizovanu terapiju čine ih obećavajućim rešenjem u savremenoj medicini. Iako su iRNK vakcine već pokazale izuzetnu efikasnost u borbi protiv COVID-19, njihova primena na tumorima i drugim bolestima pruža dodatnu nadu za inovativne terapije. U budućnosti, očekuje se da će dalji razvoj ove tehnologije doneti još značajnije koristi, čime će iRNK vakcine postati ključni alat u globalnoj borbi protiv zaraznih i malignih bolesti.

Zahvalnica

Autori žele da iskažu svoju veliku zahvalnost svim institucijama i pojedincima koje podržavaju naš rad na razvoju iRNK tehnologije i novih terapeutika u okviru projekata „Transfera iRNK tehnologije“, podržan od strane Ministarstva zdravlja i Ministarstva nauke, organizacije Medicines Patent Pool (MPP), Svetske Zdravstvene Organizacije; kao i projekta „From Insightful Science to Innovative Health: Strengthening Translational Capacity and Talent Interoperability in Vaccine and Biologic Research & innovation – VISION“ (broj projekta 101120507 u okviru poziva HORIZON-WIDERA-2022-TALENTS-03) finansiranog od strane Evropske Unije.

Istraživanje sprovedeno uz podršku Fonda za Nauku u okviru projekata #11132 "Role of macroautophagy in lipid nanoparticle mRNA delivery and adjuvanticity" – REDIRECT i #14973 "Omogućavanje genomske terapije za bolesti ekspanzija ponovaka: kaskadne reakcije Cas9 baznih izmenjivača – TORPEDO-Cas9".

Literatura

1. Rappuoli R, Santoni A, Mantovani A. Vaccines: An achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. *J Exp Med.* 2019 Jan 7;216(1):7–9.
2. Rodrigues CMC, Plotkin SA. Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. *Front Microbiol.* 2020 Jul 14;11:1526.
3. Montero DA, Vidal RM, Velasco J, Carreño LJ, Torres JP, Benachi O. MA, et al. Two centuries of vaccination: historical and conceptual approach and future perspectives. *Front Public Health.* 2024 Jan 9;11:1326154.
4. Shattock AJ, Johnson HC, Sim SY, Carter A, Lambach P, Hutubessy RCW, et al. Contribution of vaccination to improved survival and health: modelling 50 years of the Expanded Programme on Immunization. *The Lancet.* 2024 May;403(10441):2307–16.
5. Riedel S. Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Bayl Univ Med Cent Proc.* 2005 Jan 1;18(1):21–5.

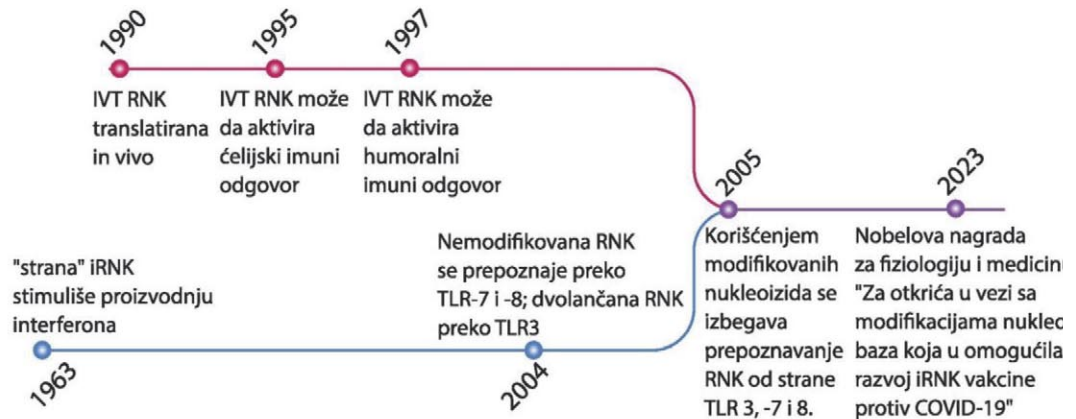
6. Natesan K, Isloor S, Vinayagamurthy B, Ramakrishnaiah S, Doddamane R, Fooks AR. Developments in Rabies Vaccines: The Path Traversed from Pasteur to the Modern Era of Immunization. *Vaccines*. 2023 Mar 29;11(4):756.
7. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol*. 2021 Feb;21(2):83–100.
8. Matsumura T, Takano T, Takahashi Y. Immune responses related to the immunogenicity and reactogenicity of COVID-19 mRNA vaccines. *Int Immunol*. 2023 May 8;35(5):213–20.
9. Shah N, Ghosh A, Kumar K, Dutta T, Mahajan M. A review of safety and immunogenicity of a novel measles, mumps, rubella (MMR) vaccine. *Hum Vaccines Immunother*. 2024 Dec 31;20(1):2302685.
10. Mak TW, Saunders ME. *The immune response: basic and clinical principles*. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic; 2006. 1194 p.
11. Facciola A, Visalli G, Laganà A, Di Pietro A. An Overview of Vaccine Adjuvants: Current Evidence and Future Perspectives. *Vaccines*. 2022 May 22;10(5):819.
12. Lee Y, Jeong M, Park J, Jung H, Lee H. Immunogenicity of lipid nanoparticles and its impact on the efficacy of mRNA vaccines and therapeutics. *Exp Mol Med*. 2023 Oct 2;55(10):2085–96.
13. Zhang L, Wang W, Wang S. Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Nov 2;14(11):1509–23.
14. Salleh MZ, Norazmi MN, Deris ZZ. Immunogenicity mechanism of mRNA vaccines and their limitations in promoting adaptive protection against SARS-CoV-2. *PeerJ*. 2022 Mar 9;10:e13083.
15. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Nov;20(11):817–38.
16. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci*. 1989 Aug;86(16):6077–81.
17. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle *in Vivo*. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949):1465–8.
18. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magné R, Gomard E, Guillet J, et al. Induction of virus specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome entrapped mRNA. *Eur J Immunol*. 1993 Jul;23(7):1719–22.
19. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*. 1995 Apr 1;55(7):1397–400.
20. Isaacs A, Cox RA, Rotem Z. FOREIGN NUCLEIC ACIDS AS THE STIMULUS TO MAKE INTERFERON. *The Lancet*. 1963 Jul;282(7299):113–6.
21. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1526–9.
22. Diebold SS, Massacrier C, Akira S, Patrel C, Morel Y, Reis e Sousa C. Nucleic acid agonists for Toll like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol*. 2006 Dec;36(12):3256–67.
23. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. *J Biol Chem*. 2004 Mar;279(13):12542–50.
24. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity*. 2005 Aug;23(2):165–75.
25. Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*. 2011 Feb;29(2):154–7.
26. Goodarzi H, Najafabadi HS, Oikonomou P, Greco TM, Fish L, Salavati R, et al. Systematic discovery of structural elements governing stability of mammalian messenger RNAs. *Nature*. 2012 May;485(7397):264–8.
27. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol*. 2012 Nov;9(11):1319–30.
28. Johanning FW, Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel LA, Pike MJ, et al. A Sindbis virus mRNA polynucleotide vector achieves prolonged and high level heterologous gene expression *in vivo*. *Nucleic Acids Res*. 1995 May 11;23(9):1495–501.
29. Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, Busse D, Erbar S, Reuter KC, et al. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol Ther*. 2018 Feb;26(2):446–55.
30. Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 May 3;7(1):146.

31. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018 Apr;17(4):261–79.
32. Rosa SS, Prazeres DMF, Azevedo AM, Marques MPC. mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine.* 2021 Apr 15;39(16):2190–200.
33. Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *NPJ Vaccines.* 2020;5:11.
34. Lukić I, Dragačević L, Panić M, Stamenković M, Kojić M. mRNA vaccine manufacturing—challenges in plasmid DNA cloning vector design. In: XIII Congress of microbiologists of Serbia with international participation, Mikromed regio 5. Belgrade: Serbian Society for Microbiology; 2004. p. 157.
35. Ghattas M, Dwivedi G, Lavertu M, Alameh MG. Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities. *Vaccines.* 2021 Dec 16;9(12):1490.
36. Nitika, Wei J, Hui AM. The Development of mRNA Vaccines for Infectious Diseases: Recent Updates. *Infect Drug Resist.* 2021 Dec;Volume 14:5271–85.
37. Whitley J, Zwolinski C, Denis C, Maughan M, Hayles L, Clarke D, et al. Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials. *Transl Res.* 2022 Apr;242:38–55.
38. Li X, Qi J, Wang J, Hu W, Zhou W, Wang Y, et al. Nanoparticle technology for mRNA: Delivery strategy, clinical application and developmental landscape. *Theranostics.* 2024;14(2):738–60.
39. Patiño-Guillén G, Pešović J, Panić M, Savić-Pavičević D, Bošković F, Keyser UF. Single-molecule RNA sizing enables quantitative analysis of alternative transcription termination. *Nat Commun.* 2024 Feb 24;15(1):1699.
40. Benteyn D, Heirman C, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K. mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2015 Feb;14(2):161–76.
41. Gu Y, Zhuo, Zhao X, Song X. Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2020 Jul;41(7):959–69.
42. Aerts Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol.* 2007 Mar;37(3):686–95.
43. Dannull J, Nair S, Su Z, Boczkowski D, DeBeck C, Yang B, et al. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3206–13.
44. Bontkes HJ, Kramer D, Ruizendaal JJ, Meijer CJLM, Hooijberg E. Tumor associated antigen and interleukin-12 mRNA transfected dendritic cells enhance effector function of natural killer cells and antigen specific T-cells. *Clin Immunol.* 2008 Jun;127(3):375–84.
45. Baldin AV, Savvateeva LV, Bazhin AV, Zamyatnin AA. Dendritic Cells in Anticancer Vaccination: Rationale for Ex Vivo Loading or In Vivo Targeting. *Cancers.* 2020 Mar 5;12(3):590.
46. Perche F, Benvegnu T, Berchel M, Lebegue L, Pichon C, Jaffrès PA, et al. Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2011 Aug;7(4):445–53.
47. Wang F, Xiao W, Elbahnasawy MA, Bao X, Zheng Q, Gong L, et al. Optimization of the Linker Length of Mannose-Cholesterol Conjugates for Enhanced mRNA Delivery to Dendritic Cells by Liposomes. *Front Pharmacol.* 2018 Sep 5;9:980.
48. Jeong M, Lee Y, Park J, Jung H, Lee H. Lipid nanoparticles (LNPs) for in vivo RNA delivery and their breakthrough technology for future applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2023 Sep;200:114990.
49. Oberli MA, Reichmuth AM, Dorkin JR, Mitchell MJ, Fenton OS, Jaklenec A, et al. Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy. *Nano Lett.* 2017 Mar 8;17(3):1326–35.
50. Shi J, Huang MW, Lu ZD, Du XJ, Shen S, Xu CF, et al. Delivery of mRNA for regulating functions of immune cells. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2022 May;345:494–511.
51. Zadory M, Lopez E, Babity S, Gravel SP, Brambilla D. Current knowledge on the tissue distribution of mRNA nanocarriers for therapeutic protein expression. *Biomater Sci.* 2022;10(21):6077–115.
52. Sato Y, Kinami Y, Hashiba K, Harashima H. Different kinetics for the hepatic uptake of lipid nanoparticles between the apolipoprotein E/low density lipoprotein receptor and the N-acetyl-d-galactosamine/asialoglycoprotein receptor pathway. *J Controlled Release.* 2020 Jun;322:217–26.
53. O'Driscoll CM, Bernkop-Schnürch A, Friedl JD, Prétat V, Jannin V. Oral delivery of non-viral nucleic acid-based therapeutics - do we have the guts for this? *Eur J Pharm Sci.* 2019 May;133:190–204.

54. mRNA Technology Transfer Programme. mRNA Technology Transfer Programme. MRNA Technology Transfer Programme. Available from: <https://medicinespatentpool.org/what-we-do/mrna-technology-transfer-programme>
55. Possible LNP-mRNA intracellular fates [Internet]. REDIRECT. Available from: <https://redirect.rs/>
56. Tovilovic G, Ristic B, Milenkovic M, Stanojevic M, Trajkovic V. The role and therapeutic potential of autophagy modulation in controlling virus-induced cell death. *Med Res Rev.* 2014 Jul;34(4):744–67.
57. Stamenkovic M, Janjetovic K, Paunovic V, Ciric D, Kravic-Stevovic T, Trajkovic V. Comparative analysis of cell death mechanisms induced by lysosomal autophagy inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 2019 Sep 15;859:172540.

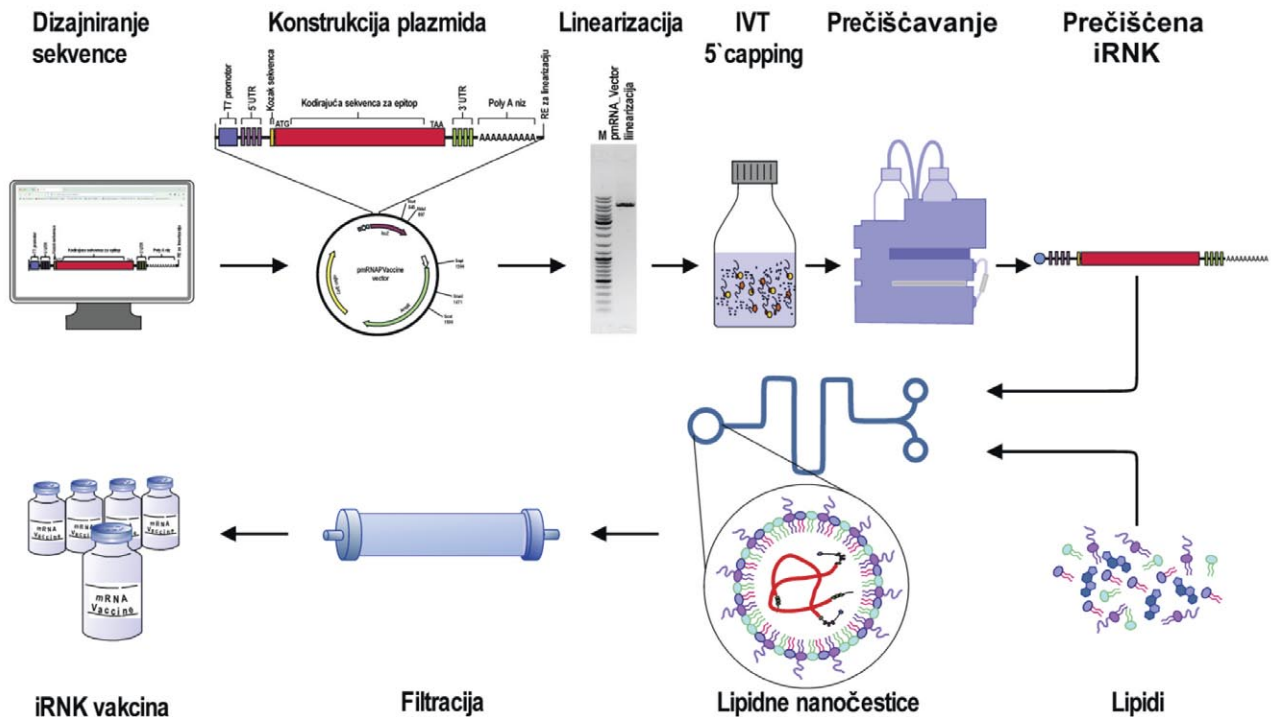
iRNK kao terapeutik

imuni odgovor na egzogenu iRNK



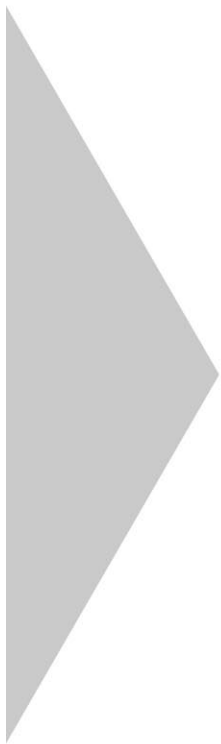
Slika 1 Šematski prikaz razvoja iRNK vakcine

Sam razvoj iRNK terapeutika počinje 1989. godine kada je pokazano da *in vitro* transkribovana iRNK može da se translira u ćelijama u kulturi (kasnije i u organizmu). Inicijalno je fokus bio na razvoju iRNK čijom transkripcijom mogu da se nadoknade nedostajući ili nefunkcionalni proteini. Ali vremenom postaje jasno da ova tehnologija može da se koristi za vakcinaciju tj. veštačku aktivnu imunizaciju. Već je 1995. odnosno 1997 godine je pokazano da iRNK može da aktivira ćelijski odnosno humoralni imuni odgovor. Ipak, bilo je jasno da direktna primena iRNK tehnologije u tom trenutku nije moguća. Naime, još je od 1963. godine poznato da „strana“ tj. egzogena iRNK stimuliše proizvodnju interferona i pokreće anti-virusni odgovor organizma. Sama ta činjenica je u suštini onemogućavala da se iRNK koristi kao terapeutik ili vakcina. Ipak, vremenom je molekularni mehanizam iza ovog imunog odgovora detaljno karakterisan. Naime *in vitro* transkribovana iRNK nije modifikovana, a kao takva aktivira TLR-3, -7 i -8 koji dalje pokreću anti viralni imuni odgovor organizma. Inače, iRNK u ćelijama organizma često imaju modifikovane nukleozide i na taj način endogene RNK izbegavaju aktiviranje imunog odgovora. Korišćenje iRNK kao terapeutika u široj kliničkoj praksi je omogućeno 2005. godine kada je predloženo da se korišćenjem baza sa modifikovanim nukleozidima (npr. pseudouridin umesto uridina) izbegne prepoznavanje iRNK od strane TLR 3, -7 i -8 i na taj način spreči pokretanje imunog odgovora na samu iRNK. Upravo je za „otkrića u vezi sa modifikacijama nukleobaza“ dodeljena Nobelova nagrada za medicinu 2023. godine Katalin Kariko i Dru Vajsmannu (Katalin Karikó, Drew Weissman).



Slika 2 Šematski prikaz proizvodnog procesa iRNK vakcine

Proizvodni proces kreće od razvoja novog antigena i samim tim sekvence iRNK molekula. Nakon toga se pristupa konstrukciji plazmida koji se najčešće koristi kao matrica za *in vitro* transkripciju iRNK. Nakon konstrukcije plazmida se pristupa samoj proizvodnji plazmida tj. izolaciji iz kulture bakterija. Nakon izolacije, vrši se linearizacija plazmida. Linearizovan plazmid se koristi kao matrica za *in vitro* transkripciju iRNK pri čemu se često paralelno radi i dodavanje 5-kape u okviru iste reakcije. Nakon toga sledi prečišćavanje transkribovane iRNK i konačno se iRNK enkapsulira u lipidne nanočestice. Najčešće korišćeni uređaji za enkapsulaciju su bazirani na principu mikrofluidike i precizne kontrole odnosa lipida/iRNK kao i rastvarača. Konačno, dobija se rastvor enkapsuliranih iRNK u lipidne nanočestice. Nakon enkapsulacije, lipidne nanočestice se filtriraju i konačno pakuju i skladište do upotrebe. Ceo proces od dizajna sekvence do spakovane iRNK vakcine može da se završi i za mesec dana ukoliko je sve optimizovano. Upravo zbog ove brzine celokupnog procesa proizvodnje i razvoja je iRNK vakcina bila od presudnog značaja tokom COVID19 pandemije.



BIOMEDICINA

BIOMEDICINE



The influence of genetic variations on the late effects in childhood cancer survivors

Jelena Roganović

Children's Hospital Zagreb, Zagreb Croatia

Faculty of Biotechnology and Drug Development, Rijeka, Croatia

Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

Correspondence: jelena.roganovic@kdb.hr; jelena.roganovic02@gmail.com

Abstract

Childhood cancer survivors represent a unique and constantly growing population that, although being cured from primary cancer, carries a substantial risk for long-term morbidity and premature mortality. The inter-individual variability in the frequency and severity of treatment-related late complications suggests the role of genetic factors. A better understanding of genetic modifiers for late effects after childhood cancer could have a significant impact on future survivorship research and care. This could facilitate the implementation of novel strategies to reduce the burden of therapy-related late toxicities and improve quality of life for childhood cancer survivors.

Key words:

Childhood cancer, survivorship, late effects, genetic factors

During the past five decades, a remarkable improvement has been achieved in the treatment of children and adolescents with cancer, with greater than 80% of pediatric patients today becoming 5-year survivors in high-income countries [1]. These excellent survival rates are the result of the international well-designed cooperative group clinical trials, advanced diagnostic procedures, more aggressive and novel therapies, stratification of patients into risk groups and risk-adapted therapy, and optimized supportive care. It is estimated that in Europe alone the current population of childhood cancer survivors (CCS) has increased to around 500,000 and expands each year [2, 3].

Improved survival and a growing population of CCS have drawn increasing attention to adverse long-term health-related outcomes, commonly referred to as "late effects". Late effects are defined as physical, psychological, and/or psychosocial outcomes that continue or develop 5 years from cancer diagnosis [4]. Various studies have reported that 60% to 90% of CCS develop one or more chronic health conditions, and 20% to 80% of survivors experience severe life-changing or life-threatening complications during adulthood, that contribute to an increased risk of premature late mortality [5]. Late mortality in CCS is 10.8 times higher than in the general population [6]. Relapsed or refractory primary cancer remains the most frequent cause of death, followed by second malignant neoplasms and cardiotoxicity [5, 7-10].

Late effects may persist following acute toxicities during treatment for primary cancer, and may develop later, years or even decades after completion of the treatment. Three important risk factors that affect the risk for late effects are cancer-related, treatment-related and patient-related (Table 1) [5, 11].

Cancer-related factors include type of cancer, localization, extent of the disease, direct tissue effects, and cancer-induced organ dysfunction. Childhood cancer encompasses a heterogeneous group of malignant diseases, arising from histologically distinct tissues. The most common types of childhood cancer include acute lymphoblastic leukemia (ALL), central nervous system tumors and lymphomas [12]. Treatment varies widely and typically involves combined modalities. Intensive chemotherapy, radiation therapy, major surgery, and hematopoietic stem cell transplantation at an early age may have long-term adverse effects on any organ and body system. Chemotherapy-related factors comprise drug type, dose-intensity, schedule, and cumulative dose [11]. Dose-response relationships have been established for the adverse effects from many chemotherapeutic agents, helping to guide therapeutic decisions, as well as targeted screening of CCS [13]. Radiotherapy-related factors include type of irradiation, total dose, fractionation, site, organ, or tissue volume exposed. Like radiotherapy, surgery plays an important role in the local control of many pediatric solid tumors, with long-term effects depending on the surgical technique, site, and effects on the functional status. Patient-specific factors encompass sex, race/ethnicity, age (developmental status) at diagnosis, premorbid and comorbid conditions, the ability of healthy tissue affected by cancer treatment to self-repair, hormonal status, socioeconomic factors, and health and lifestyle habits [11, 14]. Late effects research has provided strong evidence for associations between therapeutic exposures and risk for specific outcomes (Table 2). [5, 11, 15-18]

The use of the Common Terminology Criteria for Adverse Events (version 5.0; National Cancer Institute) allowed the scoring of the chronic conditions in CCS. The system grades conditions on a scale from grade 1 to grade 5 (Grade 1 = Mild; asymptomatic or mild symptoms; Grade 2 = Moderate; Grade 3 = Severe or medically significant but not immediately life-threatening; Grade 4 = Life-threatening or disability; Grade 5 = Death) [19]. Bhakta et al. found that, by age 50 years, CCS have experienced on average 17 grade 1 - 5 chronic health conditions, including 5 health conditions classified as grade 3 - 5, as compared to on average 9 chronic health conditions grade 1 - 5 in community controls [20]. More common and severe late effects of childhood cancer include growth disturbances and endocrinopathy, gonadal toxicity and impaired fertility, metabolic toxicity, cardiotoxicity, pulmonary toxicity, neurocognitive dysfunction, central and peripheral neurotoxicity, bone toxicity, second malignant neoplasms (SMN), and psychosocial late effects [5, 21].

The variability in late effects among CCS could not be fully explained by cancer, treatment, and baseline patient characteristics. The inter-individual differences in the frequency and severity of late toxicities in adult survivors who had received identical treatment for the same childhood cancer suggest that genetic susceptibility may modify the association between treatment and risk of late effects. Although many studies have examined a wide range of late effects related to pediatric cancer and its treatment, there is a little

existing literature on the influence of genetic variations on long-term toxicities, and the contribution of inherited factors to the development of selected late adverse outcomes in CCS is currently largely unknown [22]. Preliminary evidence suggests that certain common and rare genetic polymorphisms act similarly in both the general population and CCS, but more research is needed to elucidate whether the interaction of genetic susceptibility and treatment-related risks is additive or multiplicative [23-25].

Prerequisites for a satisfactory approach to identification of genetic determinants associated with long-term side effects of childhood cancer treatment would be an adequate number of CCS and well-documented clinical and treatment data [26]. Two approaches have been applied: a candidate gene approach and the genome wide association study (GWAS) approach. The candidate gene study is hypothesis driven, focusing on the associations between genetic variation within prespecified genes of interest and specific outcome, and often using a case-control study design. In candidate gene studies, cohorts are usually small, replication cohorts are often lacking, the definitions used for biological endpoints are inconsistent across studies, and there are differences in study design across studies which hinders comparability [27]. GWAS is a hypothesis-free search that permits broad explorations of genetic variants and can identify novel single-nucleotide polymorphisms (SNP) that potentially modify the risk of late toxicity [27, 28]. GWAS is evaluating hundreds of thousands to millions of SNP at the same time, the number of SNP to be included can increase exponentially when the sample size increases, and studies with large sample size can detect smaller variants with modest effect as a result of higher power [29].

Considerable efforts have been expended attempting to identify genetic susceptibility to late effects, but a comprehensive review of genetic aspects of late toxicities in CCS is not yet available. There are only reports on the associations of gene polymorphisms with selected exposure-related late effects, such as anthracycline-related cardiomyopathy, SMN, reproductive health, obesity, reduced bone mineral density, and neurocognitive and neuropsychological impairment [28, 30].

Cardiotoxicity. The largest amount of activity has focused on anthracycline-mediated cardiac injury and SNP in genes regulating drug metabolism and distribution. Significant associations have been reported between cardiac compromise and a nonsynonymous coding variant in *RARG* (retinoid acid receptor) [31], variants in *SLC* (solute-carrier) soluble carrier transporters family (*SLC28A3*, *SLC22A17*, and *SLC22A7*) and in *UGT1A6* glucuronyltransferase family [32, 33], and genetic variants in *CEL4* (CUGBP Elav-like family member 4), *HAS3* (hyaluronan 3), and *CRB3* (carbonyl reductase) [30]. Polymorphisms in adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes (*ABC*) have repeatedly been associated with both acute and chronic cardiotoxicity following anthracycline therapy [28].

Subsequent neoplasms. CCS with cancer predisposition syndromes (e.g., Li-Fraumeni syndrome, neurofibromatosis type 1 [NF1]) are at high risk of SMN [34, 35]. In a prospective registry that included 480 individuals with pathogenic and likely pathogenic germline *TP53* variants, among survivors who were younger than 17 years at diagnosis of the primary cancer, 50% developed a second cancer within 20 years [36]. CCS with NF1 develop late-onset SMN at four times the rate of glioma survivors without NF1 [37].

A significant association was observed between brain SMN and variants that included *BRCA2* and *LIG4* [28], and between *HTR2A* and subsequent basal cell carcinoma [38]. In survivors of pediatric Hodgkin lymphoma, *PRDM1* has been implicated in the development of any radiation-related SMN [39], and *FGFR2*, *PROX1* and *TAGLN* in the development of breast cancer [40, 41].

Gonadal impairment. Female CCS with *BRSK1* (BR serine/threonine kinase I) variant had an increased risk for low serum anti-Müllerian hormone (AMH), although the association with predicted age on menopause was borderline [42]. SNP in the regulatory region of neuropeptide receptor 2 (*NPY2R*) were associated with a 25-fold increased risk for premature menopause among CCS exposed to ovarian irradiation [43]. SNP in androgen and estrogen receptor genes *ER α* and *ER β* , both expressed in the testis, have been associated with oligo- and azoospermia in male CCS [44].

Neurocognitive and neuropsychological impairment. SNP in *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase), *GST* (glutathione S transferase), *MAOA* (monoamino oxidase A), *MS* (methionine synthase), and *NOS* (nitric oxide synthase) genes have been associated with attention-deficit/hyperactivity disorders,

reduced attentiveness and response speed, increased performance variability, and reduced overall intellectual function, especially in childhood leukemia survivors treated with cranial irradiation, as well as behavioral problems [28, 30]. Higher prevalence of psychological problems has been reported in survivors carrying *LEPR* (leptin receptor) variant Q223R [45]. In a recent study, in survivors of childhood ALL, the association of genetic variants in *MTR*, *PPARA*, *ABCC3*, *CALML5*, *CACNB2* and *PCDHB10* genes with deficits in neurocognitive tests performance, and the association of variants in *SLCO1B1* and *EPHA5* genes with anxiety and depression, were observed [46].

Obesity. A statistically significant correlation was reported between *LEPR* variant GlnQ223Arg and obesity in female childhood ALL survivors who were treated with cranial irradiation [47]. St. Jude Lifetime Cohort (SJLIFE) Study identified genetic polymorphisms in the regions near or within *FAM155A*, *SOX11*, *CDH18* and *GLRA3*, that may increase the odds of obesity CCS who received cranial radiotherapy [48].

Reduced bone mineral density (BMD). SNP in genes encoding *ESR1* (estrogen receptor type 1) and *LRP5* (low-density lipoprotein receptor 5) were associated with increased risk of low BMD after exposure to irradiation [49]. In ALL survivors who were carriers for *VDR* (vitamin D receptor) and *MTHFR* polymorphisms, an increased risk was reported for lower lumbar spine BMD and for lower total body BMD, respectively [50].

Conclusion

Although many children and adolescents with specific types of cancer have received the same or very similar treatments, there is a marked variability in the proportion that develops treatment-related late toxicities. Emerging evidence exists that genetic factors can modify the frequency and severity of long-term toxicities in CCS. Large international and multidisciplinary collaborations are required to create genomic studies with sufficient number and diversity of survivor characteristics (e.g., age, race/ethnicity, specific tumor types, specific treatment exposures). The coming years will see a dramatic expansion in our consideration of genetic susceptibility in childhood cancer survivorship.

References

1. Botta L, Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Cañete A, Dal Maso L, et al. EUROCORE-6 Working Group. Long-term survival and cure fraction estimates for childhood cancer in Europe (EUROCORE-6): results from a population-based study. *Lancet Oncol.* 2022;23:1525-1536.
2. Haupt R, Essiaf S, Dellacasa C, Ronckers CM, Caruso S, Sugden E, et al. PanCareSurFup, ENCCA Working Group; ExPo-r-Net Working Group. The 'Survivorship Passport' for childhood cancer survivors. *Eur J Cancer.* 2018;102:69-81.
3. Vassal G, Schrappe M, Pritchard-Jones K, Arnold F, Basset L, Biondi A, et al. The SIOPE strategic plan: a European cancer plan for children and adolescents. *J Cancer Policy.* 2016;8:17-32.
4. Galligan AJ. Childhood Cancer Survivorship and Long-Term Outcomes. *Adv Pediatr.* 2017;64(1):133-169.
5. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Late Effects of Treatment for Childhood Cancer (PDQ®): Health Professional Version. 2024 Jun 24. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65832/>. (Accessed: August 14, 2024).
6. Maeda M. Late effects of childhood cancer: life-threatening issues. *J Nippon Med Sch.* 2008;75(6):320-324.
7. Byrne J, Schmidtman I, Rashid H, Hagberg O, Bagnasco F, Bardi E, et al. Impact of era of diagnosis on cause-specific late mortality among 77 423 five-year European survivors of childhood and adolescent cancer: The PanCareSurFup consortium. *Int J Cancer.* 2022;150(3):406-419.
8. Kilsdonk E, van Dulmen-den Broeder E, van Leeuwen FE, van den Heuvel-Eibrink MM, Loonen JJ, van der Pal HJ, et al. Late Mortality in Childhood Cancer Survivors according to Pediatric Cancer Diagnosis and Treatment Era in the Dutch LATER Cohort. *Cancer Invest.* 2022;40(5):413-424.
9. Dixon SB, Liu Q, Chow EJ, Oeffinger KC, Nathan PC, Howell RM et al. Specific causes of excess late mortality and association with modifiable risk factors among survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet.* 2023;401(10386):1447-1457.
10. Petrykey K, Rezgui AM, Guern ML, Beaulieu P, St-Onge P, Drouin S, et al. Genetic factors in treatment-related cardiovascular complications in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics.* 2021;22(14):885-901.

11. Dixon SB, Bjornard KL, Alberts NM, Armstrong GT, Brinkman TM, Chemaitilly W, et al. Factors influencing risk-based care of the childhood cancer survivor in the 21st century. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(2):133-152.
12. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, et al. (2017) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. National Cancer Institute, Bethesda, MD. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014. (Accessed: August 12, 2024).
13. Robison LL, Hudson MM. Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(1):61-70.
14. Erdmann F, Frederiksen LE, Bonaventure A, Mader L, Hasle H, Robison LL, et al. Childhood cancer: Survival, treatment modalities, late effects and improvements over time. *Cancer Epidemiol.* 2021;71(Pt B):101733.
15. Meck MM, Leary M, Sills RH. Late effects in survivors of childhood cancer. *Pediatr Rev.* 2006;27(7):257-62.
16. Friedman DL, Meadows AT. Late effects of childhood cancer therapy. *Pediatr Clin North Am.* 2002;49:1083-1106.
17. Landier W, Armenian S, Bhatia S. Late effects of childhood cancer and its treatment. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):275-300.
18. Roganovic J, Haupt R, Bárdi E, Hjorth L, Michel G, Pavasovic V, et al. Late adverse effects after treatment for childhood acute leukemia. *Acta Med Acad.* 2024;53(1):59-80.
19. Shah SM. Common terminology criteria for adverse events. <https://www.uptodate.com/contents/common-terminology-criteria-for-adverse-events>. Last updated: April 08, 2024. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (Accessed: August 18, 2024).
20. Bhakta N, Liu Q, Ness KK, Baassiri M, Eissa H, Yeo F, et al. The cumulative burden of surviving childhood cancer: an initial report from the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). *Lancet.* 2017;390(10112):2569-2582.
21. Roganović J. Late effects of the treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Paediatr Croat.* 2024;68(2):70-75.
22. Dixon SB, Chow EJ, Hjorth L, Hudson MM, Kremer LCM, Morton LM, et al. The Future of Childhood Cancer Survivorship: Challenges and Opportunities for Continued Progress. *Pediatr Clin North Am.* 2020;67(6):1237-1251.
23. Opstal-van Winden AWJ, de Haan HG, Hauptmann M, Schmidt MK, Broeks A, Russell NS et al. Genetic susceptibility to radiation-induced breast cancer after Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2019;133(10):1130-1139.
24. Leong SL, Chaiyakunapruk N, Lee SW. Candidate gene association studies of anthracycline-induced cardiotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):39.
25. Wang Z, Wilson CL, Easton J, Thrasher A, Mulder H, Liu Q et al. Genetic risk for subsequent neoplasms among long-term survivors of childhood cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2078-2087.
26. Clemens E, Meijer AJ, Broer L, Langer T, van der Kooi AL, Uitterlinden AG, et al. Genetic Determinants of Ototoxicity During and After Childhood Cancer Treatment: Protocol for the PanCareLIFE Study. *JMIR Res Protoc.* 2019;8(3):e11868.
27. Clemens E, van der Kooi ALF, Broer L, van Dulmen-den Broeder E, Visscher H, Kremer L, et al. The influence of genetic variation on late toxicities in childhood cancer survivors: A review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;126:154-167.
28. Gramatges MM, Bhatia S. Evidence for Genetic Risk Contributing to Long-Term Adverse Treatment Effects in Childhood Cancer Survivors. *Annu Rev Med.* 2018;69:247-262.
29. Liu X, Fu YX. Exploring population size changes using SNP frequency spectra. *Nat Genet.* 2015;47(5):555-559.
30. Chow EJ, Ness KK, Armstrong GT, Bhakta N, Yeh JM, Bhatia S, et al. Current and coming challenges in the management of the survivorship population. *Semin Oncol.* 2020;47(1):23-39.
31. Aminkeng F, Bhavsar AP, Visscher H, Rassekh SR, Li Y, Lee JW, et al. A coding variant in RARG confers susceptibility to anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood cancer. *Nat Genet.* 2015;47(9):1079-1084.
32. Visscher H, Ross CJ, Rassekh SR, Sandor GS, Caron HN, van Dalen EC, et al. Validation of variants in SLC28A3 and UGT1A6 as genetic markers predictive of anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(8):1375-1381.
33. Visscher H, Rassekh SR, Sandor GS, Caron HN, van Dalen EC, Kremer LC, et al. Genetic variants in SLC22A17 and SLC22A7 are associated with anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Pharmacogenomics.* 2015;16(10):1065-1076.
34. Waespe N, Belle FN, Redmond S, Schindera C, Spycher BD, Rössler J, et al. Cancer predisposition syndromes as a risk factor for early second primary neoplasms after childhood cancer - A national cohort study. *Eur J Cancer.* 2021;145:71-80.
35. Yoshida M, Nakabayashi K, Yang W, Sato-Otsubo A, Tsujimoto SI, Ogata-Kawata H, et al. Prevalence of pathogenic variants in cancer-predisposing genes in second cancer after childhood solid cancers. *Cancer Med.* 2023;12(10):11264-11273.
36. de Andrade KC, Khincha PP, Hatton JN, Frone MN, Wegman-Ostrosky T, Mai PL, et al. Cancer incidence, patterns, and genotype-phenotype associations in individuals with pathogenic or likely pathogenic germline TP53 variants: an observational cohort study. *Lancet Oncol.* 2021;22(12):1787-1798.

37. Bhatia S, Chen Y, Wong FL, Hageman L, Smith K, Korf B, et al. Subsequent neoplasms after a primary tumor in individuals with neurofibromatosis type 1. *J Clin Oncol*. 2019;37(32):3050-3058.
38. Sapkota Y, Turcotte LM, Ehrhardt MJ, Howell RM, Arnold MA, Wilson CL, et al. Genome-Wide Association Study in Irradiated Childhood Cancer Survivors Identifies HTR2A for Subsequent Basal Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2019;139(9):2042-2045.e8.
39. Best T, Li D, Skol AD, Kirchhoff T, Jackson SA, Yasui Y, et al. Variants at 6q21 implicate PRDM1 in the etiology of therapy-induced second malignancies after Hodgkin's Lymphoma. *Nat Med*. 2011;17(8):941-943.
40. Ma YP, van Leeuwen FE, Cooke R, Broeks A, Enciso-Mora V, Olver B, et al. FGFR2 genotype and risk of radiation-associated breast cancer in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012;119(4):1029-1031.
41. Morton LM, Sampson JN, Armstrong GT, Chen TH, Hudson MM, Karlins E, et al. Genome-Wide Association Study to Identify Susceptibility Loci That Modify Radiation-Related Risk for Breast Cancer After Childhood Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(11):dix058.
42. van Dorp W, van den Heuvel-Eibrink MM, Stolk L, Pieters R, Uitterlinden AG, Visser JA, et al. Genetic variation may modify ovarian reserve in female childhood cancer survivors. *Hum Reprod*. 2013;28(4):1069-1076.
43. Brooke RJ, Im C, Wilson CL, Krasin MJ, Liu Q, Li Z, et al. A High-risk Haplotype for Premature Menopause in Childhood Cancer Survivors Exposed to Gonadotoxic Therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(8):895-904.
44. Romerius P, Giwercman A, Moëll C, Relander T, Cavallin-Ståhl E, Wiebe T, et al. Estrogen receptor α single nucleotide polymorphism modifies the risk of azoospermia in childhood cancer survivors. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(5):263-269.
45. Kwiecinska K, Strojny W, Pietrys D, Bik-Multanowski M, Siedlar M, Balwierz W, et al. Late effects in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of selected gene polymorphisms. *Ital J Pediatr*. 2018;44(1):92.
46. Petrykey K, Lippé S, Robaey P, Sultan S, Laniel J, Drouin S, et al. Influence of genetic factors on long-term treatment related neurocognitive complications, and on anxiety and depression in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: The Petale study. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217314.
47. Ross JA, Oeffinger KC, Davies SM, Mertens AC, Langer EK, Kiffmeyer WR, et al. Genetic variation in the leptin receptor gene and obesity in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*. 2004;22(17):3558-3562.
48. Wilson CL, Liu W, Yang JJ, Kang G, Ojha RP, Neale GA, et al. Genetic and clinical factors associated with obesity among adult survivors of childhood cancer: A report from the St. Jude Lifetime Cohort. *Cancer*. 2015;121(13):2262-2270.
49. den Hoed MA, Pluijm SM, Stolk L, Uitterlinden AG, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. Genetic variation and bone mineral density in long-term adult survivors of childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(12):2212-2220.
50. te Winkel ML, van Beek RD, de Muinck Keizer-Schrama SM, Uitterlinden AG, Hop WC, Pieters R, et al. Pharmacogenetic risk factors for altered bone mineral density and body composition in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;95(5):752-759.

Table 1. Risk factors for late effects after childhood cancer treatment

Cancer-related factors	Type and extent of cancer Organs or tissues affected by cancer: direct tissue effects, organ dysfunction induced by cancer
Treatment-related factors	Chemotherapy: drug type, dose-intensity, cumulative dosage, schedule Radiotherapy: technique, total dose, fraction size, organ or tissue volume exposed Surgery: technique, site, extent, consequential organ dysfunction Hematopoietic stem cell transplantation Combined treatment modalities Time from completed therapy
Patient-related factors	Age/developmental status Sex Race/ethnicity Premorbid health status and comorbidities Hormonal status Socioeconomic factors Health and lifestyle habits

Adapted from: [5, 11].

Table 2. Major treatment-related late effects of childhood cancer treatment

Organ system/Organ	Potential late effects	Treatment exposure
Cardiovascular	Cardiomyopathy, congestive heart failure, pericarditis, coronary artery disease, valvular disease, conduction disorders Hypertension (from renal toxicity)	Cardiac toxicity: anthracyclines; chest and spinal irradiation, TBI Renal toxicity: ifosfamide, carboplatin, cisplatin; irradiation exposing the kidneys, TBI; nephrectomy
Respiratory	Pulmonary fibrosis, interstitial pneumonitis, restrictive and obstructive lung disease	Bleomycin, nitrosoureas; chest or whole lung irradiation, TBI; HSCT; pulmonary/chest wall surgery
Endocrine/Metabolic	HP axis problems including GHD (short stature), TSHD, LH/FSHD and ACTHD, central precocious puberty, hypo- and hyperthyroidism, overweight/obesity, metabolic syndrome and its components	Cranial irradiation; radiotherapy involving HP region, TBI; neurosurgery involving HP region; irradiation exposing thyroid gland including I311-MIBG
Gonadal/Reproductive	<i>Males</i> Testicular hormone dysfunction: testosterone deficiency/insufficiency, delayed/arrested puberty Impaired spermatogenesis: reduced fertility, oligospermia, azoospermia, infertility <i>Females</i> Ovarian hormone deficiencies: delayed/arrested puberty, premature ovarian insufficiency/premature menopause, diminished ovarian follicular pool, infertility	Alkylating agents; craniospinal irradiation, abdominopelvic irradiation, irradiation exposing the gonads, TBI
Central nervous	Neurocognitive deficits, leukoenceopathy, cerebral vasculopathy including cerebrovascular accident	Cranial irradiation; HD-methotrexate and HD-cytarabine, intrathecal chemotherapy
Peripheral nervous	Peripheral neuropathy	Vinca alkaloid agents, cisplatin, carboplatin
Musculoskeletal	Reduced bone mineral density, fractures, osteonecrosis, abnormal bone and/or muscle growth, scoliosis/kyphosis, deformity and functional loss of the extremity	Cranial irradiation; corticosteroids, methotrexate; gonadal irradiation, TBI; irradiation involving the chest, abdomen or spine; amputation, limb-sparing surgery
Dental/oral	Dental caries, dental developmental problems, xerostomia, periodontal disease, osteoradionecrosis	Irradiation involving oral cavity or salivary glands, TBI; chemotherapy

Gastrointestinal	Esophageal dysmotility, esophageal stricture, chronic enterocolitis, bowel obstruction, strictures, fistula, fecal incontinence	Irradiation exposing the esophagus and bowel, surgery involving digestive tract; pelvic surgery, cystectomy
Liver	Hepatic dysfunction, veno-occlusive disease, hepatic fibrosis/cirrhosis, focal nodular hyperplasia	Methotrexate, thioguanine, mercaptopurine, busulfan, dactinomycin; liver irradiation
Urinary	Glomerular and tubular toxicity, chronic renal failure; chronic hemorrhagic cystitis, bladder fibrosis, urinary incontinence	Cisplatin, carboplatin, alkylating agents, HD-methotrexate; abdominal/pelvic irradiation; nephrectomy, surgery involving the bladder
Ocular	Cataract, xerophthalmia, orbital hypoplasia, lacrimal duct atrophy, keratitis, glaucoma, optic nerve injury	Irradiation involving the eye and orbit, TBI; prolonged corticosteroids; HSCT
Auditory	Sensorineural and conductive hearing loss, tinnitus, vertigo	Cranial irradiation; cisplatin, carboplatin (at myeloablative doses or if given during infancy)
Immune	Asplenia, functional hyposplenism, overwhelming bacterial infections, immunologic deficiencies	Splenectomy; irradiation exposing the spleen; HSCT
Mental health	Anxiety, depression, post-traumatic stress, behavioral problems, suicidal ideation	Any cancer experience
Psychosocial	Educational problems, relationship problems, dependent living, social withdrawal, under-employment or unemployment	Any cancer experience
Subsequent malignant neoplasms	Brain tumors Breast cancer Colorectal cancer Myelodysplasia/acute myeloid leukemia Skin cancer Thyroid cancer	Cranial irradiation, TBI Irradiation involving the breasts, TBI Irradiation involving the colon and rectum, TBI Alkylating agents, epipodophyllotoxins, anthracyclines Irradiation (any field) Irradiation exposing the thyroid gland, TBI

Adapted from: [5, 11, 15-18].

Abbreviations: ACTHD = adrenocorticotropic hormone deficiency; GHD = growth hormone deficiency; HD = high-dose; HP = hypothalamic-pituitary; HSCT = hematopoietic stem cell transplantation; I311-MIBG = Iodine 311-metaiodobenzylguanidine; LH/FSHD = luteinizing hormone/follicle stimulating hormone deficiency; TSHD = thyroid stimulating hormone deficiency; TBI = total body irradiation.

Molecular characterization of *CYP21A2* mutations and clinical findings in Macedonian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency – twenty years experience

Violeta Anastasovska, Mirjana Kocova

Department of Neonatal Screening, University Clinic for Pediatrics, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Medicine, Skopje, Republic of North Macedonia

Correspondence: violeta_anastasovska@yahoo.com

Abstract

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a heterogeneous autosomal recessive disease which has a different prevalence in different populations and ethnicities. The disease is caused by a variety of *CYP21A2* gene mutations. The most common mutations affect the enzyme 21-hydroxylase. CAH has variable clinical presentation depending on the amount of the active enzyme. Where no enzyme is produced, the life-threatening disease occurs in newborn child, whereas milder mutations can produce some percentage of 21-hydroxylase causing milder clinical presentation with precocious puberty in childhood, or oligomenorrhea and sterility later in life. In female, additional signs are virilization which can be present as complete sexual ambiguity and problems with sexual identity which can occur despite the surgical correction.

In this paper we have presented the 20 years of work with clinical and molecular issues in 96 Macedonian CAH patients with all forms of severity. The diagnosis and clinical care were provided following the contemporary international guidelines. Nine most common *CYP21A2* point mutations were explored and the findings are classified through the severity of mutations and their role in the clinical presentation.

The mutations distribution in our population corresponds to most of the European countries with exception of the p.P30L mutation which has higher prevalence. Genotype-phenotype concordance was good in our cohort except for a stronger role of p.P30L mutation which delivered stronger virilization in NC form or even complete SV form of the disease. We have presented a novel 9 bp deletion (p.G424_R426del) in exon 10 of the *CYP21A2* gene. We have provided our finding that some mutations such as p.P30L and intron 2 are among the main causes of genotype-phenotype discrepancy. We had presented also several rare genotypes and the genotypes in Roma ethnicity for the first time.

We believe that genetic testing in patients with CAH is important for the exact diagnosis, understanding the role of mutations and for genetic counseling.

Keywords:

CYP21A2 mutation, congenital adrenal hyperplasia, 21-hydroxylase deficiency, genotype, phenotype

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a family of autosomal recessive disorders caused by the mutation of genes involved in the steroidogenesis pathway. The most common cause of the disease is the 21-hydroxylase deficiency which results from the mutations in the *CYP21A2* gene. It appears in 95-99% of the patients with CAH. The prevalence of 21-hydroxylase deficiency as well as the incidence of different mutations is highly variable among populations, some countries show higher (China and India) or lower prevalence (Japan and New Zealand) [1,2]. The prevalence of the severe form of the disease is 1:10 000-1:20.000 [3] whereas milder forms are more common reaching a prevalence of 1:200-1:1000, making the CAH one of the most common autosomal recessive disorder [4,5]. After the introduction of neonatal screening an incidence of 1: 6084 to 1: 26,727 for the classic form of the disease has been published [1]. Some closed ethnicities have homogenous disease and genotype such as Roma ethnicity in North Macedonia [6]. The disease has different clinical presentations from the most severe and life-threatening to clinically non-recognizable. The variability depends on the accumulated level of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) due to the block of the normal metabolic pathway of 17-OHP which interrupts cortisol and aldosterone synthesis. Accumulated 17-OHP, further converts to androgens causing one of the important signs of the disease, virilization. CAH appears in two clinical forms, classical and nonclassical (NC) phenotype. The classical form is further classified to salt-wasting (SW) and simple virilizing (SV) form [1,2]. However, even in patients with identical mutations the phenotype might be variable. Genetic cause of CAH is mutation in the *CYP21A2* gene.

CYP21A2 gene location and structure

The gene encoding 21-hydroxylase enzyme, *CYP21A2* (MIM# 613815; GenBank ID 1589) consists of 10 exons and spans 3.35 kb of the short arm of chromosome 6 (6p21.3) in the major histocompatibility complex class III region, a region with complex organization and size variability of genes [7-10]. *CYP21A2* is present 30 kb downstream of its nonfunctional pseudogene *CYP21A1P* which has been inactivated by presence of multiple pathogenic variants, small insertions or deletions and point pathogenic variants. The location and sequence homology of 98% in the coding region between the gene and the pseudogene results in recombination events that are called gene conversions that contribute to the majority of the point pathogenic variants in the *CYP21A2* gene [11]. In this region, the active gene *CYP21A2* and its pseudogene *CYP21A1P*, together with neighboring genes encoding complement proteins (C4A, C4B), serine/threonine nuclear proteins (RP1 and RP2) and tenascin (TNXA and B) comprise a RCCX module (RP-C4-CYP21-TNX) as a genetic unit. The most frequent bimodular RCCX module consists of two RCCX modules, one with the *CYP21A1P* pseudogene and the other with the *CYP21A2* gene, where the orientation of the genes from telomere to centromere is *RP1-C4A-CYP21A1P-TNXA-RP2-C4B-CYP21A2-TNXB*. This bimodular haplotype is present in about 69% of the Caucasian population [12-15].

Genotype-phenotype correlation

Approximately 95% of all affected *CYP21A2* alleles appear as a result of intergenic recombinations of which nine pseudogene-derived point mutations due to microconversion events account for 70% - 75%, of gene changes. The large gene rearrangements caused by unequal meiotic crossover, cause the remaining 25% - 30% of cases [16,17], whereas fewer than 5% alleles carry rare or *de novo* spontaneous mutations [18,19]. To date, more than 300 pathogenic variants in the *CYP21A2* gene have been described (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). *CYP21A2* mutations are classified as severe, moderate, and mild upon the nature

and severity of the mutations, which cause different decrease of 21-hydroxylase enzyme activity. Clinically, it has been shown that intron 2 splice mutation (c.290-13A/C>G), an 8-bp deletion in exon 3 (p.G111Vfs), cluster conversion in exon 6 (p.I236N, p.V237E, p.M239K), one nucleotide insertion in exon 7 (p.L308Ffs), nonsense p.Q318X and missense p.R356W mutations in exon 8 abolish enzyme activity, and are associated with the severe classical form of SW disease [19,20]. Missense pathogenic variant p.I172N confers around 1 - 2% enzyme activity which is sufficient for nearly normal aldosterone synthesis and salt wasting protection but insufficient for androgen excess suppression. p.I172N is intermediate pathogenic variant associated with the simple virilizing form of CAH [21]. A group of mild pathogenic variants including p.P30L, p.P453S, p.R339H, p.R369W, p.I230T, and p.V281L missense mutations retain 20% - 60% of residual enzyme activity, and are associated with nonclassical CAH [22].

Based on the mutations, and a consecutive level of remaining enzyme activity, the following forms of CAH have been recognized [23], null form with no enzyme activity (30kb deletion, 8bp deletion, exon 6 cluster, p.Q318X, p.R356W), A form with enzyme activity in the range 1-2% (intron 2 splice), B form with moderate enzyme activity 2-10% (p.I172N), C form with mild enzyme activity 20-50% (p.V281L, p.R339H, p.P453S, p.P30L) and D form with unclear phenotypes [15,24-26]. Each of these group has reasonably predictable phenotype [27]. Some other mutations which fall out of the generally accepted classification appear in some patients making precise classification difficult. The most severe classical phenotypes must have two severe pathogenic variants and no mild pathogenic variants. There is a good correlation of severe genotypes with the SW form, ranging from 91% - 97% of cases. However, this correlation is less strong for the intermediate severity groups of mutations, with a range from 45% - 57% [28]. NCCAH genotypes may have two mild pathogenic variants or one mild and one more severe pathogenic variant. In general, the less severe mutation in the genotype determines the phenotype because the mild pathogenic variant allows the enzyme synthesis of up to 50% of the normal activity in spite of the fact that the severe pathogenic variant would not contribute to any synthesis [21,24,25,29]. However, more intense degrees of hirsutism and higher 17-OHP levels in NCCAH patients with a mild and severe pathogenic variant than those with two mild pathogenic variants have been reported [26,30]. Although a considerable correlation between the genotype and clinical presentation in CAH is a fact, some different combinations of *CYP21A2* mutations can cause different phenotypes [31-34]. Significant emphasis has been put recently on the orientation and exact position of the mutation within the gene structure which contributes to the genotype/phenotype discrepancies.

Crystal structure model of the human 21-hydroxylase enzyme has been elucidated. The place of the different mutations and their impact upon the function of the 21-hydroxylase have been defined explaining SW, SV and NC phenotypes. The *CYP21A2* molecule resides in the membranes of the endoplasmic reticulum. Different cellular proteins assist to the proper folding of the enzyme. The heme is located centrally in the enzyme molecule and is surrounded by 16 helices and 9 B-sheets [34]. There are two binding sites for 17-OHP close to the heme moiety however hydrogen bonds of residues close to the heme as well as the electron transfer are crucial for the enzyme function [24, 34,35]. Thus, mutations causing irregular clashes with the heme, disruption of hydrogen bonds, disrupted substrate binding, mutations causing impaired secondary structure all decrease significantly the enzyme function and cause severe form of the disease [36]. On the other hand, mutations causing only disrupted anchoring, allow some enzyme activity and cause SV or NC form of the disease.

The example of p.P30L mutation is very interesting. This mutation is more common in the Central and Southeast Europe including Balkans [37] and Mexico. Although it is generally classified as a mild mutation frequently found in the NC form, it appears that many patients carrying this mutation show stronger virilization

compared to similar mild mutations. In patients with NCCAH carrying p.P30L mutation, almost 2/3 of females need surgical correction of the virilization. This mutation can also cause typical SV form of the disease [38-40]. The genotype-phenotype discrepancy may be a result from the factors influencing activity of p.P30L such as additional amino acid residues affecting heme condition, posttranslational modifications or interface with other interacting proteins or ligands [41,43]. Moreover, different mutation in the promoter region of *CYP21A2* gene causing the level of transcriptional activity of 21-hydroxylase have been identified in SV patient carrying p.P30L mutation [43,44]. On the other hand, location of the p.P30L mutation peripherally at the N-end of the enzyme is involved in moderate change of enzyme stability [45]. Thus p.P30L mutation is among the main cause of the variable clinical picture in CAH [32] generating continuum of phenotypes between NC and SV form of CAH. Since NC forms of CAH are not always detected on neonatal screening, p.P30L mutation is frequently detected in family studies without significant clinical signs in subjects The detected carriers, however, should be closely monitored in order to detect early virilization in girls and early growth spurt in boys. Due to these specificities p.P30L mutation might be re-classified in the moderate mutations. The spatial localizations of the p.P30L as well as p.V281L in the *CYP21A2* protein showing their peripheral localization are presented on the Figure 1. The p.P30L mutation is localized at the N terminus of the protein responsible for the orientation toward the membrane of the endoplasmatic reticulum [45].

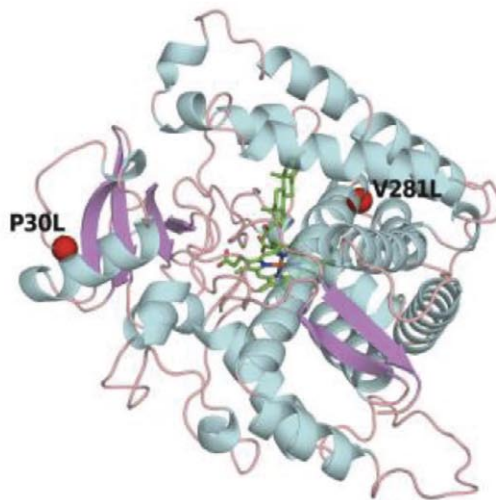


Figure 1. Spatial localizations of the mutant residues p.P30L and p.V281L in the *CYP21A2* protein

The severe intron 2 mutation (c.290-13A/C>G) for instance results in variable degrees of 21-hydroxylase activity hence explaining phenotypic heterogeneity extending from classical SW form to asymptomatic patients [20,46,47]. An unusually high frequency of “asymptomatic homozygotes” for intron 2 may results from unequal amplification (“allele dropout”) of *CYP21A2* alleles which leads to obscured normal alleles and represent a common diagnostic pitfall of methods employing PCR [48,49]. Also, intron 2 mutation site may be polymorphic for unidentified splice regulatory factors such that the cryptic splice becomes ignored, permitting correct splicing of *CYP21A2* pre-mRNA in asymptomatic homozygotes [48,50,51].

***CYP21A2* mutations in Macedonian patients with 21-hydroxylase deficiency**

During the period of 20 years (2004 - 2024) at the University Clinic for Pediatrics, Faculty of Medicine in Skopje a total of 96 patients (38 male and 58 female) from 87 unrelated families with clinical manifestation of 21-hydroxylase deficiency were analyzed by direct molecular detection of nine most common *CYP21A2*

point mutations. Twenty-four (25%) of the patients had SW form of CAH, 45 (46.9%) had SV and 27 (28.1%) had late onset (LO) form of the disease. The clinical diagnosis was established based on the symptoms and history of the disease, as well as upon biochemical analysis. Clinical diagnosis in patients with SW form of 21-hydroxylase deficiency is made at the age of 4 days to 2.5 months after birth, based on episodes of dehydration and/or hyperkalemia and hyponatremia, as well as the presence of ambiguous genitalia in female patients. SV patients were diagnosed at the age of one month to 10 years, according to the signs of virilization, clitoromegaly or ambiguous genitalia, as a consequence of the androgen excess. Clinical diagnosis in patients with LO form was made between the ages of 2 and 18 years, based on signs of precocious adrenarche and/or puberty, hirsutism and/or oligomenorrhea, as well as advanced bone age.

As a differential biochemical analysis for the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency, the basic and/or stimulated level of 17-OHP in serum was determined, 60 minutes after intravenous administration of ACTH (cosyntropine). The statistical analysis of the obtained values for 17-OHP in the three clinical forms showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the baseline levels of 17-OHP in patients with SW form (> 75 nmol/l) compared to the levels in SV (67.1 ± 12.7 nmol/l) and LO (23.1 ± 19.5 nmol/l) patients. There was also statistically significant difference between the baseline (23.1 ± 19.5 nmol/l) and stimulated (53.1 ± 18.9 nmol/l) levels of 17-OHP in patients with LO-form of the disease ($p < 0.05$).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from all of 96 Macedonian patients with 21-hydroxylase deficiency and family members using the salting out method [52]. To detect the most frequent nine pseudogene derived *CYP21A2* mutations – p.P30L, In2G (c.293- 13A/C > G), Del 8ntG110, I172N, cluster conversion in exon 6 (p.I236N, p.V237E, p.M239K), F306 + T, p.V281L, p.Q318X and p.R356W combined differential PCR-ACRS (amplification-created restriction site) protocol was performed, as previously described [53]. The 8515 bp PCR product of the *CYP21A2* gene was derived by LongAmp Taq DNA Polymerase (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA) using the locus-specific paired primers CYP779f (5'-AGGTGGGCTGTTTTCTTTCA-3'/Tena 32F (5'-CTGTGCCTGGCTATAGCAAGC-3') (Figure 2). Primer Tena32F is located in a nonduplicated area of *TNXB* in exon 32 (nt 78,918–78,939, GenBank Accession No. AL049547), and primer CYP779f is located in the 5' end of the *CYP21A1* and *CYP21A2* genes (nt 87,443–87,463, GenBank Accession No. AL049547) [54,55].

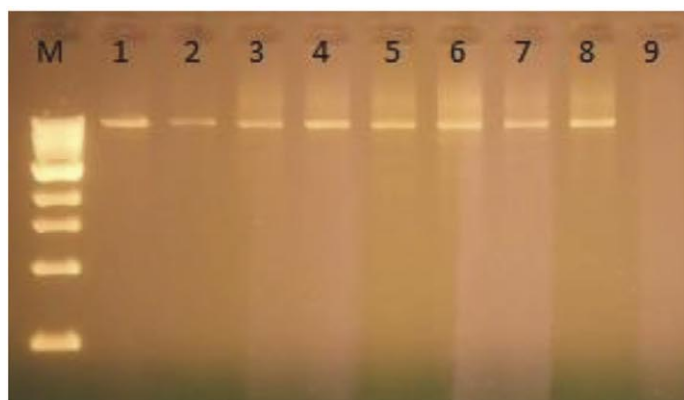


Figure 2. The 8.5 kb PCR products of the *CYP21A2* gene derived by CYP779f/Tena 32F paired primers - line 1-8; line 9 - blank, M-marker

The primary PCR product was then used as template in a secondary PCR using ACRS approach with a panel of specific primers for direct detection of the mutations (Table 1) [53]. Subsequent restriction enzyme analyses allowed detection of the mutations as well as determination of the zygosity of the analyzed mutations.

Primer pair	Mutational allele	Restriction site natural / created	Fragment size (bp) normal / mutant
C1N/C2	exon 1, p.P30L	- Pst I	195 164+31
C3B/C4A	In2G	- Sac I	115 85+30
C3B/C4A	exon 3, Del 8ntG110	- Rsa I	115 89+26
C5/C6	exon 4, p.I172N	- Mse I	159 130+29
C7D1/C8	exon 6, p.I236N	- Mbo I	114+26 140
C7E/C8	exon 6, p.V237E	- Taq I	140 116+24
C7C1/C8	exon 6, p.M239K	- Mse I	140 110+30
C9/C10-1	exon 7, p.V281L	ApaI -	116+101 217
C9A/C9B	exon 7, p.F306+T	- Mwo I	123+34 157
C11/C12	exon 8, p.Q318X	PstI -	146+51 197
C11/C12	exon 8, p.R356W	- Msc I	197 167+30

Table 1. ACRS detection of the *CYP21A2* point mutations (Lee HH et al., 1996)

In the Macedonian patients with 21-hydroxylase deficiency seven of the analyzed mutations were detected. The most frequent was In2G mutation detected on 64 alleles (33.3%), followed by p.P30L on 46 (23.9%) alleles, p.Q318X 16 (8.3%), p.I172N 15 (7.8%), p.V281L 8 (4.2%), Del8nt110 on 5 alleles (2.6%) and p.R356W mutation detected on 3 (1.6%) of the analyzed alleles. Six of the detected mutations in our patients are shown on Figure 3.

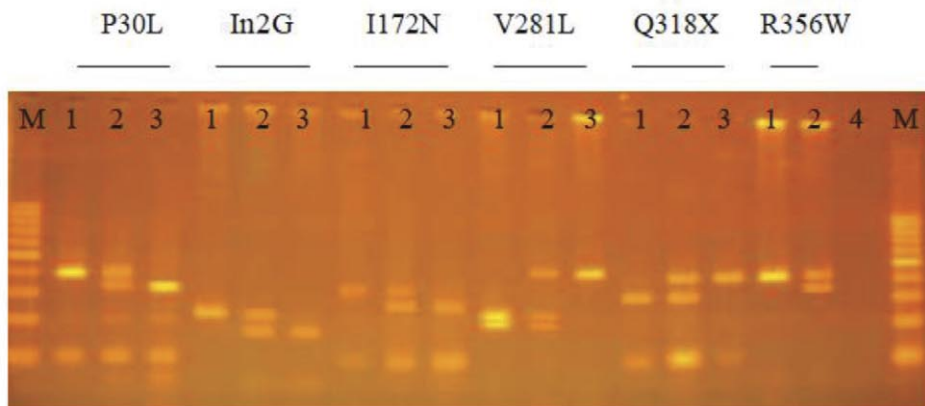


Figure 3. Detected *CYP21A2* mutations in Macedonian patients with 21-hydroxylase deficiency analyzed on 2% agarose gel; line 1 - healthy individuals, line 2 - heterozygotes for mutant allele, line 3 - homozygotes for mutant allele, line 4 - blank, M-marker (50 bp)

In one patient with clinical and biochemical findings for classical SW CAH, heterozygote for p.Q318X, direct DNA sequencing of the whole *CYP21A2* gene was performed to find the second mutant allele. Sequencing analysis confirmed severe nonsense p.Q318X (c.952C>T) mutation inherited from the mother, and detected a novel 9 bp deletion in exon 10, c.1271_1279delGTGCCCGCG (p.G424_R426del) inherited from the father (Figure 4). The novel variant results in deletion of glycine (codon 424), alanine (codon 425),

and arginine (codon 426) in the CYP21A2 protein. Deleterious effect of the novel variant on the protein function was confirmed with all of the three *in silico* prediction software tools: SIFT Indel, PROVEAN, and MutPred-Indel. SIFT Indel predicted damaging effect with confidence score of 0.894 using 3N_CP1 [56]. Three-dimensional molecular models of human CYP21A2 protein with close-up view of the region harboring novel variant, prepared using the PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4, Schrödinger, LLC is presented on the Figure 5 [56].

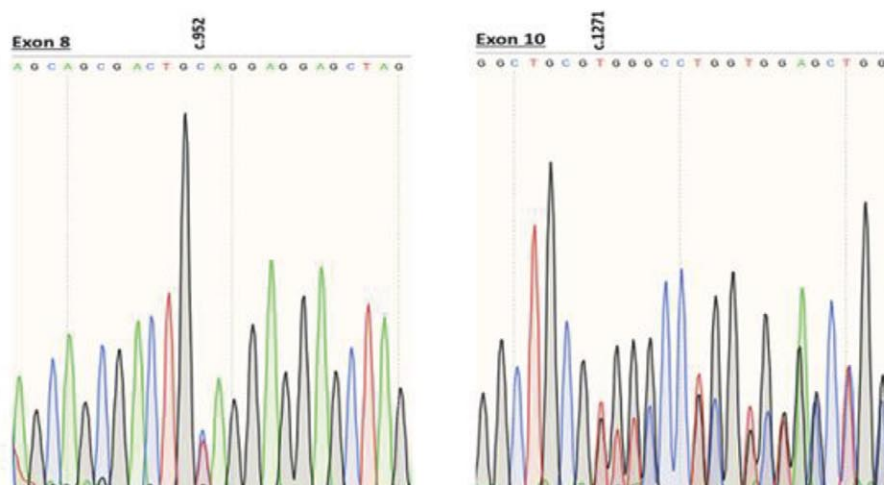


Figure 4. Results of Sanger sequencing analysis of the patient: heterozygous nonsense variant c.952C>T (p.Q318X) in exon 8 (left) and heterozygous 9 bp deletion c.1271_1279del (p.G424_R426del) in exon 10 (right). All identified nucleotide changes were numbered based on cDNA reference sequences and as recommended by the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>). GenBank accession numbers for the sequences used in the analysis was as follows:

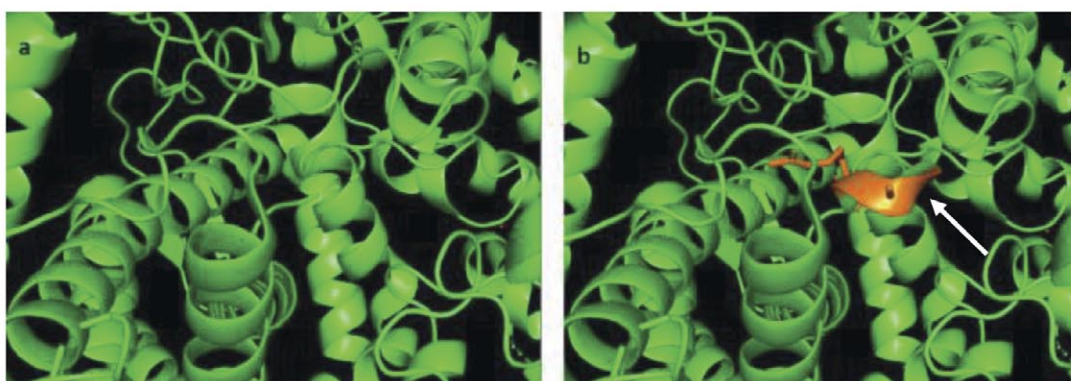


Figure 5. Three-dimensional molecular models of human CYP21A2 protein with close-up view of the region harboring novel variant. a. Mutated protein with deletion of three amino acids; b wt protein with the residues affected by deletion depicted in orange (arrow).

Genotype-phenotype correlation in Macedonian patients with 21-hydroxylase deficiency

In a total of 96 Macedonian patients with clinical presentation of 21-hydroxylase deficiency, complete genotype was detected in 68 (70.8%), heterozygotes were 19 (19.8%), while in 9 patients (9.4%) was not detected any of the analyzed mutations. Among the patients with a completely defined genotype, 44 (64.7%) were homozygotes, while 24 (35.3%) were compound heterozygotes with different mutations on both alleles (Table 2).

Regarding the clinical form of the disease, 22/24 (91.7%) of the SW patients were completely genotyped, of which 17 (77.3%) were homozygotes, and 5 (22.7%) were compound heterozygotes. In 2 (8.3%) SW patients none of the analyzed mutations was detected. The most common was In2G/In2G genotype detected in 58.3% of the patients (Table 2). One of the SW patients had a multiple allele with three mutations

- p.V281L, p.Q318X and p.R356W, inherited from the mother. In the other SW patient, heterozygote for nonsense p.Q318X mutation, *de novo* pathogenic variant 9-bp deletion in exon 10 of the *CYP21A2* gene was detected (Figure 4). All detected mutations in the SW patients were severe mutations thus good genotype-phenotype correlation in the completely genotyped patients was observed.

In the SV patients, 36/45 (80%) were completely genotyped, 6/45 (13.3%) were heterozygotes, while in 3 (6.7%) of the patients none of the analyzed mutations was detected. One half of the completely genotyped patients were homozygotes for the analyzed mutations, while the other half was compound heterozygotes. The most common was In2G/In2G genotype detected in 24.4% of the SV patients (Table 2). The p.I172N mutation as the most common cause of simple virilizing phenotype was detected in 3 SV patients in homozygous state and 7 compound heterozygotes patients. Interesting finding was presence of the mild p.P30L mutation on even 23/72 (31.9%) of the analyzed alleles in completely genotyped patients showing a simple virilizing phenotype. Discrepancy with phenotype was observed in the SV patient with p.P30L+p.V281L/p.V281L genotype comprising two mild mutations. In the other SV patients a concordance between genotype and phenotype was observed.

Among the 27 patients with LO form of the disease, completely defined genotype was observed in 10 (37%), 13 (48.2%) were heterozygotes, and none of the analyzed mutations was detected in 4 (14.8%). Nine of the completely genotyped patients were homozygotes, and one was compound heterozygote (Table 2). Genotype-phenotype correlation was observed in all of LO patients with exception in one with two severe mutations in the genotype (p.Q318X/p.Q318).

Allele 1 / Allele 2	SW patients	SV patients	LO patients
In2G / In2G	14	11	
p.Q318X / p.Q318X	2		1
Del 8ntG110 / Del 8ntG110	1		
In2G / p.Q318X	2		
p.R356W / Del 8ntG110	1		
In2G / p.V281L+p.Q318X+p.R356W	1		
p.Q318X / 9-bp Del (c.1271_1279del)	1		
p.I172N / p.I172N		3	
p.P30L / p.P30L		4	8
p.P30L / In2G		7	
p.P30L / p.I172N		5	
In2G / p.I172N		1	
p.Q318X / p.I172N		1	
p.P30L / p.Q318X		1	1
p.P30L / p.R356W		1	
p.P30L+ p.V281L / p.V281L		1	
Del 8ntG110 / p.V281L		1	
Total	22/24 (91.7%)	36/45 (80%)	10/27 (37%)

Table 2. Completely defined genotypes in Macedonian patients with 21-hydroxylase deficiency

Clinical issues

Patients affected by SW form have salt-wasting accompanied with hyperandrogenism. The mineralocorticoid deficiency is the origin of salt wasting clinically presented by vomiting, severe dehydration, hypovolemia, shock and if not treated urgently-death. The cortisol deficiency causes hypoglycemia and inability to manage stress, severe dehydration, hypoglycemia and failure to thrive during the first weeks of life. Hyperandrogenism is present and can be early clinically recognized in girls due to sexual ambiguity of external genitalia (clitoromegaly of different magnitude, sinus urogenitalis and rugged labia). Boys, on the other hand may first be identified, if not neonatally screened, when presenting with a life-threatening salt-wasting crisis within 2 weeks postnatally and larger and pigmented scrotum which is not always present [57].

In the SV form enough aldosterone is produced and salt-wasting crisis does not appear. Prior to the introduction of neonatal screening SV was identified due to clitoromegaly in newborn girls whereas in male toddlers due to signs and symptoms of excessive androgen production, such as advanced growth and early puberty. Diagnosis in adulthood occasionally happened [1,57]. Both SW and SV forms are easily detected by neonatal screening.

The NC form is mild and can appear with a various clinical picture, starting from rapid growth in childhood, advanced bone maturation, early pubic hair in boys and girls and precocious puberty. In girls LO form can present as aild virilization of genitalia during puberty, menstrual irregularity, anovulation up to polycystic ovary syndrome or isolated hyperandrogenism and decreased fertility [58]. NC 21-hydroxylase deficiency is sometimes identified in neonatal screening [59], but most cases are identified due to symptoms and signs in adolescence or young adulthood, even though the majority probably never gets diagnosed.

The type and the severity of the disease depend upon the present *CYP21A2* gene mutations as explained below. The diagnosis is made fairly easily in females with the severe form of CAH because of the ambiguous genitalia and salt wasting crisis as described above. Karyotype in these babies is 46,XX. In male newborns the diagnosis of CAH should be sought based upon the clinician's suspicion because the only sign of the condition might be a pigmentation of the genital area and enlarged penis. Accompanying hypovolemia with hyponatremia and high value of potassium together with high value of 17-OHP are a golden standard for diagnosis of CAH. The treatment should be started immediately without waiting for the genetic confirmation. If the neonatal screening for CAH has been performed, the onset of the disease is expected based on high levels of 17-OHP and early diagnosis is secured with the ACTH test. The initial confirmation of the less severe forms of the disease is performed measuring the level of 17-OHP by ACTH stimulation test. While the severe form would give high levels, any value above 30 nmol/L would be considered at risk of CAH and genetic diagnosis in those cases is indicated [1]. The less severe forms are present later in childhood with increased growth rate that might be missed by the physicians and early adrenarche. The measurement of the hormones will show hyperandrogenism, ACTH test will show increased levels of 17-OHP in which case, the genetic analysis for CAH is indicated. This is especially important in young girls with the menstrual irregularity accompanied with hirsutism or PCOS syndrome. Therefore, in these patients increased 17-OHP on ACTH test confirm the diagnosis of NCCAHA.

The therapy consists of hydrocortisone which prevents the shock, reduces adrenal hyperplasia and reduces overproduction of androgens. Mineralocorticoid replacement with 9-alfa fludrocortisone, and salt supplementation decrease the dehydration and shock. The doses are tapered according the 17-OHP levels and should be increased 2 to 3 times during emergencies such as severe infections, general anesthesia, operations or febrile illness. In adolescents and adults, the goal of treatment shifts to achieving normal

reproductive function and fertility while avoiding chronic complications of medication insufficiency or excess, including Cushing syndrome. Educating parents, caregivers, and older patients with CAH about the signs, symptoms, prevention, and emergency treatment of adrenal crises is an integral part of the management of CAH. All patients with CAH are advised to wear medical identification and have a glucocorticoid emergency injection kit for use in adrenal crises.

Surgery is not required for the majority of infants with mild forms of virilization. Infants with ambiguous genitalia need a surgical consult for corrective surgery. The risks and benefits of early versus delayed operation should be carefully discussed with the child's parents by a multidisciplinary team of specialists involving the pediatric endocrinologist, urologist, surgeon, and anesthesiologist. Surgery should only be done in centers that specialize in genitoplasty by experienced surgeons. The CAH patients require lifelong monitoring of the doses of glucocorticoids and mineralocorticoids as well as monitoring of the side effects of the therapy with these hormones.

Patients with CAH should have routine screening for cardiovascular and metabolic diseases as the general population. Couples carriers for *CYP21A2* mutations may prevent CAH through preimplantation genetic diagnosis. Prenatal treatment of pregnant mothers is not recommended and currently considered experimental [1].

When the disease is promptly diagnosed and treated, the prognosis is favourable for most patients. However, even though the physical deficits can be overcome, most patients have lifelong emotional issues that stem from ambiguous genitalia. Other problems that can occur in these patients include: infertility, short stature, female gender identity issues, virilization issues in women, and premature death when patients are not administered stress doses of corticosteroids/glucocorticoids during major surgery, trauma, or illness. In men, testicular adrenal rest tumor is a late complication causing sterility.

Conclusions

Based on 20 years our work with CAH patients, we believe that gene analysis in patients with CAH is epidemiologically and clinically important.

1. We have placed the molecular findings in Macedonian CAH patients in the European and world map of this disease. The specificities of the prevalence of different *CYP21A2* mutations might help clinicians to start early therapy if SW mutations are known to be most common in the population.
2. We have added for the first time the findings in the Roma population with its unique homogenous genotype to the European spectrum of genetic findings in CAH.
3. Some genotypes have also role in the therapeutic approach of the mild forms such as p.P30L where the early detection of CAH and follow up of the patient might significantly improve the outcome of the disease.
4. We have confirmed previous findings that p.P30L mutation is not always mild, and that reclassification as moderate mutation should be considered.
5. In genetic counseling, knowing the genotype of parents and siblings is very important for generally predicting the phenotype of the child to be born.

New molecular approaches can improve further our understanding of the function of *CYP21A2* mutations and provide better outcomes of CAH treatment.

Literature

1. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(11):4043-88. doi: 10.1210/jc.2018-01865.
2. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):245-91. doi: 10.1210/edrv.21.3.0398.
3. El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet.* 2017;390(10108):2194-210. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31431-9
4. Nordenström A, Falhammar H. Management of endocrine disease: Diagnosis and management of the patient with non-classic CAH due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2019;180(3):R127-R145. doi: 10.1530/EJE-18-0712. PMID: 30566904.
5. Hannah-Shmouni F, Morissette R, Sinaii N, Elman M, Prezant TR, Chen W, et al. Revisiting the prevalence of nonclassic congenital adrenal hyperplasia in US Ashkenazi Jews and Caucasians. *Genet Med.* 2017;19(11):1276-9. doi: 10.1038/gim.2017.46
6. Kocova M, Anastasovska V, Petlichkovski A, Falhammar H. First insights into the genetics of 21-hydroxylase deficiency in the Roma population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2021;95(1):41-46. doi: 10.1111/cen.14447
7. de Paula Michelatto D, Karlsson L, Lusa AL, Silva CD, Östberg LJ, Persson B, et al. Functional and structural consequences of nine *CYP21A2* mutations ranging from very mild to severe effects. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:4209670. doi: 10.1155/2016/4209670.
8. A. Wedell, Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Dev.* 2011;20:80-87. <https://doi.org/10.1159/000321223>
9. Parajes S, Quinteiro C, Domínguez F, Loidi L. High frequency of copy number variations and sequence variants at *CYP21A2* locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One.* 2008;3(5):e2138. doi: 10.1371/journal.pone.0002138
10. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 2003;349(8):776-88. doi: 10.1056/NEJMra021561
11. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:2841-5.
12. Gonçalves J, Friães A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(11):1-23. doi: 10.1017/S1462399407000300.
13. Tsai LP, Lee HH. Analysis of *CYP21A1P* and the duplicated *CYP21A2* genes. *Gene* 2012;506(1):261-2. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.045>
14. Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase *CYP21*, and tenascin *TNX* (the *RCCX* module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem.* 1999;274(17):12147-56. doi: 10.1074/jbc.274.17.12147
15. Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL, Chung EK, Jones KN, Sotos JF, et al. Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (*RCCX*) modules in caucasians. The load of *RCCX* genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease. *J Exp Med.* 2000;191(12):2183-96. doi: 10.1084/jem.191.12.2183
16. Narasimhan ML, Khattab A. Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. *Fertil Steril.* 2019;111(1):24-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.11.007
17. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2017;30(5):520-34. doi: 10.1016/j.jpag.2017.04.001
18. Concolino P, Mello E, Zuppi C, Capoluongo E. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: an update of new *CYP21A2* mutations. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(8):1057-62. doi: 10.1515/CCLM.2010.239
19. Kim JH, Kim GH, Yoo HW, Choi JH. Molecular basis and genetic testing strategies for diagnosing 21-hydroxylase deficiency, including CAH-X syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2023;28(2):77-86. doi: 10.6065/apem.2346108.054
20. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90(2):584-95. doi: 10.1172/JCI115897
21. Pignatelli D, Carvalho BL, Palmeiro A, Barros A, Guerreiro SG, Macut D. The Complexities in genotyping of congenital adrenal hyperplasia: 21-hydroxylase deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:432. doi: 10.3389/fendo.2019.00432
22. Claahsen-van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, Arlt W, Auchus RJ, Falhammar H, et al. Congenital adrenal hyperplasia-Current insights in pathophysiology, diagnostics, and management. *Endocr Rev.* 2022;43:91-159.

23. Dean B, Chrisp GL, Quartararo M, Maguire AM, Hameed S, King BR, et al. P450 oxidoreductase deficiency: A systematic review and meta-analysis of genotypes, phenotypes, and their relationships. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):dgz255. doi: 10.1210/clinem/dgz255
24. P. Concolino, A. Costella. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of CYP21A2 gene. *Mol Diagn Ther* 2018;22(3), 261-80. doi.org/10.1007/s40291-018-0319-y
25. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(3):1059-65. doi: 10.1210/jcem.85.3.6441
26. Bidet M, Bellanne-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, Laborde K, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency and 330 family members. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1570–8. doi: 10.1210/jc.2008-1582
27. Antal Z, Zhou P. Congenital adrenal hyperplasia: diagnosis, evaluation, and management. *Pediatr Rev.* 2009;30(7):e49-57. doi: 10.1542/pir.30-7-e49
28. Riedl S, Röhl FW, Bonfig W, Brämwig J, Richter-Unruh A, Fricke-Otto S, et al. Genotype/phenotype correlations in 538 congenital adrenal hyperplasia patients from Germany and Austria: discordances in milder genotypes and in screened versus prescreening patients. *Endocr Connect.* 2019;8:86–94
29. Livadas S, Dracopoulou M, Dastamani A, Sertedaki A, Maniati-Christidi M, Magiakou AM, et al. The spectrum of clinical, hormonal and molecular findings in 280 individuals with nonclassical congenital adrenal hyperplasia caused by mutations of the CYP21A2 gene. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;82(4):543-9. doi: 10.1111/cen.12543
30. Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JA, Azziz R. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: relationship between genotype and phenotype. *Mol Genet Metab.* 2000;71:527-34. doi: 10.1006/mgme.2000.3036
31. Anastasovska V, Kocova M. Genotype-phenotype correlation in CAH patients with severe CYP21A2 point mutations in the Republic of Macedonia. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2010;23(9), 921-6. <https://doi.org/10.1515/jpem.2010.147>
32. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(7):2611-6. doi: 10.1073/pnas.1300057110
33. Krone N, Rose IT, Willis DS, Hodson J, Wild SH, Doherty EJ, et al. Genotype-phenotype correlation in 153 adult patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: analysis of the United Kingdom Congenital adrenal Hyperplasia Adult Study Executive (CaHASE) cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E346-54. doi: 10.1210/jc.2012-3343
34. Haider S, Islam B, D'Atri V, Sgobba M, Poojari C, Sun L, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(7):2605-10. doi: 10.1073/pnas.1221133110
35. Neves Cruz J, da Costa KS, de Carvalho TAA, de Alencar NAN. Measuring the structural impact of mutations on cytochrome P450 21A2, the major steroid 21-hydroxylase related to congenital adrenal hyperplasia. *J Biomol Struct Dyn.* 2020;38(5):1425-34. doi: 10.1080/07391102.2019.1607560
36. Kanaan C, Zhang H, Shea EV, Hollenberg PF. Uncovering the role of hydrophobic residues in cytochrome P450-cytochrome P450 reductase interactions. *Biochemistry.* 2011;50(19):3957-67. doi: 10.1021/bi1020748
37. Anastasovska V, Milenkovic T, Kocova M. Direct molecular diagnosis of CYP21A2 point mutations in Macedonian and Serbian patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Med Biochem.* 2015;34 (1), p. 53-7.
38. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4205-14. doi: 10.1210/jc.2006-1645
39. Kocova M, Anastasovska V, Bitovska I, The impact of CYP21A2 (P30L/I172N) genotype on female fertility in one family. *Eur J Med Res* 2019;24(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40001-019-0379-4>
40. Tankoska M, Anastasovska V, Krstevska-Konstantinova M, Naydenov M, Kocova M. Therapeutic challenges in a patient with the simple virilizing (SV) form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to the P30L/I172N genotype. *JPEM.* 2019;32(5):543-547. doi.org/10.1515/jpem-2018-0285.
41. Minutolo C, Nadra AD, Fernández C, Taboas M, Buzzalino N, Casali B, et al. Structure-based analysis of five novel disease-causing mutations in 21-hydroxylase-deficient patients. *PLoS One.* 2011;6(1):e15899. doi: 10.1371/journal.pone.0015899
42. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol.* 1991;5(5):685-92. doi: 10.1210/mend-5-5-685

43. Araujo RS, Billerbeck AE, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TA. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(2):132-6. doi: 10.1111/j.1365-2265.2005.02184.x
44. Zhang HJ, Yang J, Zhang MN, Zhang W, Liu JM, Wang WQ, et al. Variations in the promoter of CYP21A2 gene identified in a Chinese patient with simple virilizing form of 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(2):201-7. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03356.x
45. Kocova M, Anastasovska V, Falhammar H. Clinical outcomes and characteristics of P30L mutations in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine*. 2020;69(2):262-77. doi: 10.1007/s12020-020-02323-3
46. Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP, Cohen JB. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(11): 4081-88.
47. Anastasovska V., Kocova M. Intron 2 splice mutation at CYP21 gene in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Republic of Macedonia. *BJMG*. 2010;13 (2), p. 27-33.
48. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: Possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(20): 7486-90.
49. Day DJ, Speiser PhW, Schulze E, Bettendorf M, Fitness J, Barany F, at al. Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR- based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Molec Genet* 1996;5(12): 2039-48.
50. Dolžan V, Stopar-Obreza M, Žerjav-Tanšek M, Breskvar K, Kržišnik C, Battelino T. Mutational spectrum of congenital adrenal hyperplasia in Slovenian patients: a novel Ala15Thr mutation and Pro30Leu within a larger gene conversion associated with a severe form of the disease. *Eur J Endocrinol* 2003;149(2): 137-144
51. Kocova M, Concolino P, Falhammar H. Characteristics of In2G variant of congenital adrenal hyperplasia due to 21-Hydroxylase deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;12:788812. doi: 10.3389/fendo.2021.788812
52. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
53. Lee HH, Chao HT, Ng HT, Choo KB. Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *J Med Gen*. 1996;33(5):371-375. <https://doi.org/10.1136/jmg.33.5.371>
54. Lee HH, Lee YJ, Lin CHY. PCR-based detection of the CYP21 deletion and TNXA/TNXB hybrid in the RCCX module. *Genomics*. 2004;83:944-950. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2003.11.006>
55. Xu Z, Chen W, Merke DP, McDonnell NB. Comprehensive mutation analysis of the CYP21A2 gene: an efficient multistep approach to the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Diagn*. 2013;15(6):745-53. doi: 10.1016/j.jmoldx.2013.06.001
56. Anastasovska V, Kocova M, Zdraveska N, Stojiljkovic M, Skakic A, Klaassen K, et al. A novel 9 bp deletion (c.1271_1279delGTGCCCGCG) in exon 10 of CYP21A2 gene causing severe congenital adrenal hyperplasia. *Endocrine*. 2021;73:196-202. doi.org/10.1007/s12020-021-02680-7
57. Gidlöf S, Falhammar H, Thilén A, von Döbeln U, Ritzén M, Wedell A, et al. One hundred years of congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a retrospective, population-based cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1(1):35-42. doi: 10.1016/S2213-8587(13)70007-X
58. Witchel SF, Azziz R. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2010;2010:625105. doi: 10.1155/2010/625105
59. Zetterström RH, Karlsson L, Falhammar H, Lajic S, Nordenström A. Update on the Swedish newborn screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6(3):71. doi: 10.3390/ijns6030071

GENETIKA AUTIZMA

Nina Marić^{1,2}, Jelica Predojević Samardžić^{1,2}, Dragana Malčić Zanić^{1,2}

¹ Klinika za dječije bolesti, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Bosna i Hercegovina

² Katerda za pedijatriju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banja Luci, Banja Luka, Bosna i Hercegovina

Kontakt: ninamaric.bl@gmail.com; nina.maric@kc-bl.com

APSTRAKT

Autizam predstavlja heterogenu grupu neurorazvojnih poremećaja koji karakterišu problemi u društvenoj interakciji i komunikaciji, kao i prisustvo repetitivnih radnji i stereotipnog ponašanja. Tokom posljednje tri decenije došlo je do dramatičnog povećanja broja dijagnostikovanih slučajeva. Danas se smatra da autizam ima više od 2% djece, dominantno dječaka. Rana detekcija ovog poremećaja doprinosi ranom tretmanu, a samim tim, i boljem ishodu liječenja. Paralelno sa porastom broja oboljelih, raste i zainteresovanost javnosti i naučne zajednice za ovaj poremećaj, u prvom redu za njegovu etiologiju. Iako ona nije velikim dijelom rasvijetljena, pouzdano se zna da autizam ima snažnu i složenu genetsku komponentu. Zahvaljujući savremenim genetičkim analizama, poput komparativne genomske hibridizacije i sekvenciranja cijelog egzoma i genoma, genetsku etiologiju autizma je danas moguće utvrditi kod 30-40% slučajeva. Autizam je dio kliničke slike desetina različitih sindroma, a otkriveno je više stotina gena koji predstavljaju faktore rizika za njegov nastanak, koji vjerovatno igraju i ključnu ulogu u modulaciji širokog fenotipskog spektra ovog poremećaja. Sa porastom broja oboljelih raste i broj djece i članova njihovih porodica koji se u traganju za etiološkom dijagnozom i genetičkim savjetom javljaju u službe kliničke genetike. Postavljanje precizne dijagnoze genetičkim analizama može modifikovati terapijski pristup, poboljšavati ishod i omogućiti roditeljima da bolje razumiju bolest i koliki je rizik od recidiva za porodicu. U ovom članku dat je pregled naučnih saznanja o genetici autizma i aktuelne smjernice za genetička testiranja ovog poremećaja.

Ključne reči: autizam, etiologija, genetika

GENETICS OF AUTISM

Nina Marić^{1,2}, Jelica Predojević Samardžić^{1,2}, Dragana Malčić Zanić^{1,2}

¹ Clinic for Children's Diseases, UKC Republic of Srpska, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

² Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

Correspondence: ninamaric.bl@gmail.com; nina.maric@kc-bl.com

ABSTRACT

Autism represents a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders characterised by problems in social interaction and communication, as well as the presence of repetitive movements and stereotyped behaviour. During the last three decades, there has been a dramatic increase in the number of diagnosed cases. Today, it is considered that more than 2% of children, predominantly boys, have autism. Early detection of this disorder contributes to early treatment and, therefore, to a better treatment outcome. Parallel to the increase in the number of patients, the interest of the public and the scientific community in this disorder, primarily in its etiology, is also growing. Although it is not largely illuminated, it is reliably known that autism has a strong and complex genetic component. Thanks to modern genetic analyses, such as comparative genomic hybridisation and whole exome and genome sequencing, the genetic etiology of autism can now be determined in 30-40% of cases. Autism is part of the clinical picture of dozens of different syndromes, and hundreds of genes have been discovered that represent risk factors for its origin, which probably play a key role in the modulation of a wide phenotypic spectrum of this disorder. With an increase in the number of patients, there is a growing number of children and their family members who come to clinical genetics services in search of etiological diagnosis and genetic counselling. Establishing a precise diagnosis by genetic analysis can modify the therapeutic approach, improve the outcome and allow parents to better understand the disease and what the recurrence risk is for the family. This article provides an overview of scientific knowledge about the genetics of autism and current guidelines for genetic testing of this disorder.

Key words: autism, etiology, genetics

Uvod

Autizam ili poremećajem iz spektra autizma, kako se naziva prema posljednjoj klasifikaciji Dijagnostičkog i statističkog priručnika za mentalne poremećaje (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*; DSM-5) Američkog udruženja psihijatar, predstavlja neurorazvojni poremećaj koji karakterišu poteškoće u društvenoj komunikaciji, odnosno interakciji, te ograničeni i ponavljajući obrasci ponašanja, interesa i aktivnosti [1]. Pored toga, 31-33% osoba sa ovim poremećajem ima mentalnu zaostalost [2, 3], a 20–37% epilepsiju [4, 5]. Važno je naglasiti da je riječ o razvojnem poremećaju čija se klinička slika tokom života mijenja, kao i da je riječ o spektru poremećaja, odnosno o izrazito heterogenoj kategoriji sa vrlo različitim manifestacijama i varijabilnom težinom.

Reč „autizam“ prvi je upotrijebio švajcarski psihijatar Eugen Bleuler 1911. godine definišući simptome shizofrenije. Naziv potiče od grčke reči „autós“ koja označava sam. Time je ovaj psihijatar želio da ukaže na „autistično povlačenje pacijenta u svoje maštarije, protiv kojih svaki vanjski uticaj postaje nepodnošljiva smetnja“ [6]. Moderno značenje riječ „autizam“, kao poremećaj koji se posmatra odvojeno od šizofrenije, dobija 1943. godine kada je američki dječiji psihijatar Leo Kanner opisao 11 djece koja su imala značajne poteškoće u društvenim interakcijama i prilagođavanju promjenama, osjetljivosti na podražaje, otpor hrani i eholaliju [7]. Gotovo u isto vrijeme, bečki psihijatar Hans Asperger je opisao sličan, ali nešto blaži, oblik autizma [8], koji će po njemu 1981. godine Lorna Wing nazvati Aspergerov sindrom [9]. Iako se termin „Aspergerov sindrom“ i dalje često može čuti, od 2013. godine on je zvanično povučen, prvenstveno da se ne bi stvarao pogrešan utisak da se radi o posebnom oboljenju, a ne o autizmu. Sada se ovaj poremećaj, prema DMS-5 klasifikaciji, naziva nivo 1 poremećaja iz spektra autizma [10].

Prevalencija autizma je u stalnom brzom porastu [11-14]. U posljednjih 30 godina, u Sjedinjenim Američkim Državama došlo je do povećanja prijavljene prevalencije 20 puta [14]. Danas se smatra da ga ima 1 od 44 djece, odnosno više od 2% [15]. Osim istinskog povećanja prevalencije, i niz drugih razloga doprinose povećanom broju dijagnostikovanih slučajeva, poput proširenja definicije autizma, promjene dijagnostičkih kriterija i alata za skrining, promjena u metodama istraživanja i povećane svijesti o ovom poremećaju [16-18].

Za njegovu tačnu dijagnozu koriste se takozvani psihometrijski instrumenti koji predstavljaju „zlatni standard“, odnosno standardizovani intervjui sa roditeljima (*Autism Diagnostic Interview-Revised*, ADI-R), u kombinaciji sa polustrukturiranim, standardizovanim posmatranjem [13, 19-21].

Trenutni standard liječenja djece sa autizmom su rane intervencije, koje se fokusiraju na poboljšanje društvenog funkcionisanja, jezičnih i komunikacijskih vještina, te su efikasne u poboljšanju dugoročnog ishoda. Shodno tome, identifikacija male djece sa autizmom i pristup ranim intervencijama za ovu djecu je od suštinskog značaja. U većini zapadnih zemalja pravovremena dijagnoza autizma takođe omogućava oboljelima i njihovim porodicama pristup zdravstvenim i socijalnim uslugama specifičnim za ovaj poremećaj.

Polne razlike

Poznato je da se autizam 4-5 puta češće dijagnostikuje kod dječaka nego kod djevojčica [3, 22, 23]. Kao mogući razlozi navodi se rjeđe prepoznavanje poremećaja kod djevojčica jer one češće pokazuju depresivna i izbjegavajuća ponašanja, dok se kod dječaka češće nalaze hiperaktivnost i ponavljajuće radnje zahvaljujući kojima se lakše prepoznaju [24]. Zato kod djevojčica ne samo da se često autizam ne prepoznaje, odnosno prepoznaje se značajno kasnije u odnosu na dječake, već one češće dobijaju pogrešne dijagnoze [25, 26].

Moguće objašnjenje za rjeđu pojavu autizma kod djevojčica je i smanjena osjetljivost ženskog pola na ovaj poremećaj. Naime, utvrđeno je da je kod njih prosječno značajno veće mutacijsko opterećenje od onog koji se nalazi kod dječaka sa autizmom [27, 28]. Istraživanje na skoro 10 000 dizigotičnih blizanaca sa autizmom pokazalo je da braća i sestre djevojčica sa autizmom razvijaju značajno teže simptome od braće i sestara dječaka sa autizmom [29]. Brojni su i primjeri zdravih majki koje nose istu genetsku promjenu, poput duplikacije regiona 15q11-q13, kao njihovi sinovi sa autizmom [30, 31]. Manja učestalost autizma kod djevojčica bi se mogla objasniti i „zaštitničkom“ ulogom estrogena o kom govore istraživanja na životinjama [32]. Constantino i Todd su proučavajući 788 parova blizanaca zaključili da bi razlog „zaštićenosti“ ženskog spola mogao ležati u većoj osjetljivosti na faktore koji potiču društvenu kompetenciju u ranom periodu razvoja [33]. Ovi autori, kao i mnogi drugi prije njih, nisu našli da postoje polne razlike kada je u pitanju skup gena za koje se vjeruje da su povezani sa razvojem autizma [33].

Postoji više mogućih objašnjenja za teoriju da je autizam češći kod dječaka zbog veće osjetljivosti muškog pola. Jedna od njih je da je kod muškog pola generalno veća ekspresija gena vezanih za autizam, poput regulatora hromatina i gena povezanih sa imunološkim procesima [34, 35]. U prilog toj teoriji govori i otkriće molekularnih promjena unutar signalnog puta receptora estrogena u mozgu kod osoba sa autizmom [36].

Genetska osnova autizma

Od prvih opisa autizma, naučnike i javnost je interesovala njegova etiologija. Iako je ona i dalje velikim dijelom nepoznata, rezultati studija govore da se radi o multifaktorijalnom poremećaju, gdje u njegovom nastanku igraju ulogu i genetski i faktori sredine, kao i njihove složene međusobne interakcije [37].

Šezdesetih godina prošlog vijeka za njegov nastanak okrivljivali su se faktori sredine, prvenstveno majke za koje se tvrdilo da ne pružaju dovoljno topline djeci i da se zbog toga kod djece ne razvijaju socijalne interakcije [38]. Istraživanje genetike autizma počinje 1977. godine kada su Folstein i Rutter objavili za to vrijeme zapanjujući rezultat studije na blizancima, a koji dokazuje da autizam ima genetsku komponentu [39]. Njihovo istraživanje je uključivalo 21 par blizanaca, 10 dizigotičnih i 11 monozigotičnih. I dok kod dizigotičnih blizanaca niti u jednom slučaju autizam nije zabilježen kod drugog blizanca, među parovima monozigotičnih blizanaca kod njih 36% je autizam bio dijagnostikovao kod oba blizanca [39]. I druge studije na blizancima su potvrdile da postoji razlika u stopi autizma između monozigotičnih i dizigotičnih blizanaca [40, 41]. Heritabilnost kod autizma prema rezultatima meta-analize blizanačkih studija iznosi između 60% i 90% [42]. I porodične studije su dale sličan rezultat. Prema studijama sprovedenim u Sjedinjenim Američkim Državama heritabilnost ovog poremećaja se smatra da iznosi između 83% i 92% [43, 44]. Još jedan dokaz da genetski faktori igraju ulogu u nastanku autizma je duplo veći povratni rizik kod braće i sestara koji imaju oba zajednička roditelja u odnosu na rizik koji imaju polubraća i polusestre [45].

Genomske tehnologije omogućile su identifikaciji stotina gena koji se povezuju sa idiopatskim autizmom. Njihove rijetke varijante koje imaju veliki i česte varijante koje imaju mali efekat zajednički doprinose riziku za nastanak autizma [46]. Pored toga, varijacije broja kopija, polimorfizmi jednog nukleotida i epigenetske mutacije smatra se da igraju ključnu ulogu u modulaciji fenotipskog spektra ovog poremećaja [47]. Među gene koji se povezuju sa autizmom, ubrajaju se *CACNA1C*, *CHD8*, *CNTNAP2*, *DYRK1A*, *FMR1*, *FOXP1*, *FOXP2*, *GRIN2B*, *MECP2*, *NLGN4*, *NRXN1*, *PTCHD1*, *PTEN*, *RELN*, *SCN2A*, *SHANK2*, *SHANK3* i *SYNGAP1* [48]. Utvrđeno je i da epigenetske mutacije imaju značaj za nastanak autizma. Identifikovano je nekoliko hromozomskih regiona pod transkripcijskom regulacijom ili majčinog ili očevog alela. Tako je kod Turnerovog sindroma utvrđeno da nastanak autizma ovisi o porijeklu hromozoma X [49]. Utvrđeno je i da su za nastanak autizma značajni uticaji

faktora sredine na fetus, poput gestacijskog dijabetesa, krvarenja i infekcije kod majke i uzimanje određenih lijekova [49, 50]. Međutim, unatoč ovim otkrićima i mnogobrojnim studijama, uključujući i studije na životinjskim modelima [51], čini se da još nije sa sigurnošću identifikovan nijedan jedinstveni uzrok ili biomarker autizma [52, 53]. Genetska osnova autizma se čini vrlo složena i ne slijedi, bar ne u većini slučajeva, Mendelova pravila nasljeđivanja.

U evaluaciji uzroka autizma, važno je napraviti razliku između nesindromskog ili idiopatskog autizma i sekundarnog ili sindromskog autizma, koji predstavlja dio kliničke slike nekog sindroma ili oboljenja, poput hromozomskih poremećaja, poremećaja broja kopija i monogenskog oboljenja. Hromozomski poremećaji, vidljivi klasičnom tehnikom kariotipizacije, se mogu otkriti kod malog broja osoba s autizmom, ali je njih obično lako prepoznati jer najčešće imaju dizmorfiju, anomalije i druge razvojne probleme [54]. Strukturne aberacije kod djece sa autizmom su opisane na svim hromozomima i uključuju delecije, duplikacije, inverzije, translokacije kao i marker hromozome. Najčešća takva aberacija je duplikacija 15q11-q13 koja se nalazi kod 1-4% djece sa autizmom [55, 56]. U navedenom regionu nalazi se više gena koji imaju značajnu ulogu u aktivnostima u mozgu, poput *GABRA5* i *GABRB3* (GABA receptori), *UBE3A* i *HERC2* (komponente proteazom kompleksa), *SNRPN* (ribonukleoprotein peptid N) i *CYFIP1* (FMRP interaktivni protein). Iako duplikacija 15q11-q13 može biti različite veličine, najčešće je veća od 5 Mb, te se može detektovati klasičnom tehnikom kariotipizacije [57]. U većini slučajeva ona je novonastala *de novo*, majčinog je porijekla i potpuno je penetrantna za autizam. Nastaje kao rezultat postojanja izodicentričnog hromozoma 15 u 80% slučajeva, a u 20% slučajeva u pitanju je intersticijalna duplikacija navedenog regiona. Kod osoba sa duplikacijom 15q11-q13 se opisuju i mentalna zaostalost, kašnjenje u motoričkom razvoju i epilepsija. U hromozomske poremećaje kod kojih se opisuju autizam ubrajaju se i aneuploidije hromozoma 21 (sindrom Down), X (sindromi Turner, Klinefelter i XXX) i Y (sindrom XYY) [54, 58].

Poremećaji broja kopija (eng. *copy number variations*; CNV), mikroleucije i mikroduplikacije, nalaze se kod 7-14% osoba sa idiopatskim autizmom i normalnim nalazom kariotipa [59-61]. One se mogu detektovati komparativnom genomskom hibridizacijom, tj. hromozomskim mikroerejom. Mnoge studije su utvrdile da se uz pomoć ove analize molekularna dijagnoza može postaviti kod oko 10-20% osoba sa autizmom [62-65]. Rijetke novonastale CNV češće se nalaze kod sporadičnih nego kod porodičnih slučajeva autizma (10% na prema 3%) [66]. Većina CNV detektovanih kod osoba sa autizmom je sporadična i nerekurantna, što govori u prilog genetske heterogenosti ovog poremećaja [62]. Najčešća rekurentna CNV, nađena kod oko 1% osoba sa autizmom, je mikroleucija 16p11.2. U druge CNV povezane sa autizmom ubrajaju se mikroleucije regiona 1q21.1, 15q13.3, 17p11.2, 22q11.2 i 16p13.1 i mikroduplikacija 7q11.23, a među nerekurantnim CNV kod autizma spadaju mikroleucije 2p16.3, 7q22q31, 22q13.3 i Xp22 [48]. Novonastale CNV nađeno je da su predominantno očevog porijekla i da se njihova učestalost povećava sa godinama oca [67, 68].

Smjernice za genetička testiranja kod autizma i uloga kliničkog genetičara

Porast broja djece sa autizmom prati i porast broja onih koji se javljaju u službe kliničke genetike u potrazi za etiološkom dijagnozom i genetičkim savjetom. Zahvaljujući savremenim tehnologijama, poput komparativne genomske hibridizacije i sekvenciranja cijelog egzoma i genoma, genetsku etiologiju autizma je danas moguće utvrditi kod 30-40% slučajeva [69].

Prilikom odlučivanja o planu evaluacije, klinički genetičar treba da napravi ravnotežu između sve šire liste dostupnih analiza i mogućih dijagnoza s pitanjima cijene, praktičnosti i očekivanog doprinosa

genetičkog testiranja. Ova razmatranja treba dodatno izbalansirati s prednostima postavljanja precizne dijagnoze, kao što su mogućnosti mijenjanja terapijskog pristupa, poboljšavanja ishoda i davanje specifične informacije o riziku od recidiva za porodicu.

U toku procesa ispitivanja, klinički genetičar treba da usko sarađuje sa pedijatrom na primarnom nivou zdravstvene zaštite, odnosno sa ljekarom porodične medicine kada su u pitanju stariji pacijenti, koji je često i prvi postavio sumnju na autizam.

Zbog višestruke koristi koju oboljeli i njegova porodica mogu da imaju od postavljanja etiološke dijagnoze autizma, preporuka Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku (ACMG) je da se o genetičkom testiranju, o očekivanjima i mogućim ishodima testiranja, treba razgovarati sa svim pacijentima sa ovim poremećajem i njihovim porodicama prije nego se daju konkretne preporuke [69].

Od ključne je važnosti da se prvo postavi dijagnoza autizma od strane psihijatra [69]. Diferencijalna dijagnoza ovog poremećaja uključuje selektivni mutizam, poremećaj govora i socijalne (pragmatične) komunikacije, Rettov sindrom, šizofreniju, poremećaj sa stereotipnim pokretima, poremećaj pažnje i hiperaktivnost (engl. *attention-deficit hyperactivity disorder*; ADHD) i mentalnu zaostalost bez poremećaja iz spektra autizma [1]. Rettov sindrom više nije grupisan sa autizmom u DSM-5, zbog svoje karakteristične kliničke prezentacije i poznatog uzroka, tj. patogene varijante u genu *MECP2*. Autizam koji se nalazi kod oboljelih od Rettovog sindroma se danas naziva poremećajem iz spektra autizma povezan sa Rettom sindromom. Ista terminologija se koristi i za autizam koji je dio kliničke slike genetskih poremećaja poput sindroma delecije 22q11.2, Angelman, CHARGE, fragilni X hromozom, de Lange, Prader-Willi, Smith-Lemli-Opitz, Smith-Magenis i Sotos, kao i tuberozne skleroze i bolesti vezanih za gene *PTEN* i *MED12* i mnogih drugih [70]. Važno je prepoznati ove sindromske forme autizma, jer se kod njih genetičke analize, plan liječenja i genetičko informisanje porodice razlikuju od onih koji se preporučuju kod izolovane forme. Prije razmatranja genetičkog testiranja, neophodno isključiti i značajan gubitak sluha.

Kod djeteta sa autizmom, klinički genetičar treba da napravi kompletan klinički pregled sa posebnim osvrtom na dismorfne karakteristike i detaljno analizira ličnu i porodičnu anamnezu koja uključuje posljednje tri generacije. Koristeći svoje znanje i iskustvo, on može da napravi razliku između izolovanog i sindromskog tipa autizma. Kada se postavi sumnja da se radi o autizmu kao jednoj od manifestacija sindromskog poremećaja, predlaže se ciljano testiranje za taj poremećaj i to genetičkim analizama, ukoliko su dostupne, ili korištenjem prihvaćenih kliničkih kriterija i/ili laboratorijskog ispitivanja. Potrebno je posebnu pažnju obratiti na simptome i znake metaboličkog oboljenja, poput epizoda letargije, cikličnog povraćanja, hipotonije, distonije, usporenog rasta, poremećaja acidobaznog statusa, porasta laktata i slično. Ukoliko su prisutni, savjetuje se upućivanje djeteta specijalisti metabologu. Ukoliko se postavi dijagnoza poremećaja kod koga se opisuje autizam, dalja evaluacija u cilju traganja za njegovim uzrokom nije potrebna. Međutim, ukoliko se utvrdi da pacijent ima poremećaj za koji nije sigurno da može biti razlog autizma, savjetuju se dalja ispitivanja.

U suprotnom, kada se na osnovu anamneze i pregleda ne posumnja na sindromski poremećaj, odnosno kada je riječ o nesindromskom ili idiopatskom slučaju autizma, ACMG savjetuje višestepenu evaluaciju, dizajniranu tako da testovi izvedeni u prvom krugu ispitivanja imaju veću vjerovatnoću da daju pozitivan rezultat, ali i manju invazivnost testiranja i lakšu upotrebu [69]. U svim slučajevima se prvo savjetuje uraditi hromozomski mikroerej, odnosno komparativnu genomsku hibridizaciju [71-73]. Testiranje na sindrom fragilnog X hromozoma se savjetuje kod svih dječaka, a kod djevojčica samo ukoliko postoje klinički znaci i/ili opterećena porodična anamneza u njegovom pravcu koja uključuje i prijevremenu insuficijenciju

ovarijuma [69, 74]. Trenutno se procjenjuje da klasične tehnike kariotipizacije mogu otkriti hromozomske aberacije kod samo 2-5% osoba s autizmom [54]. Iz tog razloga se analiza hromozoma klasičnom tehnikom kariotipizacije savjetuje samo u slučaju sumnje na aneuploidije [48].

Ukoliko se dobiju normalni rezultati ovih testova, u drugom krugu se predlaže uraditi analizu *MECP2* gena metodom sekvenciranja kod svih djevojčica, analizu na duplikaciju *MECP2* gena kod dječaka sa fenotipskim karakteristikama ovom poremećaja, a analizu *PTEN* gena kod oba pola u slučaju makrocefalije [69, 74]. U ovom krugu se savjetuje razmotriti sekvenciranje cijelog egzoma ili genoma, posebno u slučajevima sa mentalnom zaostalošću [75]. U slučaju negativnih rezultata svih ovih testiranja, predlažu su periodične evaluacije fenotipa i naučnih saznanja i razmatranje dodatnih analiza.

Po završetku testiranja, genetičko informisanje treba ponuditi svima, bez obzira da li je utvrđena etiologija autizma ili ne. Za one bez identifikovane etiologije, daju se informacije o empirijskom riziku. Na osnovu rezultata mnogobrojnih istraživanja na ovu temu, rizik od recidiva za braću i sestre iznosi 3-10%, a prema novijim istraživanjima i do 19% [76-78]. Modifikovan prema polu, ovaj rizik iznosi 7% ako je dijete sa autizmom ženskog pola i 4% ako je muškog pola. Ako autizam ima više djece, rizik za naredno dijete je značajno veći i iznosi najmanje 30%.

Treba reći da i uprkos svim smjernicama za genetičko testiranje, zasnovanim na jakim naučnim dokazima, rezultati istraživanja govore da se ona rade samo kod jednog dijela djece sa autizmom, čak i u razvijenim zemljama. Prema nedavno objavljenim rezultatima istraživanja u Španiji, kod samo 56% djece sa autizmom su urađena genetička testiranja i genetska etiologija je otkrivena kod njih 17,5 %, češće u slučaju kada je postojala i mentalna zaostalost i dizmorfija [56]. Zanimljivo je da su kod samo 28% dječaka sa autizmom urađeni hromozomski mikroerej i analiza na sindrom fragilnog X hromozoma [56]. Kao moguće razloge za ovako mali procenat djece koja se upućuju na genetička testiranja, autori navode neupućenost pedijataru u aktuelne smjernice o genetičkom testiranju, visoku cijenu analiza i dugo vrijeme čekanja na pregled kod kliničkog genetičara. Stoga bi ulaganjem u edukaciju pedijataru i rješavanjem problema u vezi s dostupnosti genetičara i obezbjeđivanjem sredstava za genetičko testiranje bilo od velike koristi kako za oboljelo dijete tako i za njegovu porodicu i društvo u cjelini.

Naša iskustva

Porast broja djece sa autizmom je evidentan i u našoj zemlji. Nepoznavanje njegovog uzroka, nedostatak stručnih informacija u medijima i strah od bolesti, doveo je do toga da roditelji gube povjerenje u zdravstveni sistem, uskraćuju djeci vakcinaciju i pribjegavaju nepriznatim, neispitanim i potencijalno štetnim alternativnim metodama liječenja. S druge strane, u Republici Srpskoj, u Univerzitetskom kliničkom centru, su na raspolaganju djeci sa autizmom i njihovim porodicama služba kliničke genetike i genetsko savjetovanište. Zahvaljujući saradnji ove službe sa inostranim centrima i sredstvima Fonda solidarnosti za dijagnostiku i liječenje oboljenja, stanja i povreda djece u inostranstvu, kod djece sa autizmom mi možemo uraditi sve smjernicama preporučene analize i porodici dati genetičke informacije. Zato smatramo da bi povećanje svijesti o genetici autizma imalo u ovom momentu najveću korist kada je u pitanju postavljanje etiološke dijagnoze kod ove grupe pacijenata, ali i rad na povećanju broja kliničkih genetičara i genetičkih analiza koje se rade u zemlji.

LITERATURA

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Philadelphia: American Psychiatric Association; 2013.
2. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ.* 2018 Apr 27;67(6):1-23.
3. Zeidan J, Fombonne E, Scora J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res.* 2022 May;15(5):778-790.
4. Canitano R. Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2007 Feb;16(1):61-6.
5. Yasuhara A. Correlation between EEG abnormalities and symptoms of autism spectrum disorder (ASD). *Brain Dev.* 2010 Nov;32(10):791-8.
6. Bleuler E. *Dementia Praecox oder Gruppe der Schizophrenien.* Leipzig, Germany: Deuticke; 1911.
7. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr.* 1968;35(4):100-36.
8. Hans Asperger, "'Autistic Psychopathy' in Childhood," in *Autism and Asperger Syndrome*, edited by Uta Frith (Cambridge: Cambridge University Press, 1991), 37-92. Originally published as "Die 'Autistischen Psychopathen' im Kindesalter," *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 117 (1944):76-136.
9. Wing L. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol Med.* 1981 Feb;11(1):115-29.
10. American Psychiatric Association. Anxiety disorders. In *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. Philadelphia: American Psychiatric Association; 2013.
11. Bachmann CJ, Gerste B, Hoffmann F. Diagnoses of autism spectrum disorders in Germany: time trends in administrative prevalence and diagnostic stability. *Autism.* 2018;22(3):283-290.
12. Blumberg SJ, Bramlett MD, Kogan MD, Schieve LA, Jones JR, Lu MC. Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011–2012. *Natl Health Stat Report.* 65.2013;1-12.
13. Kamp-Becker I, Poustka L, Bachmann C, Ehrlich S, Hoffmann F, Kanske P, et al. Study protocol of the ASD-Net, the German research consortium for the study of Autism Spectrum Disorder across the lifespan: from a better etiological understanding, through valid diagnosis, to more effective health care. *BMC Psychiatry.* 2017;17(1):206.
14. Kogan MD, Vladutiu CJ, Schieve LA, Ghandour RM, Blumberg SJ, Zablotsky B, et al. The Prevalence of Parent-Reported Autism Spectrum Disorder Among US Children. *Pediatrics.* 2018 Dec;142(6):e20174161.
15. Maenner MJ, Shaw KA, Bakian AV, Bilder DA, Durkin MS, Esler A, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR Surveill Summ.* 2021;70(11):1-16.
16. Durkin MS, Maenner MJ, Baio J, Christensen D, Daniels J, Fitzgerald R, et al. Autism spectrum disorder among US children (2002–2010): socioeconomic, racial, and ethnic disparities. *Am J Public Health.* 2017;107(11):1818-1826.
17. Durkin MS, Wolfe BL. Trends in autism prevalence in the US: A lagging economic indicator? *J Autism Dev Disord.* 2020;50(3):1095-1096.
18. Nevison CD, Blaxill M. Diagnostic substitution for intellectual disability: a flawed explanation for the rise in autism. *J Autism Dev Disord.* 2017;47(9):2733-2742.
19. Bölte S, Rühl D, Schmötzer G, Poustka F. ADI-R. Diagnostisches Interview für Autismus - Revidiert. Deutsche Fassung des Autism Diagnostic Interview - Revised von Michael Rutter, Ann Le Couteur und Catherine Lord. 1. Auflage. Bern: Hans Huber; 2006.
20. Rühl D, Bölte S, Feinein-Matthews S, Poustka F. ADOS, Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen. 1. Bern: Hans Huber; 2004.; National Institute for Health and Care Excellence. Autism: recognition, referral and diagnosis of children and young people on the autism spectrum (NICE guideline). 2011. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg128>. Accessed 10 Sep 2024.
21. National Institute for Health and Care Excellence. Autism: recognition, referral and diagnosis of children and young people on the autism spectrum (NICE guideline). 2011. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg128>. Accessed 10 Sep 2024.
22. Guldberg K, Ashbee E, Kossyvakis L, Bradley R, Basulayyim A: Meeting the Needs of Pupils with Autism: Moving forward. In, Report of WISE, Qatar, 2017.
23. Munir KM, Lavelle TA, Helm DT, Thompson D, Prestt J, Azeem MW. Autism: A global framework for action. In, Report of the World Innovation Summit for Health, Doha, 2016.

24. Werling DM, Geschwind DH. Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol*. 2013 Apr;26(2):146-53.
25. Malwane MI, Nguyen EB, Trejo S Jr, Kim EY, Cucalón-Calderón JR. A Delayed Diagnosis of Autism Spectrum Disorder in the Setting of Complex Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Cureus*. 2022 Jun 10;14(6):e25825.
26. Rynkiewicz A, Janas-Kozik M, Słopeń A. Girls and women with autism. *Dziewczęta i kobiety z autyzmem*. *Psychiatr Pol*. 2019;53(4):737-752.
27. Jacquemont S, Coe BP, Hersch M, Duyzend MH, Krumm N, Bergmann S, et al. A higher mutational burden in females supports a "female protective model" in neurodevelopmental disorders. *Am J Hum Genet*. 2014 Mar 6;94(3):415-25.
28. Desachy G, Croen LA, Torres AR, Kharrazi M, Delorenze GN, Windham GC, et al. Increased female autosomal burden of rare copy number variants in human populations and in autism families. *Mol Psychiatry*. 2015 Feb;20(2):170-5.
29. Robinson EB, Lichtenstein P, Anckarsäter H, Happé F, Ronald A. Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 26;110 (13):5258-62.
30. Cook EH Jr, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, et al. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet*. 1997 Apr;60(4):928-34.
31. Gurrieri F, Battaglia A, Torrisi L, Tancredi R, Cavallaro C, Sangiorgi E, et al. Pervasive developmental disorder and epilepsy due to maternally derived duplication of 15q11-q13. *Neurology*. 1999 May 12;52(8):1694-7.
32. Macrì S, Biamonte F, Romano E, Marino R, Keller F, Laviola G. Perseverative responding and neuroanatomical alterations in adult heterozygous reeler mice are mitigated by neonatal estrogen administration. *Psychoneuroendocrinology*. 2010 Oct;35(9):1374-87.
33. Constantino JN, Todd RD. Autistic traits in the general population: a twin study. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 May;60(5):524-30.
34. Ziats MN, Rennert OM. Sex-biased gene expression in the developing brain: implications for autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2013 May 7;4(1):10.
35. Werling DM. The role of sex-differential biology in risk for autism spectrum disorder. *Biol Sex Differ*. 2016 Nov 16;7:58.
36. Crider A, Thakkar R, Ahmed AO, Pillai A. Dysregulation of estrogen receptor beta (Er β), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects. *Mol Autism*. 2014 Sep 9;5(1):46.
37. Höfer J, Hoffmann F, Kamp-Becker I, Poustka L, Roessner V, Stroth S, et al. Pathways to a diagnosis of autism spectrum disorder in Germany: a survey of parents. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*. 2019 Mar 21;13:16.
38. Bettelheim B. *The empty fortress: infantile autism and the birth of the self*. Free Press of Glencoe. 1967.
39. Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry*. 1977 Sep;18(4):297-321.
40. Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M, Rijdsdijk F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry*. 2016 May;57(5):585-95.
41. Smalley SL, Asarnow RF, Spence MA. Autism and genetics. A decade of research. *Arch Gen Psychiatry*. 1988 Oct;45(10):953-61.
42. Ronald A, Hoekstra RA. Progress in understanding the causes of autism spectrum disorders and autistic traits: Twin studies from 1977 to the present day. In Ree SH, Ronald A, editors, *Behavior Genetics of Psychopathology*. Springer VS. 2014. p. 33-65. (*Advances in Behavior Genetics*).
43. Wang K, Gaitsch H, Poon H, Cox NJ, Rzhetsky A. Classification of common human diseases derived from shared genetic and environmental determinants. *Nat Genet*. 2017 Sep;49(9):1319-1325.
44. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Hultman C, Larsson H, Reichenberg A. The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA*. 2017 Sep 26;318(12):1182-1184.
45. Constantino JN, Todorov A, Hilton C, Law P, Zhang Y, Molloy E, et al. Autism recurrence in half siblings: strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Mol Psychiatry*. 2013;18:137-138.
46. Butler MG, Rafi SK, Manzardo AM. High-resolution chromosome ideogram representation of currently recognized genes for autism spectrum disorders. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6464-6495.
47. Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S, et al. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 7;103(45):16834-9.
48. Wiśniowiecka-Kowalik B, Nowakowska BA. Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder-current evidence in the field. *J Appl Genet*. 2019;60(1):37-47.
49. Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin Neurosci*. 2012 Sep;14(3):281-92.
50. Miles JH. Autism spectrum disorders - A genetics review. *Genetics IN Medicine*. 2011;13:278-294.

51. Tordjman S, Drapier D, Bonnot O, Graignic R, Fortes S, Cohen D, et al. Animal models relevant to schizophrenia and autism: validity and limitations. *Behav Genet.* 2007 Jan;37(1):61-78.
52. Walsh P, Elsabbagh M, Bolton P, Singh I. In search of biomarkers for autism: scientific, social and ethical challenges. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(10):603-612.
53. Happé F, Ronald A, Plomin R. Time to give up on a single explanation for autism. *Nat Neurosci.* 2006;9(10):1218-1220.
54. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Jun;22(3):229-37.
55. Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiol Dis.* 2010;38(2):181-191.
56. Garrido-Torres N, Marqués Rodríguez R, Alemany-Navarro M, et al. Exploring genetic testing requests, genetic alterations and clinical associations in a cohort of children with autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* Published online April 8, 2024.
57. Al Ageeli E, Drunat S, Delanoë C, Perrin L, Baumann C, Capri Y, et al. Duplication of the 15q11-q13 region: clinical and genetic study of 30 new cases. *Eur J Med Genet.* 2014 Jan;57(1):5-14.
58. Liu X, Takumi T. Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452(2):244-253.
59. Rosenfeld JA, Ballif BC, Torchia BS, Sahoo T, Ravnan JB, Schultz R, et al. Copy number variations associated with autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders. *Genet Med.* 2010 Nov;12(11):694-702.
60. Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene.* 2014 Feb 1;535(1):70-8.
61. Geschwind DH, State MW. Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine. *Lancet Neurol.* 2015 Nov;14(11):1109-20.
62. Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB, et al; Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2010 Apr;125(4):e727-35.
63. Tammimies K, Falck-Ytter T, Bölte S. Quo Vadis clinical genomics of ASD?. *Autism.* 2016;20(3):259-261.
64. Degenhardt F, Gradl-Dietsch G, Hebebrand J. Need for psychiatric phenotyping in patients with rare genetic disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2021;30(3):327-329.
65. Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung WK, et al; NDD Exome Scoping Review Work Group. Correction: Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med.* 2020 Oct;22(10):1731-1732.
66. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* 2007 Apr 20;316(5823):445-9.
67. Chen S, Li Z, He Y, Zhang F, Li H, Liao Y, et al. Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells is associated with childhood autism. *BMC Psychiatry.* 2015 Mar 17;15:50.
68. Lyall K, Song L, Botteron K, Croen LA, Dager SR, Fallin MD, et al. The Association Between Parental Age and Autism-Related Outcomes in Children at High Familial Risk for Autism. *Autism Res.* 2020 Jun;13(6):998-1010.
69. Schaefer GB, Mendelsohn NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions (published correction appears in *Genet Med.* 2013 Aug;15(8):669). *Genet Med.* 2013;15(5):399-407.
70. Schaefer GB, Mendelsohn NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders (published correction appears in *Genet Med.* 2008 Jun;10(6):464). *Genet Med.* 2008;10(4):301-305.
71. Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities [published correction appears in *Genet Med.* 2020 Dec;22(12):2126].
72. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):749-64.
73. Waggoner D, Wain KE, Dubuc AM, Conlin L, Hickey SE, Lamb AN, et al; ACMG Professional Practice and Guidelines Committee. Yield of additional genetic testing after chromosomal microarray for diagnosis of neurodevelopmental disability and congenital anomalies: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2018 Oct;20(10):1105-1113.

74. Griesi-Oliveira K, Sertié AL. Autism spectrum disorders: an updated guide for genetic counseling. *Einstein (Sao Paulo)*. 2017;15(2):233-238.
75. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(9):551-563.
76. Jokiranta-Olkonieni E, Cheslack-Postava K, Sucksdorff D, Suominen A, Gyllenberg D, Chudal R, et al. Risk of Psychiatric and Neurodevelopmental Disorders Among Siblings of Probands With Autism Spectrum Disorders. *JAMA Psychiatry*. 2016 Jun 1;73(6):622-9.
77. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *JAMA*. 2014 May 7;311(17):1770-7.
78. Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a baby siblings research consortium study. *Pediatrics*. 2011;128:e488-e495.

Uticaj promotorskih varijanti gena za uridin-difosfat-glukuronoziltransferazu 1A1 na metabolizam bilirubina i značaj *UGT1A1*28* varijante kao farmakogenetičkog markera

Marija Vuković¹, Branka Zukić², Sonja Pavlović²

¹Odjeljenje za medicinsku genetiku, Univerzitetski klinički centar Republike Srpske, Banja Luka, Bosna i Hercegovina

²Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Kontakt: marija.vukovic@kc-bl.com

Apstrakt

Glukuronidacija je nezaobilazan korak u metabolizmu i ekskreciji bilirubina. Ekskluzivnu ulogu u ovom procesu ima enzim UGT1A1 kodiran *UGT1A1* genom. Do sada je opisano 130 varijanti ovog gena. Wild-type *UGT1A1*1* u svom promotorskom TATA regionu sadrži 6 TA ponovaka. Sa povećanjem TA ponovaka u promotorskom regionu smanjuje se aktivnost promotora i posleđično tome i aktivnost UGT1A1 enzima. Opisane su promotorske varijante *UGT1A1*36*, *UGT1A1*28* i *UGT1A1*37* sa 5, 7 i 8 TA ponovaka, respektivno. Smanjenjem aktivnosti UGT1A1 enzima dolazi do hiperbilirubinemije i ikterusa, kao i do pojave Žilberovog sindroma (ŽS) koji se smatra benignim kliničkim stanjem. Najčešći uzrok ŽS je prisustvo *UGT1A1*28* varijante u homozigotnom stanju. Značajno je i to da je ustanovljeno da učestalost ove varijante pokazuje izrazitu populacionu specifičnost. Osim toga *UGT1A1*28* alel je značajan farmakogenetički marker za brojne farmaceutike, a posebno je značajan za lek irinotekan. Detekcija *UGT1A1*28* se takođe može koristiti za diferencijalnu dijagnozu hepatitisa C i sumnje na druga oboljenja jetre. Istovremeno, varijante gena *UGT1A1* tretiraju se kao tercijarni modifikatori kod sindroma β -talasemije minor i drugih hemolitičkih anemija.

Ključne reči: *UGT1A1*, Žilberov sindrom, hiperbilirubinemija, farmakogenetički marker, populaciona studija, personalizovana medicina

Influence of promoter variants of uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 gene on bilirubin metabolism and significance of *UGT1A1**28 variant as pharmacogenetic markers

Marija Vuković¹, Branka Zukić², Sonja Pavlović²

¹Department for Medical Genetics, University Clinical Center of Republic of Srpska, Banja Luka, Bosnia and Hercegovina

²Laboratory for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: marija.vukovic@kc-bl.com

Abstract

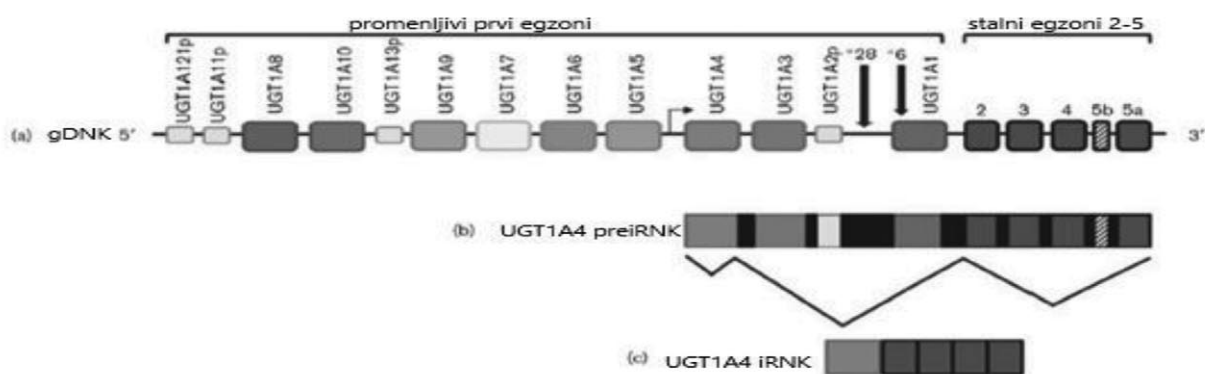
Glucuronidation is an indispensable step in the metabolism and excretion of bilirubin. An exclusive role in this process is played by the enzyme UGT1A1, encoded by the *UGT1A1* gene. 130 variants of the *UGT1A1* gene have been described. Wild-type *UGT1A1**1 contains 6 TA repeats (TA6) in its promoter TATA region. With the increase in TA repeats in the promoter region, the activity of the promoter decreases and consequently the activity of the UGT1A1 enzyme will be reduced. Described promoter variants are *UGT1A1**36, *UGT1A1**28, and *UGT1A1**37 with 5, 7, and 8 TA repeats, respectively. A decrease in the activity of the UGT1A1 enzyme leads to hyperbilirubinemia and the appearance of Gilbert's syndrome (GS) considered a benign clinical condition. The most common cause of GS is the presence of *UGT1A1**28 in a homozygous state. Also, it was established that the frequency of this variant shows a distinct population specificity. In addition, the *UGT1A1**28 allele is an important pharmacogenetic marker for numerous pharmaceuticals, and for drug irinotecan it is particularly important. Detection of *UGT1A1**28 can also be used for the differential diagnosis of hepatitis C and other suspected liver diseases. At the same time, *UGT1A1* gene variants are treated as tertiary modifiers in β -thalassemia minor syndrome and other hemolytic anemias.

Keywords: *UGT1A1*, Gilbert's syndrome, hyperbilirubinemia, pharmacogenetic marker, population study, personalized medicine

Uridin-difosfat-glukuronoziltransferaze 1A

UGT1A familiju enzima čine različite izoforme sa širokom supstratnom specifičnošću. Ovi se enzimi nalaze u membrani endoplazmatičnog retikuluma (ER). Izgrađeni su od 550 aminokiselina (AK). Na C terminusu svih UGT1A enzima nalazi se visoko konzervirani domen od 44 AK, koji je mesto vezivanja UDP-glukuronske kiseline. Transmembranski lipofilni domen čini 17 AK blizu C terminusa, dok se u lumenu ER nalazi veći deo proteina uključujući N terminus na kojem je domen vezivanja supstrata i katalitičko mesto. N terminus pokazuje supstratnu specifičnost zahvaljujući promenljivom regionu od 60. do 120. AK. Prilikom ugradnje enzima u membranu ER iseca se oko 23-27 AK sa N terminusa [1]. UGT1A familija enzima ekspirira se u jetri, intestinumu, kolonu, bubrezima i želucu [2]. Po Strassbourg et al. izoforme UGT1A7, UGT1A8 i UGT1A10 se ekspiriraju isključivo van jetre [3].

UGT1A familija enzima (EC: 2.4.1) [4] kodirana je kompleksnim genskim lokusom na hromozomu 2 u regionu 2q37 [5]. Na 3' kraju *UGT1A* genskog lokusa nalaze se četiri stalna egzona dok se na 5' kraju nalazi 13 prvih promenljivih egzona. Od ovih 13 prvih egzona, 9 je vijabilno, a 4 su pseudoegzoni. Vijabilni egzoni se nezavisno transkribuju sa visoko konzerviranim egzonima sa 3' kraja pri čemu nastaje 9 različitih primarnih transkripata (*UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9* i *UGT1A10*) [6]. (Slika 1).



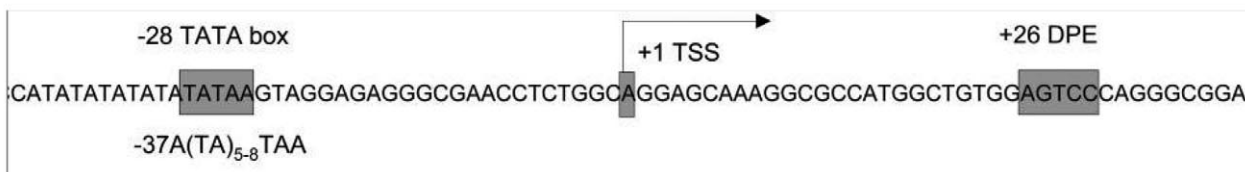
Slika 1. Kompletni *UGT1A* lokus

Svaki transkript se sastoji od 4 visoko konzervirana egzona (egzon 2 do egzona 5) na 3' kraju, dok se na 5' kraju nalazi jedan od promenljivih egzona. Konzervirani region je odgovoran za vezivanje UDP-glukuronske kiseline koja je donor glukuronil grupe. Alternativnim splajsingom konzerviranih regiona sa varijabilnim regionom omogućena je supstratna specifičnost izoformi UGT1A enzima. Ovakva organizacija genskog kompleksa omogućava da u procesu transkripcije sa jednog genskog lokusa nastane 9 različitih enzima. Nezavisna inicijacija transkripcije omogućena je time što se na 5' kraju svakog prvog promenljivog egzona nalazi promotorski blok (TATA sekvenca) za koji se vezuje RNK polimeraza. *UGT1A* genski lokus kodira familiju enzima sa veoma širokom supstratnom specifičnošću, što dovodi do glukurodinacije širokog spektra endobiotika i ksenobiotika.

U zadnje dve dekade vršena su brojna istraživanja ovog genskog lokusa sa ciljem rasvetljavanja uloge i značaja izoformi UGT1A enzimske familije u metabolizmu različitih endogenih i egzogenih jedinjenja.

UGT1A1 izoforma je značajna jer ima ekskluzivnu ulogu u glukuronidaciji bilirubina i brojnih značajnih lekova. Do sada je opisano 130 varijanti *UGT1A1* gena (www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca). Fokus ovog rada je na promotorske varijante *UGT1A1* gena. U ovom genu TATA promotorski region (TATAA) pozicioniran je 28 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije (TSS – eng. *transcriptional start site*), dok se

nizvodno od ovog mesta na poziciji +26 nalazi donji promotorski element (DPE – eng. *down promoter element*) (Slika 2) [7]. Broj dinukleotidnih TA ponovaka u promotorskom bloku kreće se od 5 do 8 ponovaka, a najčešća varijanta u svim etničkim grupama je $A(TA)_6TAA$ sa 6 TA ponovaka i označena je kao $UGT1A1^*1$ [8]. Varijanta sa 5 TA ponovaka ($A(TA)_5TAA$) označena je kao $UGT1A1^*36$, sa 7 TA ponovaka ($A(TA)_7TAA$) kao $UGT1A1^*28$, dok je varijanta sa 8 TA ponovaka ($A(TA)_8TAA$) označena kao $UGT1A1^*38$. Sa povećanjem broja TA ponovaka u promotorskom regionu smanjuje se ekspresija gena usled progresivnog smanjivanja afiniteta transkripcionog faktora II za promotor sa povećanim brojem TA ponovaka [9]. Enzimska aktivnost $UGT1A1$ kod heterozigota (6/7 TA) smanjena je za 25%, dok je kod 7/7 TA homozigota transkripciona aktivnost smanjena za čak 70% [10].

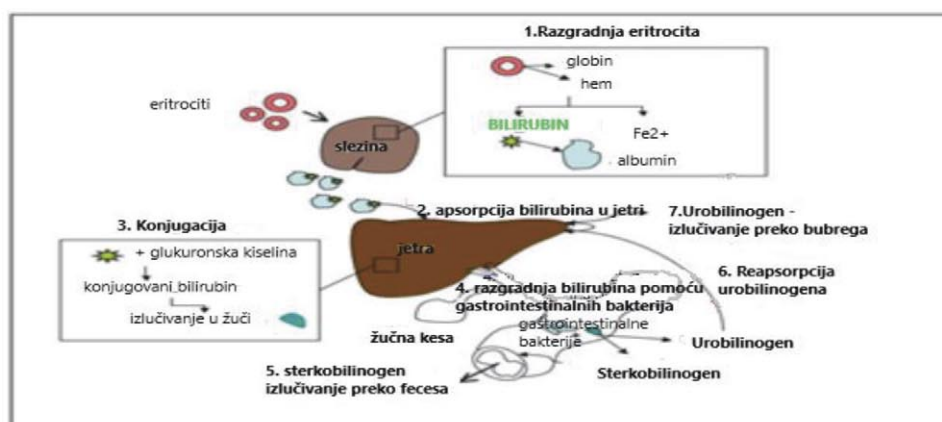


Slika 2. Organizacija promotorskog regiona $UGT1A1$ gena; TSS – početak transkripcije; DPE – promotorski element 26 nukleotida nizvodno od prvog.

$UGT1A1$ enzim (EC 2.4.1.17) se najvećim delom eksprimira u jetri, a značajno manje u intestinumu i bubrezima.

Metabolizam bilirubina

Bilirubin nastaje razgradnjom hemoglobina iz eritrocita, dok manji deo nastaje iz prekursora eritrocita usled neefikasne eritropojese i iz drugih proteina koji imaju hem (citohrom, mioglobin i katalaza). U metabolizmu i ekskreciji bilirubina učestvuje niz različitih proteina i enzima. Nekonjugovana hidrofobna forma bilirubina se vezuje za albumin i kao takav cirkuliše u krvi. Hepatociti selektivno resorbuju bilirubin koji se u citoplazmi hepatocita vezuje za citoplazmatski transporterski protein ligandin. S obzirom da ligandin sa većim afinitetom vezuje bilirubin od albumina, dolazi do deponovanja bilirubina unutar hepatocita [11], pri čemu se u cirkulaciju vraća albumin. Zatim se u hepatocitama odvija konjugacija bilirubina sa glukuronskom kiselinom pomoću enzima $UGT1A1$, pri čemu nastaje bilirubin monoglukuronat (BMG) i bilirubin diglukuronat (BDG). Konjugovani bilirubin postaje hidrofilan, ekskretuje se u žuč pomoću dva transportera: $ABCC2/MPR2$ (eng. *ATP-binding cassette C2/multi-drug resistance associated protein*) i $ABCG2/BCRP$ (eng. *ATP-binding cassette G2/breast cancer resistance protein*) [12]. Značajna količina konjugovanog bilirubina se ekskretuje u sinusoidalni krvotok pomoću $ABCC3/MPR3$ transportera. Međutim



Slika 3. Metabolizam bilirubina i faze klirensa bilirubina

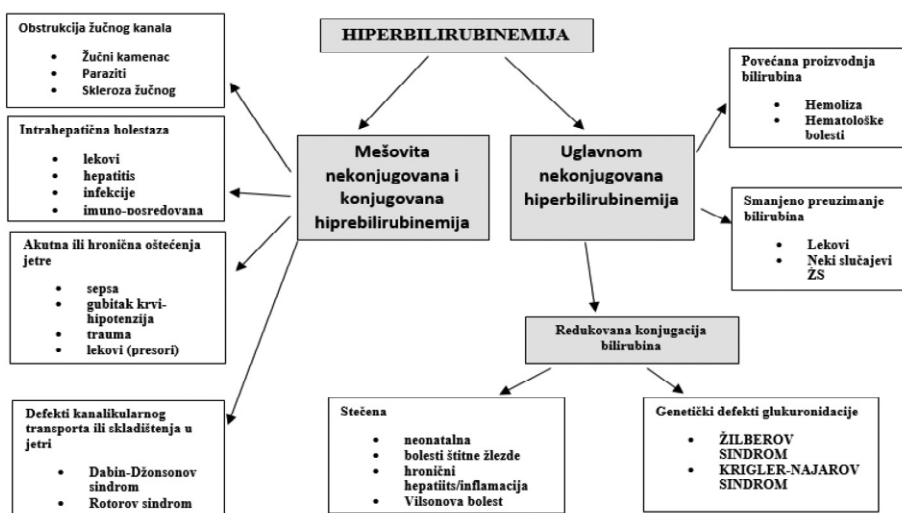
nosači SLCO1B1/OATP1B1 i SLCO1B3/OATP1B3 koji se nalaze na membrani hepatocita veći deo konjugovanog bilirubina resorbuju [13] te se on ponovo ekskretuje u žuč. Bilirubin-glukuronid, mezobilirubin, mezobilirubinogen, sterkobilinogen su žučne boje koje iz žuči odlaze u creva gde se dalje razgrađuju i preko fecesa izlučuju. Urobilinogen se ekskretuje preko bubrega urinom.

U crikulaciji su prisutne male količine nekonjugovanog bilirubina koji se nalazi u ekvilibrijumu sa konjugovanim bilirubinom [14]. Normalne vrednosti ukupnog bilirubina (konjugovani (direktni) + nekonjugovani (indirektni) bilirubin) u serumu zdrave osobe su od 5- 21 μ M/L.

Hiperbilirubinemije

Povećanje serumskog bilirubina može se javiti kao posledica hemolize i povećane proizvodnje bilirubina ili kao posledica smanjenog klirensa bilirubina, kao i kombinacijom ova dva faktora. Visok nivo nevezanog bilirubina u krvi ima neurotoksični efekat, što može dovesti do bilirubinemijske encefalopatije i kernikterusa [15].

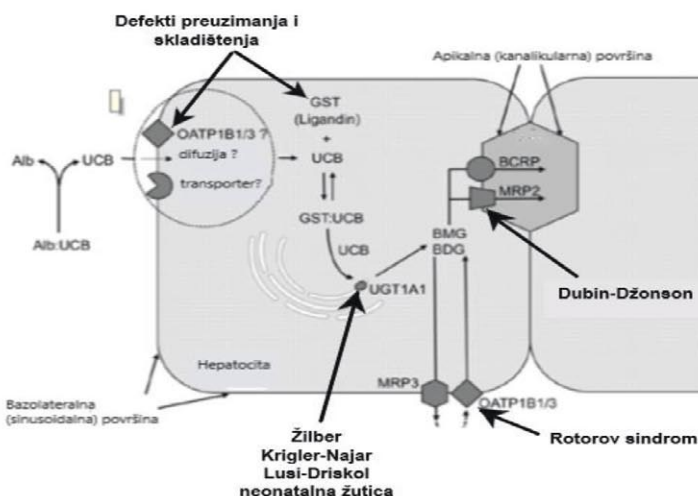
Poremećaji u metabolizmu bilirubina mogu biti posledica virusnog ili toksičnog hepatita, ciroze, neonatalne žutice, laktacione žutice ili urođenog genetičkog defekta (Slika 4).



Slika 4. Diferencijalna dijagnoza hiperbilirubinemije [16]

Genetički uslovljene hiperbilirubinemije mogu biti posledica povećane produkcije bilirubina kod genetički uslovljenih hemoliza (usled manjka eritrocitnih enzima, sferocitoze, talasemije (α , β - δ), nedostatka vitamina K) ili usled promena u genima koji učestvuju u procesima klirensa bilirubina. Ekskrecija bilirubina se odvija u četiri procesa u kojem učestvuju ranije opisani geni: 1) preuzimanje i deponovanje nekonjugovanog bilirubina u hepatocitama (ligandin (GST), transporter (OATP1B1/3)), 2) konjugacije bilirubina glukuronskom kiselinom (UGT1A1) (Žilberov sindrom, Krigler-Najarov sindrom, Lusi-Driskolov sindrom, neonatalna ili fiziološka žutica), 3) ekskrecijom bilirubina u žučnu kesu (BCRP3, MRP3) (Dabin-Džonsonov sindrom); 4) preuzimanje konjugovanog bilirubina (OATP1B1/3) (Rotorov sindrom) [17].

S obzirom da ne postoji alternativni metabolički put za detoksifikaciju i uklanjanje bilirubina osim glukuronidacije enzimom UGT1A1 jasan je značaj poznavanja varijanti koje utiču na nivo ekspresije ovog gena.



Slika 5. Metabolički put klirensa bilirubina. Prikaz 4 nivoa potencijalnih genetički uslovljenih hiperbilirubinemija. (Alb-albumin; BCRP – protein (eng. *breast cancer resistance protein*); BMG-bilirubin monoglukuronid; BDG-bilirubindiglukuronid; Ligandin (GST glutation-S-transferaza); MRP – protein vezan za otpornost na više lekova (eng. *multidrug resistance-associated protein*); OATP – transportni protein organskih anjona (eng. *organic anion transport protein*); UCB – nekonjugovani bilirubin; UGT1A1-uridin difosfat glukuronozil transferaza 1A1 [17])

Žilberov sindrom

Žilberov sindrom (ŽS) su prvi opisali Žilber i Lerebul (eng. Gilbert i Lereboulet) 1901. godine. ŽS je benigno kliničko stanje sa blago povišenim vrednostima nekonjugovanog bilirubina koje se javlja povremeno i uzorkovana je stresogenim faktorima kao što su glad, fizički napor, bolest, infekcije, upotreba medikamenata i alkohola, trudnoća, emotivni stres, pa čak i promena spoljašnje temperature [18]. Hiperbilirubinemija kod ŽS je intermitentna i prolazna i nije izazvana ni hemolizom ni oštećenjem jetre [19,20]. Referentne vrednosti ukupnog bilirubina u serumu kod zdravih osoba variraju od 5 do 21 $\mu\text{M/L}$, a vrednosti totalnog bilirubina u serumu kod ŽS kreću se od 20-50 $\mu\text{M/L}$, i retko prelaze 85 $\mu\text{M/L}$ [25].

Klinička manifestacija ŽS u fazi hiperbilirubinemije su mučnina, problemi sa varenjem, nesanica, razdražljivost, tahikardija, nervoza, depresija i anksioznost. Dijagnozu ŽS je moguće postaviti uvidom u anamnezu, kliničku sliku, laboratorijske biohemijske nalaze, kao i sprovođenjem fenobarbitonskog testa i testa gladovanja [21]. Genetička analiza promotorskog regiona *UGT1A1* gena može pružiti konačnu potvrdu dijagnoze ŽS. Pacijenti sa ŽS u evropskim populacijama su najčešće homozigotni nosioci za varijantu *UGT1A1*28* sa 7 TA ponovaka u promotorskom regionu. ŽS se najčešće dijagnostikuje u pubertetu i javlja se za 2-7 puta češće kod dečaka u pubertetu nego kod devojčica istog uzrasta [21]. U zavisnosti od izvora, u opštoj populaciji ŽS se javlja sa učestalošću od 3-5% [22,23]. Međutim postoje podaci da je prevalencija ŽS 12,4% među muškarcima bele rase i 4,8% među belim ženama. Veća prevalencija ŽS kod muškaraca objašnjava se povećanom proizvodnjom bilirubina u poređenju sa ženama i inhibicijom glukuronidacije bilirubina od strane androgena [24].

U slučajevima kada postoji klinička slika ŽS koja nije potvrđena genetičkim testom na *UGT1A1*28* može se posumnjati na Krigler-Najarov sindrom tip 2 koji se javlja kao posledica nukleotidne zamene u egzonskim regionima *UGT1A1* gena koji rezultiraju aminokiselinskim zamenama u enzimu koje mogu dovesti do redukcije aktivnosti enzima. U ovakvim slučajevima dalja preporuka za dijagnostiku bila bi sekvenciranje četiri stalna egzona *UGT1A1* gena. Metoda izbora za rutinsku dijagnostiku ŽS je fragment analiza ili real-time PCR sa standardizovanim komercijalnim kitovima.

Populaciona specifičnost učestalosti UGT1A1 varijanti

Razlike u objavljenim učestalostima ŽS u različitim izvorima javljaju se zbog populacione specifičnosti učestalosti *UGT1A1**28 varijante. Sprovedene su brojne populacione studije koje su upravo pokazale ove specifičnosti. Postoje razlike u distribuciji *UGT1A1* varijanti kako među rasama, tako i među različitim etničkim skupinama i populacijama različitih geografskih oblasti. Varijanta *UGT1A1**28 (rs8175347), sa 7 TA ponovaka u promotorskom regionu, javlja se za značajnom učestalošću kod kavkaskih i afričkih naroda, kod azijskih retko, dok kod pacifičkih kao incidentan događaj. Kod kavkaskih naroda učestalost ove varijante je od 0,29 do 0,39, kod afroamerikanaca od 0,38 do 0,45, dok se kod Azijskih naroda ova varijanta javlja sa niskom učestalošću od 0,02 do 0,14. Varijanta sa 5 TA ponovaka, *UGT1A1**36 je kod kavkaskih naroda prisutna sa učestalošću 0,01 do 0,018, kod afro-amerikanaca 0,035 do 0,065. *UGT1A1**37 varijanta (sa 8 TA ponovaka) je kod kavkaskih naroda prisutna sa 0,008 do 0,022, a kod afroamerikanaca 0,042 do 0,07. Ove dve varijante nisu detektovane kod azijske populacije. Međutim u azijskoj opštoj populaciji javlja se varijanta *UGT1A1**6 (G71R) sa učestalošću 0,08 do 0,13, a u Japanu i Koreji čak sa 0,15 do 0,25, dok u kavkaskoj i afro-američkoj populaciji ova varijanta nije detektovana [26]

Na Afričkom kontinentu je prisutna najveća razovrsnost kako promotorskih varijanti *UGT1A1* gena tako i genotipova [27]. U Pacifičkim populacijama nije detektovan genotip 7/7 TA [28].

Genotip <i>UGT1A1</i> (TA)n	Evropljani	Azijati	Afrikanci
6/6	0.34	0.71	0.26
6/7	0.55	0.28	0.37
7/7	0,11	0.1	0.19
7/8	0	0	0.06
8/8	0	0	0.02
6/8	0	0	0.04
7/5	0	0	0.05
6/5	0	0	0.02

Tabela 1. Rasna distribucija učestalosti *UGT1A1*(TA)n genotipova [27]

Distribucija *UGT1A1**28 alela u evropskim populacijama je relativno ujednačena i prisutna je sa učestalošću oko 0,33, sa značajnijim odstupanjima u populaciji Turske i Velike Britanije gde se javlja sa učestalošću 0,24 i 0,27 respektivno, i populacije Poljske sa učestalošću 0,42 [29] (Tabela 2).

	<i>UGT1A1</i> *28	6/6(%)	6/7(%)	7/7(%)
Španija	0.34	/	/	10
Italija	0.32	/	/	9
Grčka	0.35	48.9	40.4	8.5
Francuska	0.32	/	/	17
Nemačka	0.32	43	45	12.4
Poljska	0.42	33.3	50	16.7
Velika Britanija	0.27	50.8	44	5
Turska	0.24	56.3	34.4	9.3
Holandija	0.37	/	/	12

Tabela 2. Distribucija učestalosti *UGT1A1*(TA)n genotipova kod evropskih naroda

Pregledom literature ustanovljeno je da postoje rezultati o učestalostima *UGT1A1*28* alela u susednim balkanskim državama te se uočava sličnost sa drugim narodima iz evropske grupe naroda [29,30,31].

	<i>UGT1A1*28</i>	6/6(%)	6/7(%)	7/7(%)
Makedonija	0.31	50	37.5	12.5
Hrvatska	0.34	38.4	47.9	9.8
Slovenija	0.37	38.1	47.9	13.6
Srbija	0.40	37	47	16
Bosna i Hercegovina *	0.44	37	37	26

Tabela 3. Učestalost *UGT1A1*28* alela kao i *UGT1A1(TA)n* promotorskih genotipova u državama bivše Jugoslavije

*Rezultati su dobijeni analizom populacije Republike Srpske koja je entitet Bosne i Hercegovine

Najveća učestalost varijante utvrđena je u populaciji BiH i iznosi 0,44, dok je u populaciji Srbije nešto niža sa 0,40 [32].

Hiperbilirubinemije kao posledica hemolize kod talasemijskih sindroma i fibroze jetre kod hroničnog hepatitisa C

Hiperbilirubinemija može biti posledica i drugih bolesti i stanja. Talasemijski sindromi su praćeni intenzivnom hemolizom usled sinteze defektnog β -globinskog lanca i kao posledica toga dolazi do povećanja bilirubina. S druge strane oštećenje jetre kao što je fibroza kod hroničnog hepatitisa C za posledicu ima smanjenu funkciju jetre i enzimski procesi koji se odvijaju u hepatocitama, a između ostalih i glukuronidacija bilirubina enzimom *UGT1A1* je redukovana, tako da je i klirens bilirubina time smanjen i povećavaju se njegove vrednosti u serumu [33]. Po Čajld-Puovoj klasifikaciji fibroze i ciroze jetre, nivo bilirubina u krvi je jedan od ključnih parametara koji ukazuje na stepen fibroze jetre [34]. Beta -talasemijski sindromi zbog visokih vrednosti bilirubina mogu biti zamaskirani i pogrešno dijagnostikovani kao ŽS. Međutim *UGT1A1* gen može imati uticaja na fenotipsku ekspresiju talasemijskog sindroma, tako da se *UGT1A1* klasifikuje kao gen modifikator kod β -talasemije minor [35].

Uridin-difosfatglukuronozil-transferaza 1A1 kao farmakogenetički marker

Osim bilirubina, *UGT1A1* metaboliše brojne egzogene supstance i lekove. Neki od supstrata *UGT1A1* enzima su: irinotekan (SN-38), paracetamol, ibuprofen, tramadol, diklofenak, karvediol, lamotrigin, simvastatin, lovastatin, atorvastatin, estradiol, raloksifen, troglitazon, lozartan, etoposid, belinostat, raltegravir i abacavir, (www.drugbank.ca). U pitanju su značajni lekovi koji imaju široku primenu u medicini, a nekima od njih je teško naći i zamenu. Sposobnost metabolisanja ovih lekova u direktnoj je vezi sa genotipom *UGT1A1* gena i sa nivoom ekspresije gena i aktivnosti enzima. *UGT1A1*28* ima najveći farmakogenetički klinički značaj, naročito kod upotrebe irinotekana koji se koristi u lečenju karcinoma debelog creva [10]. Radi se o inhibitoru topoizomeraze I koji u kombinaciji sa drugim hemoterapeuticima zaustavlja ćelijsku deobu malignih ćelija. Aktivni metabolit irinotekana SN-38 sprečava ćelijsku replikaciju tako što onemogućava religaciju jednolančanih prekida na DNK. Kako se prekidi na DNK ne popravljaju efikasno, brzo dolazi do ćelijske smrti. Aktivni metabolit irinotekana SN-38 ima izrazito citotoksičan efekat i može dovesti do brojnih izraženih neželjenih efekata kao što je dijareja, mijelosupresija i neutropenija. Da bi se izbegli neželjena dejstva neophodan je efikasn metabolizam i brza ekskrecija SN-38 [36]. Ključni enzim u metabolizmu i ekskreciji SN-38 je *UGT1A1* enzim koji vrši glukuronidaciju SN-38.

S obzirom da na osnovu genotipa postoji individualna sposobnost metabolisanja irinotekana, tako da kod sporih metabolizera (7/7TA genotip tj. homozigotni nosioci *UGT1A1*28* varijante) nivo SN-38 u serumu ostaje visok duži vremenski period te su češći neželjeni efekti [10]. Kod brzih metabolizera (6/6TA genotip tj. homozigoti za *UGT1A1*1*) su zaslužni za brzu ekskreciju toksičnog metabolita te se kod ovih pacijenata terapija sprovodi sa manje komplikacija.

Američka agencija za lekove je 2005. godine donela preporuku da se *UGT1A1*28* varijanta okarakterise kao farmakogenetički marker za upotrebu irinotekana u terapiji kolorektalnog karcinoma. Data je preporuka za doziranje leka na osnovu *UGT1A1* genotipa pacijenta.

Irinotekan ima složen metabolički put u kojem učestvuje pored *UGT1A1* enzima i niz drugih enzima kao što su: karboksilesteraze (CES), citohrom P450 3A4 (*CYP3A4*), *ABCB1* (eng. *multi-drug resistance 1 P-glycoprotein*) i *ABCC2* (eng. *multi-drug associated protein 2*) transporteri [5]. S tim u vezi treba imati u vidu da u nekim slučajevima genotipizacija *UGT1A1* promotorskih varijanti za metabolizam irinotekana neće biti dovoljna već da će se morati uzeti u obzir i drugi farmakogenetički markeri značajni za ovaj metabolički put.

Nutrigenetika, epigenetika i uticaj životnog stila na ekspresiju *UGT1A1* gena

Istraživanja su pokazala da određene hranljive namirnice kao i životni stil (pušenje i konzumiranje alkohola) imaju uticaj na ekspresiju *UGT1A1* gena. Pokazalo da duvanski dim [37] i alkohol [38] indukuju ekspresiju *UGT1A1* enzima u jetri. Pušači koji su homozigotni nosioci 6/6 TA genotipa mogu biti rezistentni na terapiju irinotekanom [37].

Takođe pokazalo se i da određene namirnice u ishrani kao što su kupusnjače, brokoli, citrusi i soja mogu povećati ekspresiju *UGT1A1* gena. Ovo je važno za osobe koje su homozigotni nosioci 7/7TA genotipa te da se adekvatnom prehranom može regulisati nivo bilirubina [39].

S druge strane, brojni fitoterapeutici sadrže sekundarne metabolite lekovitih biljaka koji deluju inhibitorno na *UGT1A1* enzim [40]. Biljni ekstrakti koji pokazuju inhibitorno dejstvo na *UGT1A1* enzim i imaju klinički značajne implikacije dobijeni su iz biljaka *Silybum marianum* (sikavica), *Serenoa repens* (poznata kao Saw palmeto, u širokoj upotrebi u prevenciji raka prostate), *ehinacea*, [41], dok ženšen [42], đumbir, cimet, valerijana, borovnica i drugo bobičasto voće [43] pokazuju slabije inhibitorno dejstvo.

Ove interakcije mogu uticati na intenzitet i dužinu trajanja hiperbilirubinemije kod pacijenata s 7/7TA genotipom. Pravilnom ishranom (povećan unos kupusnjača i citrusa, pri izbegavanju namirnica sa inhibitornim dejstvom na ekspresiju gena), klinička slika hiperbilirubinemije kod beta-talasemije bi mogla da se ublaži.

Lekovi kao induceri i inhibitori ekspresije *UGT1A1* gena

Na ekspresiju *UGT1A1* gena brojni lekovi mogu da imaju ulogu inducera ili inhibitora ekspresije gena [44,45,46]. Otkriven je molekularni mehanizam dejstva fenobarbitona koji se već više decenija koristi u terapiji ŽS efikasno snižavajući nivo bilirubina. Sada je poznato da fenobarbiton vezivanjem za enhancersku sekvencu na poziciji -3483/-3194 *UGT1A1* gena [47] indukuje ekspresiju *UGT1A1* gena.

Otkriveno je da se uzvodno od TATA bloka nalazi HNF1 sekvenca koja takođe ima ulogu u aktivaciji *UGT1A1* gena. Metilacijom CpG ostrvaca u blizini ove sekvence ona gubi svoju ulogu, te se nivo ekspresije gena rapidno smanjuje. Dodavanjem inhibitora metiltransferaza kod pacijenata sa kolorektalnim karcinom sprečava se metilacija HNF1 sekvence, čime se gen otključava, povećava se ekspresija gena te se omogućava efikasan metabolizam irinotekana koji se koristi u terapiji [48].

Zaključak

Intenzivnim istraživanjima *UGT1A1* gena ustanovljeno je da je njegova promotorska varijanta *UGT1A1*28* genetički marker za dijagnostiku ŽS, kao i za diferencijalnu dijagnozu HHC i beta-talesmije minor. Takođe zbog značajne uloge ovog gena u metabolizmu lekova, *UGT1A1*28* varijanta je prepoznata kao značajan farmakogenetički marker naročito u populacijama u kojima se javlja sa visokom učestalošću. Ovaj farmakogenetički marker je naročito primenjiv kod terapije irinotekanom kod pacijenata sa karcinomom debelog creva. Preporučuje se personalizovan pristup u lečenju kolorektalnog karcinoma irinotekanom. Bilo bi poželjno u kliničkoj praksi usvojiti algoritme lečenja ove vrste karcinoma sa preporučenim farmakogenetičkim testovima i preporukama za doziranje leka irinotekana na osnovu genotipa pacijenta. Takođe poznavanje životnih navika, preporuke za ishranu, kao i poznavanje interakcija fitoterapeutika i drugih lekova sa *UGT1A1* genom je od velikog značaja kod razmatranja terapije irinotekanom.

Literatura

1. Meech R, Mackenzie PI. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24(12):907-15.
2. Harbourt DE, Fallona JK, Ito S, Baba T, Ritter JK, Glishe GL, Smith PC. Quantification of Human Uridine-Diphosphate Glucuronosyl Transferase (UGT) 1A Isoforms in Liver, Intestine and Kidney using nanoLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2012; 84(1): 98–105.
3. Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. Polymorphic expression of the UDP glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol.* 1998;54:647–654.
4. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guiemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, et al. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15:677-685.
5. Nagar S, Blanchard R. Pharmacogenetics of Uridine diphospho glucuronosyltransferase (UGT)1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metabolism Reviews* 38:393-409, 2006
6. Gong, Q.-H., Cho, J. W., Huang, T., Potter, C., Gholami, N., Basu, N. K., Kubota, S., Carvalho, S., Pennington, M. W., Owens, I. S., Popescu, N. C. Thirteen UDP-glucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics.* 2001; 11: 357-368.
7. Li Y, Buckley D, Wang S, Klaassen CD, Zhong X. Genetic polymorphisms in the TATA box and upstream phenobarbital-responsive enhancer module of the UGT1A1 promoter have combined effects on UDP glucuronosyltransferase 1A1 transcription mediated by constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, or glucocorticoid receptor in human liver. *Drug metabolism and disposition*, 2009. Vol37, No9, Pg(1978-1986)
8. Beutler E, Gelbart T, Demina A (1998) Racial variability in UDPglucuronosyltransferase1 in promoter, A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8170-8174.
9. Hsieh TY, Shiu TY, Huang SM, Lin HH, Lee TC, Chen PJ, Chu HC, Chang WK, Jeng KS, Lai MM, et al. Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. *Pharmacogenet Genomics.* 2007; 17:229 –236
10. Marques SC, Ikediobi ON. The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: Gene-environment interactions. *Human Genomics.* 2010; Vol4.No4.238-249
11. Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D. Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. *Gastroenterology.* 2014; 146:1625–38
12. Vlaming ML, Pala Z, van Esch A, et al. Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3084–93.
13. Briz O, Serrano MA, Maclas RI, Gonzalez-Gallego J, Marin JJ. Role of organic aniontransporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placental maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J.* 2003;371:897–905
14. Karlson P. Biokemija za studente kemije i medicine. Školska knjiga Zagreb, 1976.
15. Watchko JF. Genetics and pediatric unconjugated hyperbilirubinemia. *J Pediatr.* 2013 Jun;162(6):1092-4. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.01.044. Epub 2013 Feb 27
16. Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010; 24:555–71.
17. Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited disorders of Bilirubin Clearance. *Pediatr Res.* 2016;79(3):378-386
18. Mitrovic D, Zdravkovic R, Đorđević J, Čirić D, Miletić E, Bogoslović M, Mladenović M, Milović N, Živulović A, Zlatković A. Žilberov sindrom kod pacijenta školskog uzrasta, prikaz slučaja. *Timočki medicinski glasnik*, 2013. Vol 38, br. 2

19. Sherlock S, Dooley J. Jaundice. In: Sherlock S, Dooley J, eds. *Diseases of the Liver and Biliary System*. Oxford: Blackwell Science; 1997. p.201-15.
20. Koeller D. Bilirubin et bile acid metabolism. In: McIntoch N, Helms JP, Smyth LR, editors. *Forfar et Arneil's Textbook of Pediatrics*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2003; p.1195-6.
21. Radlović N, Leković Z, Mladenović M, Ristić D, Radlović V, Lekić V, et al. Gilbert's syndrome in children – Our experience. *Srp Arh Celok Lek*. 2007;135(5-6): 317-320.
22. Travan L, Lega S, Crovella S, Montico M, Panontin E, Demarini S. Severe neonatal hyperbilirubinemia and UGT1A1 promoter polymorphism. *J Pediatr*. 2014; 165:42–5.
23. Owens D, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. *J Med Genet*. 1975;12:152–6.
24. Ivanov A, Semenova E. Gilbert's Syndrome, Bilirubin Level and *UGT1A1*28* Genotype in Men of North-West Region of Russia. *J Clin Exp Hepatol*. 2021;11(6):691-699
25. Hirschfield GM, Alexander GJ. Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 340–343
26. Shimoyama S. Pharmacogenetics of irinotecan: An ethnicity-based prediction of irinotecan adverse events. *World J Gastrointest.Surg*. 2010; 2(1):14-21
27. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial varijability in UDPglucuronosyltransferaze 1 in promoter, A balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95:8170-8174.
28. Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, de Silva S , Clegg JB, Weatherall DJ. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (*UGT1A1*): hematologic and evolutionary implications. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Vol31, Issue1, 2003, pg 98-10
29. Kapedanovska Nestorovska A, Jakovski K, Naumovska Z, Hiljadnikova Bajro M, Sterjev Z. Eftimov A, Matevska Geskovska N, Suturkova L, Dimitrovski K, Labacevski N, Dimovski AJ. Distribution of the most common genetic variants associated with a variable drug respponse in the population of the Republic Macedonia. *BJMG*,17(2), 2014; 5-14.
30. Ostanek B, Furlan D, Mavec T, Lukac-Bajalo J. *UGT1A1(TA)n* promoter polymorphism — A new case of a (TA)8 allele in Caucasians. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38(2): 78-82.
31. Marinković N, Pašalić D, Gršković B, Ferenčak G, Honović L, Stavljenić Rukavina A. Genotype frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter gene polymorphism in the population of healthy Croatian pre-scholars. *Collegium Antropologicum*, 2008; 32, 725 – 729
32. Vukovic M, Radlovic N, Lekovic Z, Vucicevic K, Maric N, Kotur N, et al. *UGT1A1 (TA)n* Promoter Genotype: Diagnostic and Population Pharmacogenetic Marker in Serbia. *Balkan J Med Genet*. 2018;21(1):59-68.
33. Jordovic J, Bojovic K, Simonovic-Babic J, Gasic V, Kotur N, Zukic B, et al. Significance of *UGT1A1*28* Genotype in Patients with Advanced Liver Injury Caused By Chronic Hepatitis C. *J Med Biochem*. 2019;38(1):45-52.
34. Degoricija V. Uloga sekundarnog hiperaldosteronizma i atrijskog natriuretskog peptida u održavanju ravnoteže soli i ishodu bolesti u cirozi jetre. *Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu*. 2004. Preuzeto 10.06.2013. sa: <http://medlib.mef.hr/348/1/degoricija.pdf>
35. Klassen MK. Uticaj varijanti u kodirajućim i nekodirajućim regionima gena uzročnika i gena modifikatora na fenotip pacijenata sa hiperfenilalaninemijom. *Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu*. 2015
36. Torkamani A, Vaux KK. Irinotecan Toxicity and *UGT1A*, 2015. preuzeto sa: <https://emedicine.medscape.com/article/1790367-overview>
37. van der Bol, J.M., Mathijssen, R.H., Loos, W.J., Friberg, L.E. et al. Cigarette smoking and irinotecan treatment: Pharmacokinetic interaction and effects on neutropenia, *J. Clin. Oncol*. 2007; Vol. 25, pp. 2719–2726.
38. Ideo G, De Franchis R, Del Ninno E, Dioguardi N. Ethanol increases liver uridine diphosphate glucuronosyl transferase. *Experientia* 1971; 27:24-5
39. Peterson, S., Bigler, J., Horner, N.K., Potter, J.D. et al. 'Cruciferae interact with the *UGT1A1*28* polymorphism to determine serum bilirubin levels in humans', *J. Nutr.*2005. Vol. 135, pp. 1051–1055.
40. LV Xia, Xia Y, Finel M, Wu J, Ge G, Yang L. Recent proress and challenges in screening and characterization of *UGT1A1* inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2019.
41. Mohamed ME, Tseng T, Frye RE. Inhibitory effects of commonly used herbal extracts on *UGT1A1* enzyme activity. *Xenobiotica* 2010;40:663–9.
42. Zheng YF, Bae SH, Choi EJ, Park JB, Kim SO, Jang MJ, et al. Evaluation of the in vitro/in vivo drug interaction potential of Bst204, a purified dry extract of ginseng, and its four bioactive ginsenosides through cytochrome P450 inhibition/induction and UDP glucuronosyl transferase inhibition. *Food Chem Toxicol* 2014;68:117–27.
43. Choi EJ, Park JB, Yoon KD, Bae SK. Evaluation of the in vitro/in vivo potential of five berries (bilberry, blueberry, cranberry, elderberry, and raspberry ketones) commonly used as herbal supplements to inhibit uridinediphospho-glucuronosyl transferase. *Food Chem Toxicol*. 2014;72:13–9.
44. Strassburg, CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. *Pharmacogenomics* Vol. 9. 2008; pp. 703–715.

45. Perera, M.A., Innocenti, F. and Ratain, M.J. Pharmacogenetic testing for uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 polymorphisms: Are we there yet?, *Pharmacotherapy*. 2008; Vol. 28 pp. 755–768.
46. Kiang, T.K., Ensom, M.H. and Chang, T.K. 'UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions', *Pharmacol. Ther.* 2006; Vol.106, pp. 97–132.
47. Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong Q, Owens IS, Negishi M, Sueyoshi T. The Phenobarbital Response Enhancer Module in the Human Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase *UGT1A1* Gene and Regulation by the Nuclear Receptor CAR. *Hepatology*. 2001; Vol 33, No. 5: Pg.1232-1238.
48. Belanger AS, Tojcic J, Harvey M, Guillemette C. Regulation of *UGT1A1* and *HNF1* transcription factor gene expression by DNA methylation in colon cancer cells. *BMC Mol Biol*. 2010; 11: 9.

Antitumorski efekat inhibicije glikolize u kombinaciji sa permeabilizacijom lizozoma i supresijom oksidativne fosforilacije

Milica Kosić¹, Verica Paunović¹, Ljubica Harhaji Trajković²

1. Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

2. Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt: kosicmil@gmail.com

APSTRAKT

Tumorske ćelije svoje povećane energetske potrebe prevashodno zadovoljavaju aerobnom glikolizom, ali kada je glikoliza inhibirana njihova metabolička plastičnost im omogućava da lako pređu na oksidativnu fosforilaciju. Veliki, nestabilni lizozomi tumorskih ćelija su bogati hidrolitičkim enzimima i učestvuju u metastaziranju i razvoju rezistencije na citostatike. Međutim, izlivanje lizozomalnih enzima u citoplazmu ubija tumorske ćelije. Kombinovanje lekova koji deluju na različite specifičnosti tumorskih ćelija povećava njihovu terapeutsku efikasnost, a smanjuje neželjene efekte i razvoj rezistencije. Pokazano je da inhibitor glikolize 2-dezoksi-D-glukoza (2DG) u kombinaciji sa supresorom oksidativne fosforilacije rotenonom (ROT), ili sa lizozomalnim deterdžentom N-dodecilimidazolom (NDI) sinergistički ubija B16 melanomske i U251 gliomske ćelije nekrozom, smanjuje nivo ATP, aktivira AMPK i povećava produkciju mitohondrijskog superoksida. 2DG+ROT stimuliše otpuštanje heksokinaze II sa membrane mitohondrija, otvaranje VDAC kanala, izlazak superoksida i citohroma c iz mitohondrija u citoplazmu, aktivaciju kaspaza i apoptozu, koja zbog nedostatka ATP prelazi u nekrozu. Deplecija ATP indukovana 2DG+ROT tretmanom aktivira AMPK i suprimira mTORC1, ali paradoksalno inhibira autofagiju. S druge strane, 2DG+NDI indukuje permeabilizaciju membrane lizozoma, izlazak lizozomalnih enzima u citoplazmu, depolarizaciju mitohondrija i supresiju oksidativne fosforilacije, što dovodi do potpune energetske deplecije i nekroze. Inhibicija glikolize u kombinaciji sa supresijom oksidativne fosforilacije ili destabilizacijom lizozoma mogla bi se koristiti u antitumorskoj terapiji.

Ključne reči: glikoliza, oksidativna fosforilacija, permeabilizacija lizozoma, melanom, gliom, kombinovana antitumorska terapija

Antitumor effect of glycolysis inhibition in combination with lysosome permeabilization and oxidative phosphorylation suppression

Milica Kasic¹, Verica Paunovic¹, Ljubica Harhaji Trajković²

1. Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

2. Institute for Biological Research "Sinisa Stankovic"- National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Serbia

Correspondence: kasicmil@gmail.com

ABSTRACT:

Tumor cells meet their increased energy needs primarily through aerobic glycolysis, but when glycolysis is inhibited their metabolic plasticity allows them to easily switch to oxidative phosphorylation. Large, unstable lysosomes of tumor cells are rich in hydrolytic enzymes and participate in metastasis and the development of resistance to cytostatics. However, the leakage of lysosomal enzymes into the cytoplasm kills tumor cells. Combining drugs that act on different tumor cell specificities increases their therapeutic efficacy while reducing side effects and resistance development. It has been shown that the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2DG), in combination with the oxidative phosphorylation suppressor rotenone (ROT), or with the lysosomal detergent N-dodecylimidazole (NDI), synergistically kills B16 melanoma and U251 glioma cells through necrosis, reduces ATP levels, activates AMPK, and increases mitochondrial superoxide production. 2DG+ROT stimulates the release of hexokinase II from the mitochondrial membrane, opening of VDAC channels, release of superoxide and cytochrome c from mitochondria into the cytoplasm, activation of caspases, and apoptosis, which, due to ATP depletion, transitions into necrosis. ATP depletion induced by 2DG+ROT treatment activates AMPK and suppresses mTORC1, but paradoxically inhibits autophagy. On the other hand, 2DG+NDI induces permeabilization of the lysosomal membrane, release of lysosomal enzymes into the cytoplasm, mitochondrial depolarization, and suppression of oxidative phosphorylation, which leads to complete energy depletion and necrosis. Inhibition of glycolysis combined with suppression of oxidative phosphorylation or destabilization of lysosomes could be used in antitumor therapy.

Keywords: glycolysis, oxidative phosphorylation, lysosome permeabilization, melanoma, glioma, combined antitumor therapy

Gliomi i melanomi

Maligne bolesti su jedan od vodećih uzročnika smrti u savremenom svetu. Nastaju neoplastičnom transformacijom normalnih ćelija i tkiva (1). U višestepenom procesu kancerogeneze stvaraju se brojne mutacije, koje povećavaju aktivnost protoonkogena i/ili smanjuju aktivnost tumor supresor gena, što dovodi do nekontrolisane proliferacije ćelija, inhibicije ćelijske smrti, diferencijacije i gubitka funkcionalnosti ćelija (2). Tokom ovog procesa tumorske ćelije prolaze kroz različite promene kao što su modifikacije signalnih puteva, metabolizma, strukture i funkcije organela, što sve doprinosi razvoju malignog fenotipa (3-5). Tumori se razlikuju prema poreklu ćelija, načinu i prognozi rasta. Benigni tumori ostaju inkapsulirani, dok maligni tumori ili kanceri koji nisu inkapsulirani imaju sposobnost metastaziranja, odnosno manje grupe ćelija se mogu odvajati i širiti putem krvi i limfe u druga tkiva i organe, gde formiraju sekundarne tumore (6).

Svetska zdravstvena organizacija klasifikuje tumore prema vrsti ćelija ili tkiva od kojih su se razvili na epitelne (karcinome), vezivne (sarkome), mijelome, gliome, embrionalne tumore, leukemije i limfome (7).

Gliomi su najčešći tumori centralnog nervnog sistema (8). Nastaju malignom transformacijom glijalnih ćelija pod uticajem različitih sredinskih i genetskih faktora (9). Hirurška resekcija predstavlja osnovni tretman glioma, ali zbog specifičnog mesta nastanka, mnogi od ovih tumora su inoperabilni. Gliomi se takođe tretiraju različitim kombinacijama radioterapije i hemoterapije, zavisno od stepena progresije, starosne dobi, histopatološkog nalaza i molekularnih markera (9, 10). Čak i sa korišćenjem savremene terapije, medijalno preživljavanje pacijenata sa glioblastomom je jako kratko, odnosno manje je od godinu dana (11, 12).

Melanomi su maligni tumori melanocita, pigmentnih ćelija prisutnih u koži, mukoznim membranama, centralnom nervnom sistemu i uvealnom traktu (13). Uprkos naporima koji se ulažu u prevenciju, ranu detekciju i razvoj terapije, incidenca i smrtnost izazvani malignim melanomom su u stalnom porastu. Iako melanomi čine samo 4% svih tumora kože, odgovorni su za 80% smrtnih slučajeva izazvanih kancerom kože (13, 14). Hirurgija je i dalje najbolji pristup za lečenje lokalizovanih melanoma (15), ali su poslednjih godina zabeleženi značajni napreci u adjuvantnim i sistemskim terapijama (16). Nove sistemske terapije uključuju imunoterapiju i ciljanu terapiju pacijenata sa aktivirajućom mutacijom protoonkogena serin/treonin-protein kinaze B-Raf (BRAFV600) (15). Polovina pacijenata sa uznapredovanim melanomima poseduje BRAFV600E mutaciju i inhibitori BRAF i njegove nishodne mete mitogenom-aktivirane protein kinaze (MEK) su inicijalno vrlo efikasni. Međutim, pacijenti vrlo brzo razvijaju rezistenciju na ove inhibitore (17). Petogodišnja stopa preživljavanja pacijenata kod kojih se melanom proširio na regionalne limfne čvorove iznosi oko 64%, dok je kod pacijenata kod kojih je melanom metastazirao na udaljene organe samo 23% (18).

Dakle, gliomi i melanomi su tumori koji se odlikuju velikom agresivnošću i značajnim metastatskim potencijalom. Takođe, uprkos intenzivnim istraživanjima, još uvek ne postoji efikasna terapija za ove vrste tumora (15, 19, 20).

Ćelijska smrt

Cilj hemoterapije je inhibicija proliferacije ili indukcija smrti tumorskih ćelija, najčešće putem apoptoze. Tumorske ćelije često postaju rezistentne na indukciju apoptoze, zbog čega se sve više istražuju mehanizmi alternativnih puteva ćelijske smrti, kao što su nekroza, nekroptoza, ferroptoza, autofagija i lizozomalna ćelijska smrt. Apoptoza (programirana ćelijska smrt tipa I) je evolutivno konzerviran i genetski determinisan proces eliminacije oštećenih i suvišnih ćelija u normalnim fiziološkim uslovima, tokom embriogeneze, diferencijacije i regulacije imunskog sistema, kao i u patološkim stanjima (1, 21). Tokom apoptoze u ćelijama dolazi do niza morfoloških promena kao što su kondenzacija hromatina, smanjenje volumena ćelije, razgradnja citoskeleta

i segmentacija nukleusa, pri čemu se formiraju apoptotska tela, koja fagocituju makrofagi i dendritske ćelije (1, 21). Ceo proces apoptoze je kontrolisan aktivnošću enzima kaspaza, cistein proteaza koje se dele na inicijatorske (kaspaza-2, -8, -9, -10) i egzekutorske (kaspaza-3, -6, -7) (22). Dva glavna apoptotska puta su spoljašnji ili receptorski i unutrašnji ili mitohondrijalni put. Spoljašnji put započinje vezivanjem liganada za receptore smrti iz TNFR (*engl.* tumor necrosis factor receptor) familije i aktivacijom kaspaze-8 (23). Unutrašnji put pokreću faktori koji oštećuju DNK ili izazivaju ćelijski stres, dovodeći do depolarizacije i promena u propustljivosti spoljašnje membrane mitohondrija usled čega dolazi do oslobađanja proapoptotskih proteina iz mitohondrija i aktivacije kaspaze-9 (23, 24). Oslobođeni citohrom c iz mitohondrija formira sa Apaf-1 (*engl.* apoptotic protease activating factor 1) i kaspazom-9 apoptozom, što vodi aktivaciji egzekutorskih kaspaza (24).

Program ćelijskog umiranja apoptozom i nekrozom mogu izazvati isti stimulusi, ali se ovi stimulusi razlikuju po jačini i dužini trajanja (25). Tokom nekroze, ćelije prolaze niz morfoloških promena kao što su oticanje plazma membrane, formiranje citoplazmatskih vakuola, narušavanje integriteta membrane mitohondrija i lizozoma i gubitak integriteta plazma membrane, što dovodi do oslobađanja ćelijskog sadržaja u ekstraćelijski prostor i do inflamacije (26-28). Nekroza je pasivan proces koji obično zahvata veće grupe ćelija, dok je apoptoza aktivan proces ograničen na pojedinačne ćelije (25). Intracelularni nivoi glavnog energetskog molekula adenozin-trifosfata (ATP) imaju odlučujuću ulogu u indukciji apoptoze i nekroze: visoki nivoi ATP favorizuju apoptozu, dok niski nivoi favorizuju nekrozu (29). Nekroptoza, programirana nekroza, pokreće se vezivanjem TNF- α i Fas liganda za odgovarajuće receptore, što dovodi do fosforilacije RIPK1 i RIPK3 kinaza (*engl.* receptor-interacting protein kinase 1 and 3) i formiranja specijalnog molekularnog kompleksa nekrozoma (26). Ferroptoza, takođe vrsta programirane nekroze, ne zavisi od aktivnosti RIPK kinaza, već je izazvana oksidativnim stresom i peroksidacijom lipida pod uticajem slobodnog gvožđa (30, 31).

Autofagija je proces razlaganja oštećenih organela i proteina preko sistema lizozoma. U uslovima metaboličkog stresa, kao što su gladovanje, oštećenje DNK ili oksidativni stres, autofagija služi kao alternativni izvor energije za održavanje osnovnog ćelijskog metabolizma i preživljavanje (32-34). Osim toga, mitofagija razgrađuje depolarizovane i oštećene mitohondrije koje su proizvođači velikih količina RKV (35), čime se smanjuje oksidativni stres i omogućava preostalim neoštećenim mitohondrijama da se umnože (36). Međutim, neadekvatno i preterano aktivirana autofagija može dovesti do smrti ćelije i tada se naziva programirana ćelijska smrt tipa II (37, 38). Postoje tri oblika autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i šaperonima posredovana autofagija (39). Makroautofagija je glavni put za eliminaciju oštećenih organela i disfunkcionalnih proteina (37, 39). Taj proces počinje obuhvatanjem unutarćelijskog sadržaja dvostrukom membranom fagoforom i nastankom autofagozoma (37). Autofagozom se zatim spaja sa lizozomom, formirajući autolizozom, u kome se sekvstrirani sadržaj razgrađuje uz pomoć lizozomalnih kiselih hidrolaza (37). Različite faze autofagije (indukcija, stvaranje, sazrevanje i recikliranje autofagozoma) regulisane su produktima ATG gena (*engl.* autophagy related genes). Glavni inhibitor autofagije i ekspresije Atg proteina je serin/treonin kinaza mTOR (*engl.* mechanistic target of rapamycin) (40). Aktivnost mTOR je regulisana Akt i AMPK kinazama. Akt je serin-treonin kinaza koja zavisi od aktivnosti PI3K (*engl.* phosphatidylinositol 3-kinase) i osnovni je aktivator mTOR, dok je njegov glavni inhibitor AMPK (*engl.* AMP-activated protein kinase) (2). AMPK se aktivira u uslovima niskog energetskog statusa u ćeliji, odnosno smanjenog odnosa ATP/AMP (3).

Sinteza energije u tumorskim ćelijama

Kao osnovni izvor energije ćelije sisara koriste glukozu, nastalu razlaganjem ugljenih hidrata u digestivnom traktu ili razgradnjom molekula u procesu autofagije (41, 42). Kod netransformisanih ćelija

glukoza se procesima glikolize, oksidativne dekarboksilacije piruvata, TCA (*engl.* tricarboxylic acid) ciklusa i oksidativne fosforilacije oksiduje do CO_2 i H_2O , stvarajući energiju (Slika 1). Prva faza procesa glikolize uključuje fosforilaciju glukoze u glukozo-6-fosfat uz pomoć enzima heksokinaze (HK), izomerizaciju u fruktozo-6-fosfat, i fosforilaciju u fruktozo-1,6-bifosfat. Ovaj proces troši dva molekula ATP. U drugoj fazi, gliceraldehid-3-fosfat prelazi u 1,3-bisfosfoglicerat, uz nastajanje redukovanog nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). Sledeće reakcije uključuju formiranje 3-fosfoglicerata, 2-fosfoglicerata, fosfoenolpiruvata i, konačno, piruvata, uz sintezu ATP. Neto bilans glikolize su dva molekula ATP i dva molekula NADH (43, 44). Piruvat zatim ulazi u mitohondrije gde se oksidativno dekarboksiliše u acetil koenzim A (acetil-CoA), koji se zatim oksiduje u TCA ciklusu, stvarajući NADH, redukovani flavin-adenin dinukleotid (FADH_2) i guanozin-trifosfat (GTP). Elektroni oslobođeni iz NADH i FADH_2 prenose se preko lanca transporta elektrona (ETC), koji se sastoji od četiri mitohondrijska kompleksa (I, II, III i IV) smeštena u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, do O_2 kao konačnog akceptora. Ovaj proces stvara pH gradijent i električni potencijal na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, što izaziva povratni tok protona kroz membranu, omogućavajući sintezu ATP pomoću ATP sintaze (43).

Tumorske ćelije imaju povećane potrebe za energijom zbog brzih i nekontrolisanih proliferacija, a lako se prilagođavaju trenutnim uslovima sredine zahvaljujući svojoj velikoj genomske nestabilnosti (45). Dominantni način sinteze energije u tumorskim ćelijama zavisi od dostupnosti supstrata i faze neoplastičnog razvika (5), pa postoje značajne razlike u stvaranju energije među različitim tipovima kancera, ali i između različitih ćelija istog tumora (46). Pošto rast tumora obično nije praćen adekvatnom vaskularizacijom, ćelije unutar slabo vaskularizovanih delova solidnih tumora suočavaju se sa nedostatkom kiseonika odnosno hipoksijom zbog čega imaju pojačanu glikolizu (47). Međutim, nobelovac Otto Warburg je otkrio da tumorske ćelije i u prisustvu kiseonika prevashodno koriste glikolizu za proizvodnju ATP, što se naziva aerobna glikoliza ili Warburgov efekat (48). U anaerobnoj glikolizi, piruvat se ne prevodi u acetil-CoA već u laktat, što dovodi do lokalnog zakišeljavanja, koje olakšava invaziju tumora i degradaciju ekstracelularnog matriksa (49). Procenjeno je da u zdravim ćelijama 90% ATP nastaje procesom oksidativne fosforilacije, a samo 10% ATP procesom glikolize (48). U tumorskim ćelijama je taj odnos značajno promenjen, oko 60% ATP nastaje glikolizom, a 40% oksidativnom fosforilacijom (48), pa bi inhibicija glikolize mogla biti dobra strategija u antitumorskoj terapiji.

Iako većina tumora koristi glikolizu, neki tumori ili pojedine ćelije unutar tumora više koriste oksidativnu fosforilaciju (50, 51). Na primer, pokazano je da neke matične ćelije kancera i tumorske ćelije rezistentne na citostatike imaju pojačanu oksidativnu fosforilaciju (52). Ako je glikoliza inhibirana ili se završava formiranjem laktata, supstrati za oksidativnu fosforilaciju mogu se dobiti iz metabolizma masnih i aminokiselina posredstvom TCA ciklusa (53, 54). U skladu sa tim, pokazano je da postoje i tumori koji koriste masne kiseline (55) i aminokiseline (56) kao osnovni izvor energije.

Zbog velike sposobnosti tumorskih ćelija da prilagođavaju svoj energetske metabolizam u zavisnosti od dostupnosti supstrata, brojni pokušaji inhibicije pojedinačnog puta stvaranja energije u antitumorskoj terapiji nisu imali značajnog uspeha. Stoga sve više se ispituju antitumorski efekti kombinovane inhibicije različitih mehanizama sinteze ATP.

2-Dezoksi-D-glukoza (2DG)

Enzimi koji katalizuju ireverzibilne reakcije glikolize, poput heksokinaze, fosfofruktokinaze i piruvat kinaze, regulišu proces glikolize. U tumorskim ćelijama dominira forma II HK (HKII), vezana za membranu

mitohondrija, koja osim u stvaranju energije učestvuje i u proliferaciji (57). HKII može inhibirati apoptozu i regulisati propustljivost tranzicione pore u mitohondrijama (MPTP), blokirajući aktivnost proapoptotskih proteina (58). Pokazano je da eliminacija HKII iz membrana mitohondrija indukuje apoptozu u tumorskim ćelijama (59).

Najčešće korišćeni inhibitor heksokinaze je 2-dezoksi-D-glukoza (2DG). 2DG takođe inhibira transport glukoze u ćeliju, smanjuje nivo ATP, uzrokuje promene u glikozilaciji proteina i ekspresiji gena, zaustavlja ćelijski ciklus, izaziva oksidativni stres i apoptozu (60-62). Ova supstanca je relativno netoksična i predstavlja potencijalan lek za antitumorsku terapiju (63, 64). Kliničke studije su pokazale da pacijenti sa gliomima dobro podnose terapiju 2DG u kombinaciji sa radioterapijom (65, 66). 2DG je pogodna za tretman tumora mozga jer prolazi kroz krvno moždanu barijeru (4, 5). Važno je istaći da bi 2DG mogla selektivno delovati na tumorske ćelije, budući da se usled nedostatka kiseonika u njima povećava ekspresija transportera glukoze i glikolitičkih enzima, čime se povećava i unos 2DG u ćelije (6-8). Pokazano je da 2DG ispoljava snažan antitumorski potencijal *in vitro* (67-69).

Rotenon

Pored inhibitora glikolize i supresori oksidativne fosforilacije su intenzivno ispitivani kao potencijalni antitumorski lekovi (9). Rotenon, jedinjenje izolovano iz biljaka porodice Leguminosae, istražuje se kao potencijalni lek za tretman tumora (51). On blokira transfer elektrona sa kompleksa I respiratornog lanca, čime inhibira oksidaciju NADH u mitohondrijama i sintezu ATP. To dovodi do formiranja reaktivnih kiseoničkih vrsta (RKV) koje oštećuju DNK i druge mitohondrijske komponente, indukujući apoptozu (70, 71). Rotenon takođe inhibira grupisanje mikrotubula, zaustavljajući proliferaciju tumorskih ćelija (72). Pokazano je da rotenon inhibira rast tumorskih ćelija *in vitro* (73, 74), kao i rast spontano ili hemijski indukovanih tumora u miševima i pacovima (63, 65). Rotenon lako prolazi krvno-moždanu barijeru i izaziva neurotoksičnost (75), a pokazuje i značajnu toksičnost prema hematopoetskom tkivu i koštanoj srži (10). Sa druge strane, rotenon ima protektivnu ulogu u akutnoj bolesti bubrega uzrokovanoj hipoksijom (76).

Lizozomi tumorskih ćelija

Prilikom procesa maligne transformacije pored promena energetskeg metabolizma, dolazi i do značajnih promena u građi i funkciji lizozoma. Lizozomi su organele koje poseduju jednoslojnu membranu, unutar koje sadrže preko 60 hidrolitičkih enzima, uključujući proteaze, nukleaze, lipaze, glikozidaze, fosfolipaze i fosfataze, koji su aktivni u kiselj sredini, pa se zajedno nazivaju kiselim hidrolazama (13, 14). Glavna funkcija lizozoma je razgradnja ekstraćelijskih i unutarćelijskih komponenti dobijenih endocitozom, fagocitozom i autofagijom (15). Tokom onkogeneze dolazi do povećanja broja i zapremine lizozoma, njihovog enzimskog sadržaja, kao i do redistribucije lizozoma iz perinuklearne u perifernu citoplazmu, što promovira invazivni rast tumora, angiogenezu i otpornost na lekove (16). Zbog brzog i nekontrolisanog rasta tumorske ćelije akumuliraju veliku količinu proteinskih agregata i oštećenih organela koje se razgrađuju u autolizozomima (13). Razgradnjom ćelijskog sadržaja u lizozomima obezbeđuje se glukoza koja se dalje razlaže glikolizom, aminokiseline i masne kiseline koje se oksiduju u mitohondrijama, čime se dobija ATP neophodan za zadovoljavanje povećanih energetskeg potreba tumorskih ćelija (17). Osim toga, sekrecija lizozomalnih enzima u ekstraćelijski prostor dovodi do zakišeljavanja mikrookoline što pospešuje rast tumora, angiogenezu i metastaze (13). Lizozomi takođe skladište hidrofobne slabo bazne lekove u koje spadaju i pojedini antitumorski lekovi (77), čime sprečavaju njihovo dejstvo i doprinose razvoju multirezistencije (78, 79).

Nasuprot tome što mnogobrojni i uvećani lizozomi predstavljaju selektivnu prednost za rast i progresiju tumora, oni mogu učestvovati u indukciji smrti tumorskih ćelija ukoliko njihovi enzimi isure u citoplazmu, pa se smatraju pogodnom metom za antitumorsku terapiju (19). Povećanoj osetljivosti lizozomalne membrane na permeabilizaciju doprinosi i smanjena koncentracija protektivnog proteina LAMP (*engl.* lysosomal-associated membrane protein) na unutrašnjoj strani membrane i povećana koncentracija destabilišućeg lipida sfingozina sa spoljašnje strane lizozoma tumorskih ćelija (80). Tumorske ćelije imaju brz metabolizam proteina koji sadrže gvožđe, te akumuliraju gvožđe u lizozomima u obliku jona Fe^{2+} , koji Fentonovom reakcijom podstiču sintezu reaktivnog hidroksilnog radikala ($OH\cdot$), a nastali $OH\cdot$ takođe oštećuje lizozomalnu membranu (81). Oslobođanje lizozomalnih hidrolaza i lizozomalna ćelijska smrt (LCD, *engl.* Lysosomal cell death) posledica su permeabilizacije lizozomalne membrane (LMP, *engl.* Lysosomal membrane permeabilization) (20). LMP indukuju jedinjenja koja se akumuliraju u lizozomima i povećavaju osmotski pritisak u njima: lizozomotropni deterdženti, dipeptidni metil estri, RKV, metaboliti lipida, katjonski amfilni lekovi (20). Glavni medijatori LCD su katepsini B, D i L, koji su, osim u kiseloj sredini lizozoma, donekle aktivni i u neutralnoj sredini citoplazme, pa mogu da razgrade citoplazmatske proteine ukoliko izađu iz lizozoma (21, 82). U zavisnosti od stepena oštećenja lizozoma, LCD može imati morfološke karakteristike apoptoze ili nekroze (22). Ograničeni LMP aktivira apoptozu (83), a obimno oštećenje lizozoma indukuje nekrozu (23).

N-dodecilimidazol

N-dodecilimidazol (NDI) je lizozomotropno jedinjenje sa svojstvima deterdženata koje je 1979. godine sintetisao dr Raymond Firestone sa svojim saradnicima (84). NDI na kraju dugog ugljovodoničnog lanaca sadrži imidazol i zbog takve strukture ima sposobnost da difunduje kroz membranu lizozoma, pri čemu u kiseloj sredini postaje protonovan i zarobljen, izazivajući LMP i LCD (85-87). Pošto je NDI acidotropan i u kiselim uslovima dobija svojstva deterdženta, a prostor oko tumorskih ćelija ima smanjeni pH, NDI bi mogao imati selektivno dejstvo na tumore (88).

Kombinovana antitumorska terapija

Kombinovana terapija lekovima sa različitim mehanizmima delovanja povećava terapijski odgovor i smanjuje razvoj rezistencije (89). Inhibitor glikolize 2DG ispoljava snažno citotoksično delovanje *in vitro* (23-26), ali su antitumorski efekti samostalnog tretmana 2DG u *in vivo* studijama ograničeni (67-69). Sa druge strane, 2DG značajno povećava antitumorski efekat različitih citostatika (adriamicina, paklitaksela, metformina), u *in vivo* i kliničkim ispitivanjima (24, 26). Mi smo takođe ispitivali antitumorski efekat dva kombinovana antitumorska tretmana zasnovana na 2DG. Imajući u vidu da istovremena inhibicija glikolize i oksidativne fosforilacije ima snažan antitumorski efekat (90), 2DG smo kombinovali sa inhibitorom oksidativne fosforilacije rotenonom. Takođe, budući da lizozomi tumorskih ćelija lako podležu destabilizaciji (91, 92), 2DG smo kombinovali sa lizozomalnim deterdžentom NDI.

Kombinovana terapija 2DG i rotenona

Prethodna ispitivanja su pokazala da 2DG pojačava citotoksično delovanje rotenona (ROT) na ćelije osteosarkoma (93), epitela jajnika (94) i debelog creva (90). S druge strane, 2DG inhibira smrt dopaminergičkih neurona indukovanu rotenonom u kulturi supresijom oksidativnog stresa i depolarizacije mitohondrija (95). Naši rezultati pokazuju snažno sinergističko toksično delovanje kombinovanog tretmana

2DG+ROT na ćelije melanoma i glioma, dok su primarne mezenhimalne ćelije gotovo neosetljive na ovaj tretman (96, 97). Veća senzitivnost tumorskih nego primarnih ćelija na tretman 2DG+ROT može se objasniti njihovim bržim metabolizmom i većim energetske potrebama u odnosu na netransformisane ćelije (98).

Tretmani sa 2DG ili rotenonom smanjuju koncentraciju ATP u ćelijama (96), ali je deplecija energije najjača nakon kombinovanog tretmana (99, 100). Zanimljivo je da 2DG smanjuje koncentraciju ATP više nego rotenon, što se može objasniti činjenicom da je aerobna glikoliza glavni put sinteze energije u ovim ćelijama (47, 49), ili time da inhibicija glikolize smanjuje i sledstvenu proizvodnju energije oksidativnom fosforilacijom (101). U skladu sa činjenicom da se piruvat kao krajnji produkt glikolize prevodi u acetil-CoA i ulazi u TCA ciklus, pri čemu nastaju supstrati za oksidativnu fosforilaciju NADH i FADH₂ (101), dodavanje piruvata medijumu za kultivaciju smanjuje toksičnost 2DG+ROT (96). Međutim, pokazani efekat može biti i posledica antioksidativnog delovanja piruvata (102). Takođe, pošto su 2DG i glukoza u kompeticiji za heksokinazu (103), dodavanje glukoze u medijum smanjuje toksičnost kombinovanog tretmana (96). Da su inhibicije glikolize i oksidativne fosforilacije odgovorne za antitumorsko delovanje 2DG+ROT dokazuje činjenica da je sličan antitumorski efekat pokazan kombinovanjem drugih inhibitora glikolize i oksidativne fosforilacije. 2DG sinergizuje sa MPP+ i CCCP, a rotenon sa jodoacetatom, kao i totalnom deplecijom glukoze iz medijuma za kultivaciju, u ubijanju tumorskih ćelija (96). Za razliku od 2DG koja se ispituje kao antitumorska terapija u brojnim kliničkim studijama (27) (NCT00096707, NCT00633087), rotenon je visoko toksični agens i ne može se koristiti za lečenje pacijenata (104). Zbog toga se rezultati naše studije mogu razmatrati samo kao potencijalna strategija za antitumorsku terapiju zasnovanu na istovremenoj inhibiciji glikolize i oksidativne fosforilacije. U kliničkim ispitivanjima rotenon bi se mogao zameniti manje toksičnim inhibitorima oksidativne fosforilacije, kao što su arsenik trioksid (NCT01791894; NCT01470248) ili BAY 87-2243 (NCT01297530). Osim istovremenog targetovanja glikolize i oksidativne fosforilacije u antitumorskoj terapiji, kombinacija 2DG i rotenona mogla bi takođe oponašati hipoksična i ishemijska stanja u tumorskim ćelijama sa ograničenom dostupnošću kiseonika i glukoze (99).

Očekivano, snažna energetska deplecija uzrokovana kombinovanim tretmanom stimuliše osnovni unutarćelijski energetski senzor, a suprimira aktivnost njegovog supstrata mTORC1 u tumorskim ćelijama (96). Aktivacija AMPK može imati citotoksičnu ili citoprotektivnu ulogu u rastu tumora (105). U skladu sa rezultatima drugih autora (106), naša istraživanja pokazuju da AMPK štiti tumorske ćelije od energetske deplecije izazvane 2DG+ROT (96). Iako je aktivacija mTORC1 protektivni signal (40), pokazali smo da antimelanomski efekat kombinovanog tretmana ne zavisi od supresije mTORC1 (96).

2DG+ROT indukuje snažnu aktivaciju AMPK i inhibiciju mTORC1, što predstavlja osnovni signalni put za indukciju autofagije (40). Paradoksalno, u našim istraživanjima kombinovani tretman je inhibirao autofagiju (96). Ovaj rezultat je u koliziji sa opšteprihvaćenim uverenjem da se autofagija aktivira u uslovima energetske deplecije (33). Sa druge strane, autofagija je energetski zavisani proces i postoji prag koncentracije ATP koji je neophodan za indukciju autofagije (34). Stoga, snažna energetska deplecija bi mogla suprimirati indukciju autofagije. U skladu sa ovom pretpostavkom pokazano je da je autofagija inhibirana u ćelijama tumora pankreasa tretiranim 2DG u kombinaciji sa oligomicinom (107), metforminom (108) ili umerenom hipoksijom (109). U našoj studiji kombinovani tretman snižava nivo beclin-1 i LC3-II proteina, dok je koncentracija autofagnog supstrata p62 blago povećana (96). Smanjenje koncentracije LC3-II može biti ili posledica njegovog smanjenog stvaranja ili pojačane razgradnje u autolizozoma (110). Ispitivanjem autofagnog fluksa u prisustvu inhibitora proteolize bafilomicina A1 pokazali smo da 2DG+ROT ne povećava razgradnju LC3-II proteina, već inhibira konverziju LC3-I u LC3-II, odnosno stvaranje autofagozoma (96). Takođe smo pokazali da kombinovani tretman smanjuje broj kiselih vezikula u citoplazmi (96), koje mogu

biti autolizozomi ili lizozomi (111). 2DG se smatra induktorom autofagije (107), mada postoje studije koje pokazuju da 2DG inhibira autofagiju (112). Takođe, i rotenon može da stimuliše, ali i da inhibira autofagiju (113). Međutim, kako je pokazano merenjem autofagnog fluksa samostalni tretmani 2DG i ROT nisu ni stimulisali ni inhibirali autofagiju (96). Genetska supresija autofagije pomoću LC3 i beclin-1 siRNA (*engl. small interfering RNA*) i farmakološka inhibicija bafilomicinom A1, hlorokinom i NH_4Cl nisu uticale na vijabilnost tumorskih ćelija tretiranih kombinovanim tretmanom (96), pa smo zaključili da autofagija indukovana 2DG+ROT nije ni protektivna ni citotoksična.

Deplecija ATP i indukcija oksidativnog stresa su jedini unutarćelijski mehanizmi citotoksičnog delovanja 2DG+ROT koji su pokazani pre našeg istraživanja (90). Naši rezultati su pokazali da 2DG+ROT indukuje oslobađanje superoksida (O_2^-) i citohroma c iz mitohondrija, koji zatim aktivira kaspaze. Poznato je da citohrom c u citosolu, formira kompleks sa Apaf-1, koji aktivira kaspazu-9, što dovodi do aktivacije kaspaze-3 (114). Kombinovani tretman indukuje aktivaciju efektorske kaspaze-3, kao i inicijatorskih kaspaza-8 i -9. Interesantno je da nakon aktivacije kaspaza ne dolazi do fragmentacije DNK, niti do proteolitičkog isecanja PARP (96). To se može objasniti činjenicom da je za translokaciju aktiviranih kaspaza u nukleus i izvršenje kasnijih koraka apoptoze potreban ATP (28, 29). Citotoksično delovanje 2DG+ROT započinje indukcijom apoptoze, koja se zbog nedostatka ATP pretvara u nekrozu (96), što se može objasniti činjenicom da za ovu vrstu ćelijske smrti nije potrebna velika količina energije (115). Pored podataka da antitumorsko delovanje kombinacije 2DG+ROT ne zavisi od apoptoze i autofagije, korišćenjem odgovarajućih farmakoloških inhibitora pokazali smo da ono takođe ne zavisi od nekroptoze i ferroptoze (96).

Zajedno sa drugim autorima utvrdili smo da 2DG povećava (96), a rotenon smanjuje mitohondrijski potencijal (95, 96), verovatno inhibicijom kompleksa I respiratornog lanca (116). U prvih 16 h 2DG je svojom hiperpolarizacijom aktivnošću neutralisala depolarizaciju indukovanu rotenonom (96), slično kao što je ranije pokazano na mišjim dopaminergičnim neuronima (95). Međutim, nakon 24 h, kada su mitohondrije kao i većina drugih organela veoma oštećene, mitohondrijska depolarizacija izazvana kombinovanim tretmanom prevazilazi depolarizaciju indukovanu samim rotenonom (96). Osim oštećenja mitohondrija, njihovoj snažnoj depolarizaciji nakon 24 h mogao bi doprineti i oksidativni stres, koji je poznati induktor depolarizacije mitohondrija (30), kao i snažna energetska deplecija, imajući u vidu da je ATP neophodan za održavanje membranskog potencijala mitohondrija (31). Pošto ćelijska smrt prethodi kasnoj depolarizaciji mitohondrija (96) i inhibitor otvaranja mitohondrijske pore ciklosporin A (37) ne umanjuje toksičnost kombinovanog tretmana (96), zaključili smo da depolarizacija mitohondrija ne učestvuje u antitumorskom delovanju 2DG+ROT.

Pokazano je da 2DG+ROT tretman indukuje oksidativni stres u ćelijama kolorektalnog karcinoma (39). Takođe, u našoj studiji kombinovani tretman sinergistički indukuje produkciju mitohondrijskog O_2^- (96). Imajući u vidu da citohrom c uklanja O_2^- (117) i otpuštanje citohroma c iz mitohondrija moglo je da stimuliše povećanje koncentracije O_2^- . Antioksidans α -tokoferol smanjuje toksičnost kombinovanog tretmana, što sugeriše da mitohondrijski O_2^- ima ključnu ulogu u citotoksičnosti 2DG+ROT (96).

Citohrom c se nalazi vezan za unutrašnju membranu mitohondrija i nakon prekida ove veze može proći kroz permeabilizovanu spoljašnju membranu mitohondrija (118). I O_2^- (117) i citohrom c (119, 120) izlaze iz mitohondrija kroz voltažno-zavisni anjonski kanal (VDAC). O_2^- stimuliše otvaranje VDAC (121), čime se formira pozitivna povratna sprega između ova dva procesa. Sa druge strane, HKII, glavna meta 2DG (122) i protektivni molekul tumorskih ćelija (123), stabilizuje zatvorenu formu VDAC (124). Pokazano je da se preko 70% HKII nalazi u spoljašnjoj membrani mitohondrija vezano za VDAC i da inhibira oslobađanje citohroma c u citosol (119). Kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje oslobađanje HKII sa membrane mitohondrija u

citoplazmu (96), što bi za posledicu moglo imati otvaranje VDAC kanala, pokazani izlazak citohroma c i O_2^- iz mitohondrija i nekrozu. U skladu sa ovakvom pretpostavkom, inhibitor otvaranja VDAC 4,4'-diizotiocijanostilben-2,2'-disulfonat (DIDS) (125) delimično umanjuje toksičnost 2DG+ROT (96).

Različiti tretmani stimulišu oslobađanje citohroma c i ćelijsku smrt aktivacijom JNK (*engl.* Jun N-terminal kinase) (126). U skladu sa činjenicom da se JNK aktivira u uslovima energetske deplecije (127), kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje snažnu aktivaciju JNK (96). Inhibitor JNK SP600125 smanjuje citotoksičnost kombinovanog tretmana (96), sugerišući da aktivnost JNK doprinosi antitumorskom delovanju 2DG+ROT. Pošto je pokazano da otvaranje VDAC indukuje aktivaciju JNK i sledstveno oslobađanje O_2^- iz mitohondrija (40, 128), ali i da aktivacija JNK povećava otvaranje VDAC i apoptozu zavisnu od kaspaza (32), moguće je da u tretmanu 2DG+ROT aktivacija JNK stimuliše otvaranje VDAC, ali i da otvoreni VDAC aktivira JNK, kao i da postoji pozitivna povratna sprega između ova dva procesa.

Opisani mehanizam antitumorskog delovanja kombinovanog tretmana 2DG+ROT može se šematski prikazati Slikom 2. Ukratko, kombinovani tretman 2DG+ROT indukuje oslobađanje HKII sa membrane mitohondrija i otvaranje VDAC, kroz koji zatim izlaze O_2^- i citohrom c. Citohrom c stimuliše aktivaciju kaspaza, ali zbog nedostatka ATP, indukovano istovremenom inhibicijom glikolize i oksidativne fosforilacije, ne dolazi do fragmentacije DNK i apoptoza prelazi u nekrozu. Zanimljivo je da, iako deplecija energije indukuje aktivaciju AMPK i inhibiciju mTORC1, ne dolazi do stimulacije, već do inhibicije autofagije. Osim toga, kombinovani tretman stimuliše i aktivaciju JNK, koja učestvuje u citotoksičnom efektu, verovatno dodatnom stimulacijom oslobađanja O_2^- iz mitohondrija.

Kombinovana terapija 2DG i NDI

Imajući u vidu da tumorske ćelije zavise od glikolize više nego normalne ćelije (48) i da su podložnije LMP nego normalne ćelije (92), ispitivali smo antitumorski potencijal kombinovane inhibicije glikolize i destabilizacije lizozoma. Iako efekti inhibicije glikolize i destabilizacije lizozoma pojedinačno jesu već ispitivani, do sada niko nije ispitivao antitumorsku aktivnost njihove kombinacije. U našim istraživanjima koristili smo 2DG da bi inhibirali glikolizu, a za destabilizaciju lizozoma prethodno pomenuti lizosomalni deterdžent NDI. Pokazali smo da 2DG i NDI sinergistički ubijaju humane gliomske U251 i mišje melanomske B16 ćelije, ali ne i primarne astrocite (97). Ranije je pokazano da su diferencirani HL-60 promijelociti manje osetljivi na NDI nego nediferencirane ćelije HL-60 (33).

Biološki efekti NDI su do sada ispitivani samo *in vitro*, odnosno nije poznato kako bi se NDI ponašao u organizmu čoveka. Stoga je važno istaći da u našoj studiji 2DG nije sinergizovala u ubijanju tumorskih ćelija samo sa NDI, već i sa lizomotropnim lekom hlorokinom, koji se široko koristi u tretmanu malarije i reumatoidnog artritisa (38). Hlorokin je inhibitor autofagije (129), koji ima sposobnost da indukuje LMP ukoliko se koristi u visokim koncentracijama (45). Takođe, u našoj prethodnoj studiji pokazali smo da hlorokin u stanju energetske deplecije, izazvane deprivacijom seruma iz medijuma za kultivaciju, indukuje snažnu destabilizaciju lizozoma (46). Za razliku od hlorokina, drugi inhibitor autofagije supresor vakuolarne (H^+)-ATPaze bafilomicin A, koji alkalizuje lizosome i sprečava autofagnu proteolizu (47), ali ne može da izazove LMP (41, 42, 48), ne sinergizuje sa 2DG u ubijanju tumorskih ćelija, što sugerise da je upravo LMP odgovorna za citotoksičnost 2DG+NDI (97). Ova pretpostavka potvrđena je protektivnim efektom inhibitora katepsina E64d (97). Ranije je pokazano da hlorokin sinergizuje sa 2DG u ubijanju ćelija rabdiosarkoma i raka prostate, ali autori nisu ispitivali ulogu permeabilizacije lizozoma, već su sugerisali da je inhibicija protektivne autofagije odgovorna za citotoksični efekat (43). Dalje, imajući u vidu da smo pokazali da pored 2DG i drugi inhibitori glikolize

jodoacetat (IA) i natrijumfluorid (NaF) sinergizuju sa NDI u ubijanju tumorskih ćelija, zaključili smo da je upravo inhibicija glikolize odgovorna za antitumorsko delovanje kombinovanog tretmana (97).

I 2DG i NDI, a naročito njihova kombinacija, izazivaju naglo smanjenje ATP u tumorskim ćelijama, što je potvrđeno i aktivacijom AMPK i njegovog supstrata Raptor (97). Smanjenje ATP u ćelijama tretiranim sa 2DG je logična posledica inhibicije glikolize. Sa druge strane, postavlja se pitanje kakva je veza između LMP indukovanoj pomoću NDI i smanjenja ATP (97). Naši rezultati su pokazali da NDI izaziva depolarizaciju mitohondrija (97), a poznato je da je elektrohemijski gradijent na membrani mitohondrija neophodan za oksidativnu fosforilaciju (43). Takođe, transmisiona elektronska mikroskopija pokazala je sposobnost NDI da izazove kondenzaciju matriksa u mitohondrijama (97), koja nastaje kao posledica pada potencijala membrane mitohondrija (44). Naši rezultati su u saglasnosti sa ranije pokazanom sposobnošću drugih induktora LMP da izazovu depolarizaciju mitohondrija katepsin-zavisnim (42) i katepsin-nezavisnim mehanizmima (49). Katepsini mogu proteolitički aktivirati Bid (*engl.* BH3-interacting domain death agonist) i izazvati permeabilizaciju membrane mitohondrija, dok su katepsin-nezavisni mehanizmi posredovani aktivnošću lizosomalnih lipaza i članova Bcl-2 (*engl.* B-cell lymphoma 2) familije proteina: Bax (*engl.* Bcl-2-associated X protein) i Bak (*engl.* Bcl-2 antagonist/killer) (49). Takođe, NDI se akumulira u mitohondrijama (57), što sugeriše na mogućnost da direktno inhibira njihovu funkciju. Pošto je inhibitor katepsina samo delimično spasio tumorske ćelije od 2DG+NDI (97), pretpostavljamo da i katepsin-zavisni i katepsin-nezavisni mehanizam učestvuju u indukciji oštećenja mitohondrija i ćelijskoj smrti. Sa druge strane, iako sama 2DG nije izazvala, dodatno je povećala depolarizaciju i oštećenje mitohondrija indukovano NDI (97), što se može objasniti činjenicom da ćelije u stresu nastalom usled oštećenja mitohondrija pokušavaju da održe potencijal mitohondrijske membrane hidrolizom ATP generisanog tokom glikolize (31). Međutim, pošto je glikoliza blokirana, ovaj mehanizam je nefunkcionalan i ćelije umiru, kao što je ranije pokazano u tumorskim ćelijama koje su istovremeno tretirane 2DG i lekovima koji oštećuju mitohondrije (25). Stoga, pretpostavljamo da LMP aktiviran NDI tretmanom izaziva inicijalnu depolarizaciju mitohondrija, koju dodatno povećava 2DG, zbog nedostatka glikolizom nastalog ATP, neophodnog za održavanje funkcije mitohondrija, što na kraju dovodi do začaranog kruga pozitivnih povratnih sprega, disfunkcije mitohondrija i gubitka ATP (Slika 3).

Sinergistički porast koncentracije O_2^- proizvedenog u mitohondrijama, ukupnih RKV i peroksidacija lipida, kao i zaštitno delovanje antioksidanasa, ukazuju na važnu ulogu oksidativnog stresa u citotoksičnosti 2DG+NDI tretmana (97). Istovremeni porast depolarizacije mitohondrija i produkcije O_2^- u ćelijama tretiranim 2DG+NDI je u skladu sa činjenicom da kolaps mitohondrijskog potencijala povećava stvaranje O_2^- na elektron transportnom lancu (130). To može dovesti do stvaranja drugih RKV, kao što su H_2O_2 i OH^\bullet , koji oksiduju mitohondrijsku DNK, enzim TCA ciklusa akonitazu i lipide mitohondrijalne membrane, što povećava njenu propustljivost i dovodi do disfunkcije mitohondrija (130). Osim toga, H_2O_2 može ući u lizosome, gde se Fentonovom reakcijom transformiše u OH^\bullet (131), koji je izuzetno reaktivan i indukuje peroksidaciju lipida u lizosomalnoj membrani i LMP (131). Bitno je istaći da su lizozomi veoma osetljivi na delovanje H_2O_2 jer ne poseduju katalazu i glutation peroksidazu, enzime neophodne za njegovu degradaciju (131). Međutim, imajući u vidu da helatori gvožđa nisu poništili efekat kombinovanog tretmana (97), malo je verovatno da je ovaj mehanizam odgovoran za njegovo citotoksično delovanje. Sa druge strane, budući da je antioksidans α -tokoferol sprečio sinergističku indukciju LMP, moguće je da RKV iz oštećenih mitohondrija indukuju sinergističku destabilizaciju lizozoma u kasnijim terminima 2DG+NDI tretmana (97). To sugeriše da destabilizacija lizozoma indukovana RKV, može potencirati depolarizaciju mitohondrija i energetski stres, što konačno rezultira nekrozom, odnosno da u kasnijim stadijumima kombinovanog tretmana postoji složena pozitivna povratna sprega između oštećenja različitih struktura i funkcija tumorske ćelije (97).

Energetski stres, oksidativni stres i oštećenje mitohondrija su glavni izazivači autofagije (58). Pokazali smo da energetski stres indukovana tretmanima NDI i 2DG+NDI korelira sa aktivacijom AMPK i aktivacijom njenog supstrata Raptor, kao i sa porastom nivoa LC3-II molekula i broja autofagnih vezikula (97). Međutim, povećana akumulacija LC3-II proteina i povećan broj autofagozoma nakon tretmana NDI najverovatnije potiče od inhibicije autofagne proteolize nastale zbog oštećenja lizozoma, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u eksperimentima sa drugim lizozomalnim inhibitorima (47). Sa druge strane, tretman 2DG ne povećava nivo LC3-II, ali dodatno podiže nivo LC3-II u kombinaciji sa NDI. Imajući u vidu da NDI oštećuje lizosome i inhibira autofagnu proteolizu, ovaj eksperiment se može smatrati klasičnim testom za određivanje autofagnog fluksa (47), pa se iz njega može zaključiti da 2DG zapravo stimuliše indukciju autofagije (97). Nasuprot tome, prethodno smo pokazali da 2DG ne povećava nivo LC3-II u prisustvu lizozomalnog inhibitora bafilomicina A1 (96). Različita sposobnost 2DG da indukuje autofagiju u našim eksperimentima mogla bi se objasniti korišćenjem različitih koncentracija 2DG u različitim studijama (96, 97).

Pretpostavljeni mehanizam antitumorskog delovanja kombinovanog tretmana 2DG+NDI prikazan je na Slici 3. Ukratko, NDI indukuje LMP i izlazak katepsina iz lizozoma u citoplazmu. Katepsini zatim oštećuju membranu mitohondrija, indukujući oksidativni stres, depolarizaciju mitohondrija i blokadu oksidativne fosforilacije. Inhibicija oksidativne fosforilacije izazvana NDI zajedno sa supresijom glikolize izazvanom 2DG dovodi do snažne energetske deplecije. U odsustvu ATP, dolazi do još veće depolarizacije mitohondrija, inhibicije sinteze ATP i oksidativnog stresa, što konačno rezultira nekrozom tumorskih ćelija. Dakle, u osnovi sinergističke indukcije nekroze tretmanom 2DG+NDI su složene pozitivne povratne sprege, koje uključuju oštećenje lizozoma, depolarizaciju mitohondrija, depleciju ATP i oksidativni stres.

Zaključak

Naša istraživanja su pokazala da inhibicija glikolize u kombinaciji sa supresijom oksidativne fosforilacije ili permeabilizacijom lizozoma ispoljava snažan sinergistički citotoksični efekat na ćelije glioma i melanoma. Budući da je incidenca ovih tumora u stalnom porastu i da efikasna terapija za njih još uvek ne postoji, rezultati naših istraživanja podržavaju dalje proučavanje terapijskog pristupa zasnovanog na kombinovanoj inhibiciji glikolize i oksidativne fosforilacije, odnosno na kombinovanoj inhibiciji glikolize i destabilizaciji lizozoma.

Zahvalnica

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući finansiranju Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, projekti 173053 i 41025, brojevi ugovora 451-03-9/2021-14/200007 i 451-03-9/2021-14/200110. Verica Paunović je dobitnica UNESCO L'OREAL nacionalne stipendije „Za žene u nauci“ (broj ugovora 403F).

Literatura

1. Alberts B, Heald R, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell* (Seventh Edition): W. W. Norton, Incorporated; 2022.
2. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. 2004;9(4):361-77.
3. Kallunki T, Olsen OD, Jäättelä M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? *Oncogene*. 2013;32(16):1995-2004.
4. Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, et al. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget*. 2014;5(7):1701-52.
5. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(11):829-46.

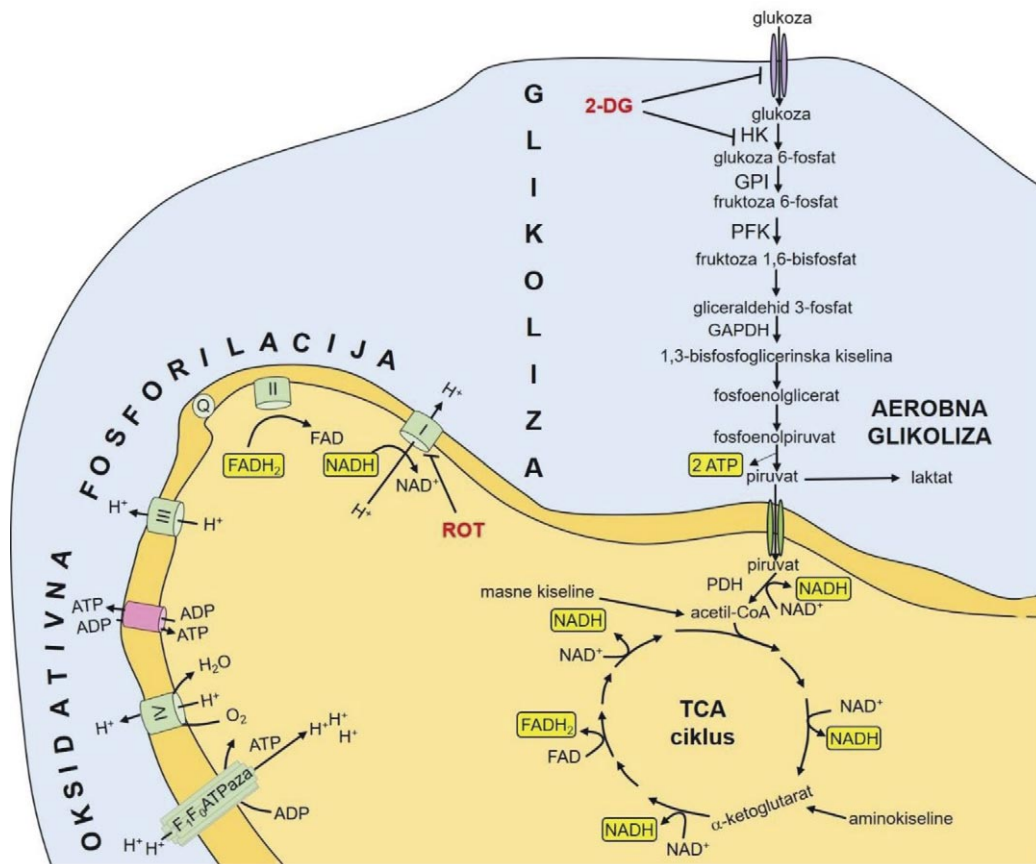
6. Paul WE. *Fundamental immunology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
7. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin LH, Parkin DM, et al. *International classification of diseases for oncology* / editors, April Fritz ... [et al.] . 3rd ed ed. Geneva: World Health Organization; 2000.
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
9. Reni M, Mazza E, Zanon S, Gatta G, Vecht CJ. Central nervous system gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;113:213-34.
10. Kaba SE, Kyritsis AP. Recognition and management of gliomas. *Drugs*. 1997;53(2):235-44.
11. Mohammed S, Dinesan M, Ajayakumar T. Survival and quality of life analysis in glioblastoma multiforme with adjuvant chemoradiotherapy: a retrospective study. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2022;27(6):1026-36.
12. Brown NF, Ottaviani D, Tazare J, Gregson J, Kitchen N, Brandner S, et al. Survival Outcomes and Prognostic Factors in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13).
13. Zaremba A, Zimmer L, Griewank KG, Ugurel S, Roesch A, Schadendorf D, et al. Immunotherapy for malignant melanoma. *Internist (Berl)*. 2020;61(7):669-75.
14. Gorantla VC, Kirkwood JM. State of melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(3):415-35.
15. Longvert C, Saiag P. Melanoma update. *La Revue de medecine interne*. 2019;40(3):178-83.
16. Sullivan RJ. The role of targeted therapy for melanoma in the immunotherapy era. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(2):112-9.
17. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
18. Rebecca VW, Somasundaram R, Herlyn M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. *Nature communications*. 2020;11(1):2858.
19. Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2014;9(1):1-25.
20. Hoang M-TR, Eichenfield LF. The Rising Incidence of Melanoma in Children And Adolescents. *Dermatology Nursing*. 2000 2000/06//:188.
21. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73(4):1907-16.
22. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research*. 2020;1867(6):118688.
23. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(4).
24. Hensley P, Mishra M, Kyprianou N. Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biol Chem*. 2013;394(7):831-43.
25. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
26. Dasgupta A, Nomura M, Shuck R, Yustein J. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. *Int J Mol Sci*. 2016;18(1).
27. Raffray M, Cohen GM. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol Ther*. 1997;75(3):153-77.
28. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(3):231-41.
29. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(12):3448-59.
30. Bebbber CM, Muller F, Prieto Clemente L, Weber J, von Karstedt S. Ferroptosis in Cancer Cell Biology. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1).
31. Mou Y, Wang J, Wu J, He D, Zhang C, Duan C, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):34.
32. Jain MV, Paczulla AM, Klönisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2013;17(1):12-29.
33. Jin S, White E. Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress. *Autophagy*. 2008;4(5):563-6.
34. Mandić M, Paunović V, Vučićević L, Kosić M, Mijatović S, Trajković V, et al. No energy, no autophagy-Mechanisms and therapeutic implications of autophagic response energy requirements. *J Cell Physiol*. 2024:e31366.

35. Wang K, Klionsky DJ. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy*. 2011;7(3):297-300.
36. Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, et al. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell*. 2007;129(5):983-97.
37. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):124-31.
38. Notte A, Leclere L, Michiels C. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochemical pharmacology*. 2011;82(5):427-34.
39. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
40. Paquette M, El-Houjeiri L, Pause A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1).
41. Tirone TA, Brunnicardi FC. Overview of glucose regulation. *World journal of surgery*. 2001;25(4):461-7.
42. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *The British journal of nutrition*. 2003;89(1):3-9.
43. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Stryer L, National Center for Biotechnology I. *Biochemistry*. 2002.
44. Alfarouk KO, Verdusco D, Rauch C, Muddathir AK, Adil HH, Elhassan GO, et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*. 2014;1(12):777-802.
45. Sonugür FG, Akbulut H. The Role of Tumor Microenvironment in Genomic Instability of Malignant Tumors. *Frontiers in genetics*. 2019;10:1063.
46. Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(6):552-61.
47. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, NZ)*. 2015;3:83-92.
48. Lis P, Dyląg M, Niedźwiecka K, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, et al. The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2016;21(12).
49. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*. 2016;41(3):211-8.
50. Jia D, Park JH, Jung KH, Levine H, Kaiparettu BA. Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. *Cells*. 2018;7(3).
51. Sica V, Bravo-San Pedro JM, Stoll G, Kroemer G. Oxidative phosphorylation as a potential therapeutic target for cancer therapy. *International journal of cancer*. 2020;146(1):10-7.
52. Wu Y, Zhang X, Wang Z, Zheng W, Cao H, Shen W. Targeting oxidative phosphorylation as an approach for the treatment of ovarian cancer. *Frontiers in oncology*. 2022;12:971479.
53. Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British journal of cancer*. 2020;122(1):4-22.
54. Lieu EL, Nguyen T, Rhyne S, Kim J. Amino acids in cancer. *Experimental & molecular medicine*. 2020;52(1):15-30.
55. Ma Y, Temkin SM, Hawkrigde AM, Guo C, Wang W, Wang XY, et al. Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer. *Cancer letters*. 2018;435:92-100.
56. Vettore L, Westbrook RL, Tennant DA. New aspects of amino acid metabolism in cancer. *British journal of cancer*. 2020;122(2):150-6.
57. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*. 2006;25(34):4777-86.
58. Cheung EC, Ludwig RL, Vousden KH. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(50):20491-6.
59. Chiara F, Castellaro D, Marin O, Petronilli V, Brusilow WS, Juhaszova M, et al. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PloS one*. 2008;3(3):e1852.
60. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer letters*. 2014;355(2):176-83.

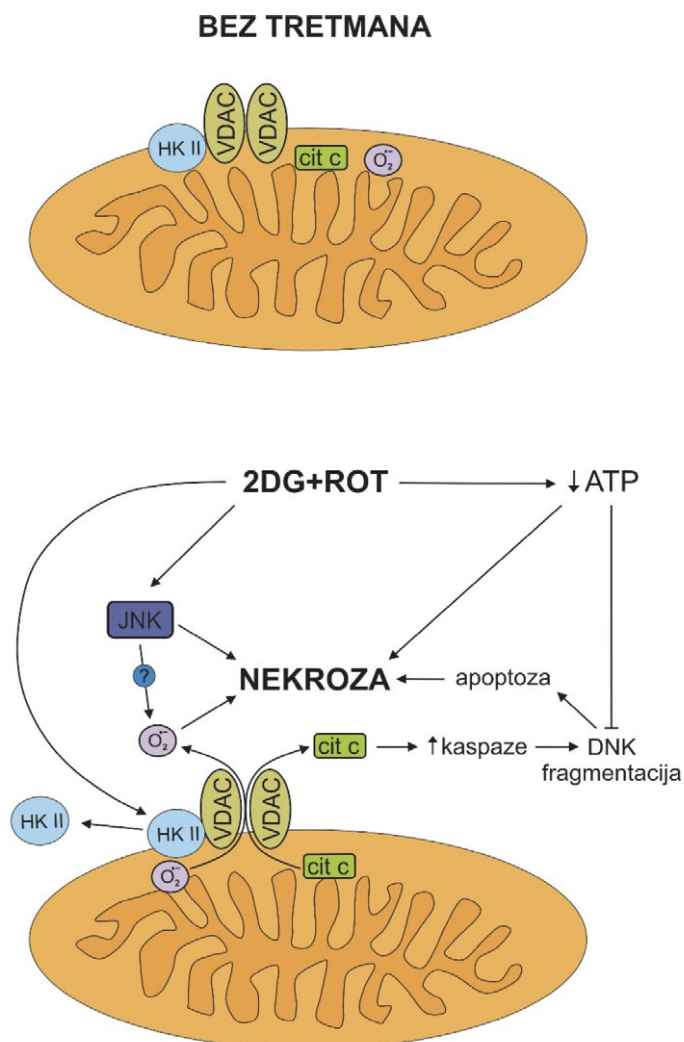
61. Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(11):3049-58.
62. Bell SE, Quinn DM, Kellett GL, Warr JR. 2-Deoxy-D-glucose preferentially kills multidrug-resistant human KB carcinoma cell lines by apoptosis. *British journal of cancer*. 1998;78(11):1464-70.
63. Jin T, Mehrens H, Wang P, Kim SG. Glucose metabolism-weighted imaging with chemical exchange-sensitive MRI of 2-deoxyglucose (2DG) in brain: Sensitivity and biological sources. *NeuroImage*. 2016;143:82-90.
64. Stein M, Lin H, Jeyamohan C, Dvorzhinski D, Gounder M, Bray K, et al. Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *The Prostate*. 2010;70(13):1388-94.
65. Mohanti BK, Rath GK, Anantha N, Kannan V, Das BS, Chandramouli BA, et al. Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1996;35(1):103-11.
66. Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL, et al. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2005;181(8):507-14.
67. Cheng G, Zielonka J, Dranka BP, McAllister D, Mackinnon AC, Jr., Joseph J, et al. Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res*. 2012;72(10):2634-44.
68. Cheong JH, Park ES, Liang J, Dennison JB, Tsavachidou D, Nguyen-Charles C, et al. Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(12):2350-62.
69. Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, et al. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res*. 2004;64(1):31-4.
70. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(10):8516-25.
71. Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, et al. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787(5):384-92.
72. Brinkley BR, Barham SS, Barranco SC, Fuller GM. Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells. *Experimental cell research*. 1974;85(1):41-6.
73. Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi M, Kawanishi S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life sciences*. 2003;73(25):3277-88.
74. Chung WG, Miranda CL, Maier CS. Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain research*. 2007;1176:133-42.
75. Higgins DS, Jr., Greenamyre JT. [3H]dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(12):3807-16.
76. Zhang W, Sha Y, Wei K, Wu C, Ding D, Yang Y, et al. Rotenone ameliorates chronic renal injury caused by acute ischemia/reperfusion. *Oncotarget*. 2018;9(36):24199-208.
77. Stark M, Silva TFD, Levin G, Machuqueiro M, Assaraf YG. The Lysosomotropic Activity of Hydrophobic Weak Base Drugs is Mediated via Their Intercalation into the Lysosomal Membrane. *Cells*. 2020;9(5).
78. Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget*. 2015;6(2):1143-56.
79. Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget*. 2017;8(28):45117-32.
80. Domagala A, Fidyk K, Bobrowicz M, Stachura J, Szczygiel K, Firczuk M. Typical and Atypical Inducers of Lysosomal Cell Death: A Promising Anticancer Strategy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
81. Terman A, Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(8):888-98.
82. Ruddon RW. *Cancer biology*. Fourth edition. ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2007. xiv, 530 pages p.
83. Droga-Mazovec G, Bojic L, Petelin A, Ivanova S, Romih R, Repnik U, et al. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(27):19140-50.

84. Firestone RA, Pisano JM, Bonney RJ. Lysosomotropic agents. 1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents. *Journal of medicinal chemistry*. 1979;22(9):1130-3.
85. Miller DK, Griffiths E, Lenard J, Firestone RA. Cell killing by lysosomotropic detergents. *The Journal of cell biology*. 1983;97(6):1841-51.
86. Wilson PD, Firestone RA, Lenard J. The role of lysosomal enzymes in killing of mammalian cells by the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole. *Journal of Cell Biology*. 1987;104(5):1223-9.
87. Wilson PD, Hreniuk D, Lenard J. Reduced cytotoxicity of the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole after differentiation of HL60 promyelocytes. *Cancer research*. 1989;49(3):507-10.
88. Boyer MJ, Horn I, Firestone RA, Steele-Norwood D, Tannock IF. pH dependent cytotoxicity of N-dodecylimidazole: a compound that acquires detergent properties under acidic conditions. *British journal of cancer*. 1993;67(1):81-7.
89. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):38022-43.
90. Fath MA, Diers AR, Aykin-Burns N, Simons AL, Hua L, Spitz DR. Mitochondrial electron transport chain blockers enhance 2-deoxy-D-glucose induced oxidative stress and cell killing in human colon carcinoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(13):1228-36.
91. Halaby R. Role of lysosomes in cancer therapy. *Research and Reports in Biology*. 2015;2015:6-147.
92. Ono K, Kim SO, Han J. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(2):665-76.
93. Liu H, Hu YP, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ. Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry*. 2001;40(18):5542-7.
94. Dier U, Shin DH, Hemachandra LP, Uusitalo LM, Hempel N. Bioenergetic analysis of ovarian cancer cell lines: profiling of histological subtypes and identification of a mitochondria-defective cell line. *PloS one*. 2014;9(5):e98479.
95. Duan W, Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci Res*. 1999;57(2):195-206.
96. Kosic M, Paunovic V, Ristic B, Mircic A, Bosnjak M, Stevanovic D, et al. 3-Methyladenine prevents energy stress-induced necrotic death of melanoma cells through autophagy-independent mechanisms. *J Pharmacol Sci*. 2021;147(1):156-67.
97. Kosic M, Arsikin-Csordas K, Paunovic V, Firestone RA, Ristic B, Mircic A, et al. Synergistic Anticancer Action of Lysosomal Membrane Permeabilization and Glycolysis Inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(44):22936-48.
98. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):54-61.
99. Richards JM, Gibson IF, Martin W. Effects of hypoxia and metabolic inhibitors on production of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor by pig aortic endothelial cells. *British journal of pharmacology*. 1991;102(1):203-9.
100. Silver IA, Deas J, Erecinska M. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*. 1997;78(2):589-601.
101. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(14):2577-604.
102. Kladna A, Marchlewicz M, Piechowska T, Kruk I, Aboul-Enein HY. Reactivity of pyruvic acid and its derivatives towards reactive oxygen species. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*. 2015;30(7):1153-8.
103. Aft RL, Zhang FW, Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *British journal of cancer*. 2002;87(7):805-12.
104. Wood DM, Alshaf H, Streete P, Dargan PI, Jones AL. Fatality after deliberate ingestion of the pesticide rotenone: a case report. *Critical care (London, England)*. 2005;9(3):R280-4.
105. Jeon SM, Hay N. The double-edged sword of AMPK signaling in cancer and its therapeutic implications. *Archives of pharmaceutical research*. 2015;38(3):346-57.
106. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*. 2012;485(7400):661-5.
107. Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M, Liu X, et al. 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011;67(4):899-910.
108. Ben Sahra I, Tanti JF, Bost F. The combination of metformin and 2 deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy*. 2010;6(5):670-1.

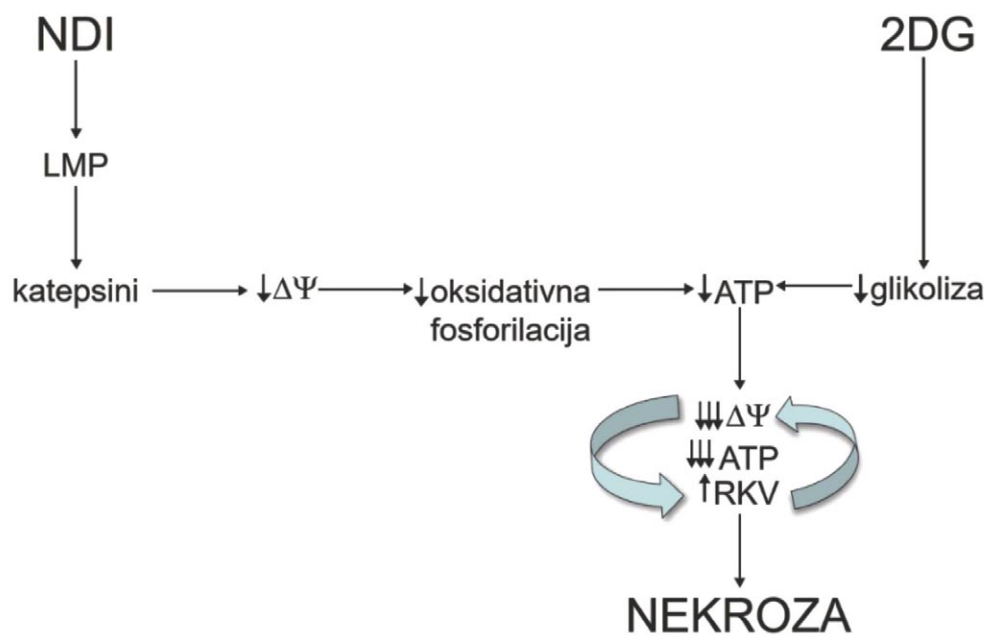
109. Xi H, Barredo JC, Merchan JR, Lampidis TJ. Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKKbeta leading to autophagy. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(10):1463-77.
110. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
111. Trivedi PC, Bartlett JJ, Puliniikunnil T. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells*. 2020;9(5).
112. Peng X, Gong F, Chen Y, Jiang Y, Liu J, Yu M, et al. Autophagy promotes paclitaxel resistance of cervical cancer cells: involvement of Warburg effect activated hypoxia-induced factor 1-alpha-mediated signaling. *Cell death & disease*. 2014;5:e1367.
113. Giordano S, Dodson M, Ravi S, Redmann M, Ouyang X, Darley Usmar VM, et al. Bioenergetic adaptation in response to autophagy regulators during rotenone exposure. *Journal of neurochemistry*. 2014;131(5):625-33.
114. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017;8(14):23996-4008.
115. Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*. 2004;23(16):2757-65.
116. Fontaine E, Bernardi P. Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1999;31(4):335-45.
117. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010;40(2):280-93.
118. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
119. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(11):931-7.
120. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(12).
121. Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res*. 2006;66(6):2885-8.
122. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009;43:67-93.
123. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*. 2013;20(1):21-30.
124. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*. 2009;452:181-97.
125. Dubey AK, Godbole A, Mathew MK. Regulation of VDAC trafficking modulates cell death. *Cell death discovery*. 2016;2:16085.
126. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5467):870-4.
127. Shanware NP, Bray K, Eng CH, Wang F, Follettie M, Myers J, et al. Glutamine deprivation stimulates mTOR-JNK-dependent chemokine secretion. *Nature communications*. 2014;5:4900.
128. Hardie DG, Lin SC. AMP-activated protein kinase - not just an energy sensor. *F1000Research*. 2017;6:1724.
129. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Current topics in developmental biology*. 2007;78:217-45.
130. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of experimental biology*. 2003;206(Pt 12):2049-57.
131. Solaini G, Sgarbi G, Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(6):534-42.



Slika 1. Putevi sinteze energije u tumorskim ćelijama



Slika 2. Pretpostavljeni mehanizam dejstva 2DG+ROT kombinovanog tretmana



Slika 3. Pretpostavljeni mehanizam dejstva 2DG+NDI kombinovanog tretmana

Učestalost genetičkih varijanti asociranih sa celijačnom bolešću i laktoznom intolerancijom i promene u sastavu crevne mikrobiote kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Katarina Bojović¹ i Đurđica Ignjatović²

¹ Ordinacija iz psihijatrije „Dr Selaković“, Beograd, Srbija

² Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt: k.bojovic@hotmail.com

Apstrakt

Neurorazvojni poremećaji (NRP) su poremećaji koji se javljaju rano u detinjstvu i karakteriše ih kašnjenje u više sfera razvoja. Najteža forma ovih poremećaja je autizam. Smatra se da značajnu ulogu u etiologiji NRP imaju genetički i sredinski faktori, kao i njihova interakcija. U poslednje vreme posebna pažnja posvećuje se komorbidnim stanjima, naročito gastrointestinalnim smetnjama. Prema Opioidnoj teoriji, opioidni peptidi poreklom od proteina kazeina i glutena, usled povećane propustljivosti crevnog epitela ulaze u cirkulaciju i prolazeći kroz krvnomoždanu barijeru reaguju sa opioidnim receptorima u centralnom nervnom sistemu, dovodeći do nastanka nekih neuroloških i psihijatrijskih simptoma. Stoga su istraživanja usmerena ka boljem razumevanju potencijalnih mehanizama nastanka povećane propustljivosti crevnog epitela kod dece sa NRP, odnosno da li do nje dolazi zbog genetski predisponirane intolerancije na neku komponentu hrane ili usled crevne disbioze.

Ključne reči: neurorazvojni poremećaji, autizam, egzorfini, laktozna intolerancija, celijačna bolest, crevna disbioza

Frequency of genetic variants associated with celiac disease and lactose intolerance and changes in intestinal microbiota in children with neurodevelopmental disorders

Katarina Bojović¹ i Đurđica Ignjatović²

¹Psychiatry Clinic “Dr Selaković”, Belgrade, Serbia

²Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade

Correspondence: k.bojovic@hotmail.com

Abstract

Neurodevelopmental disorders (NDDs) are disorders that appear early in childhood and are characterized by delays in several spheres of development. The most severe form of these disorders is autism. Genetic and environmental factors, and their interaction, are considered to play a significant role in the etiology of NDD. Recently, special attention was directed towards comorbid conditions, especially gastrointestinal disorders. According to the Opioid theory, opioid peptides originating from casein and gluten proteins, due to the increased permeability of the intestinal epithelium, enter the circulation and, passing through the blood-brain barrier, react with opioid receptors in the central nervous system, leading to the appearance of some neurological and psychiatric symptoms. Therefore, the research is focused on better understanding of potential mechanisms of increased permeability of the intestinal epithelium in children with NDD, i.e. whether it occurs due to genetically predisposed intolerance to some food component or due to intestinal dysbiosis.

Key words: neurodevelopmental disorders, autism, exorphins, lactose intolerance, celiac disease, intestinal dysbiosis

UVOD

Neurorazvojni poremećaji (NRP, *eng. Neurodevelopmental Disorders - NDD*) (DSM-5) [1] ili poremećaji psihološkog razvoja (ICD-10) [2] predstavljaju grupu razvojnih poremećaja čija se klinička slika ispoljava u ranom detinjstvu. Ovi poremećaji mogu zahvatiti jednu ili više sfera razvoja (govorno-jezičku, senzomotornu, socioemocionalnu), a kao najteža i najsloženija forma ovih poremećaja izdvaja se autizam.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da brojni genetički faktori učestvuju u formiranju genetičke predispozicije autizma, koja zajedno sa sredinskim faktorima dovodi do formiranja kliničke slike autizma [3]. Sve više se govori o komorbidnim stanjima kao potencijalnim faktorima rizika za nastanak ovih poremećaja. U njih spadaju neuropsihijatrijski poremećaji kao što su anksioznost i bipolarni poremećaji [4, 5] neki retki genetički sindromi [6], epilepsija [7], a uočena je i visoka učestalost ekcema, alergija, respiratornih infekcija, upala srednjeg uha i gastrointestinalnih (GI) problema [8-11]. Posebna pažnja u poslednje vreme se posvećuje GI smetnjama, kako zbog njihove visoke učeslosti u grupi pacijenata sa NRP [12, 13] tako i zbog zajedničkog početka ispoljavanja simptoma GI i neurorazvojnih poremećaja [14].

Jedna od teorija koja donekle objašnjava vezu između GI trakta i centralnog nervnog sistema (CNS) je "Opioidna teorija". Ovom teorijom predložen je jedan od potencijalnih molekularnih mehanizama nastanka neurorazvojnih poremećaja, pre svega autizma. Prema ovoj teoriji egzogeni opioidni molekuli, kazo-egzorfini (u literaturi češći pod nazivom kazomorfini, *eng. Casomorphin - CM*) i gluten egzorfini (*eng. Gluten Exorphin - GE*), nastali nekompletnim varenjem proteina poreklom iz mleka (kazeina) i žitarica (glutena), dospevaju putem cirkulacije do CNS-a i tamo, reagujući sa opioidnim receptorima, izazivaju simptome kao što su stereotipije, hiperaktivnost i kašnjenje u govorno-jezičkom razvoju [15]. Na osnovu ove teorije došlo je do razvoja novog terapijskog pristupa u rehabilitaciji dece sa autizmom koji se bazira na primeni dijeta bez glutena i kazeina (*eng. Gluten-Free-Casein-Free - GFCE*). Kao uzroci povišenog nivoa peptida u cirkulaciji navode se smanjena aktivnost peptidaza, bilo usled njihove inhibicije, genetičkog deficita ili nedostatka kofaktora [16], kao i povećana propustljivost creva, tzv. sindrom propustljivih creva (*eng. leaky gut syndrome*), koja je opisana kod trećine dece sa autizmom [17]. Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno da li do povećane propustljivosti crevnog epitela dolazi zbog genetski predisponirane intolerancije na neku komponentu hrane ili usled crevne disbioze.

Kako je povišen nivo opioidnih peptida pronađen i u urinu pacijenata sa celijačnom bolešću pretpostavljeno je da inflamacija creva kakva se sreće kod ovih pacijenata može dovesti do smanjenja aktivnosti litičkih enzima i povećane propustljivosti crevnog epitela [18]. Visoka učestalost GI smetnji kod dece sa autizmom podstakla je istraživače na ispitivanje potencijalne veze između celijačne bolesti (CB) ili glutenske senzitivnosti i autizma. Povezanost CB i/ili osetljivosti na gluten sa neurološkim i psihijatrijskim simptomima uočena je još pre 40 godina [19]. CB je imunološki posredovano oboljenje koje je prisutno kod 1% opšte populacije i koje se manifestuje GI smetnjama kao što su dijareja, povraćanje, umor, gubitak težine [20]. Kod nekih pacijenata sa dijagnostikovanom CB nisu prisutni simptomi CB i tada se govori o asimptomatskoj CB. Smatra se da klasične simptome CB kod ovih pacijenata maskira antinociceptivni efekat opioidnih peptida poreklom iz glutena, gluten egzorfina [21]. CB može biti pogrešno dijagnostikovana kao laktozna intolerancija (LI) zbog sličnih GI simptoma [22]. LI nastaje kao posledica smanjene aktivnosti enzima laktaze u sluznici tankog creva i karakteriše se GI simptomima kao što su dijareja, bol u stomaku, nadutost i mučnina [23]. Na osnovu biopsije creva dece sa autizmom, zaključeno je da je smanjena enzimska aktivnost laktaze, laktazna deficijencija, česta kod pacijenata sa autizmom i da može doprineti razvoju GI smetnji i nekih oblika izmenjenog ponašanja [24].

Jedan od mogućih uzroka GI simptoma, kao i povećane propustljivosti crevnog epitela koja je primećena kod pacijenata sa autizmom [25, 26], mogla bi da bude i inflamacija creva nastala usled poremećaja sastava crevne mikrobiote - disbioze [27]. Poslednjih godina veliki broj studija pokazao je da kod dece sa autizmom postoji disbalans u sastavu crevne mikrobiote koji se manifestuje prekomernim rastom uslovno patogenih bakterija, manjom zastupljenosti bakterija koje čine normalnu crevnu mikrobiotu i redukcijom diverziteta crevne mikrobiote [28-31]. Promene u sastavu crevne mikrobiote dovode do promena na nivou bakterijskih metabolita preko kojih se ostvaruje komunikacija između crevne mikrobiote i CNS-a. Masne kiseline kratkih lanaca (*eng. Short Chain Fatty Acids* - SCFA) su bioaktivni molekuli koji nastaju bakterijskom fermentacijom ugljenih hidrata, od kojih su sirćetna, propionska i buterna kiselina najzastupljenije (95%) [32]. SCFA utiču na brojne funkcije kako na nivou creva, tako i na nivou CNS-a. Epigenetičkim modifikacijama utiču na promenu ekspresije gena nervnih adhezionih molekula, neurotransmiterskih i drugih sistema čije su promene opisivane kod autizma [33, 34].

Imajući u vidu navedene podatke, istraživanja su usmerena na ispitivanje genetičkih varijanti povezanih sa intolerancijom na gluten, laktoznom intolerancijom, kao i na ispitivanje prisustva crevne disbioze i opioidnih peptida u urinu dece sa razvojnim poremećajima.

Prisustvo povišenih nivoa opioidnih peptida u uzorcima urina dece sa neurorazvojnim poremećajima

Opioidnu teoriju nastanka autizma prvi put je opisao Panksepp 1979. godine koji je pretpostavio da osobe sa autizmom imaju povišen nivo endogenih opioidnih peptida na nivou CNS-a [35]. Sprovodeći eksperimente na životinjama, on je u svojoj neurohemijskoj teoriji nastanka autizma izneo pretpostavku o postojanju veze između povišenog nivoa endogenih opioida i nekih simptoma autizma kao što su izmenjen osećaj za bol, smanjena potreba za socijalizacijom i insistiranjem na istovetnosti [35]. Nešto kasnije K. Reichelt je, na osnovu nalaza povišenih peptida u urinu dece sa autizmom, ali i odraslih sa šizofrenijom i depresijom, pretpostavio da ovi egzogeni peptidi poreklom iz hrane, dovode do nastanka nekih neuropsihijatrijskih simptoma kod ovih pacijenata [36-38].

Za razliku od endogenih, „tipičnih“ opioidnih peptida (enkefalin, endorfin i dinorfin) koji se proizvode u samom telu, egzogeni, „atipični“ opioidni peptidi nastaju nepotpunim varenjem peptida iz hrane i poznati su kao egzorfini [39]. S obzirom da ovi molekuli pokazuju farmakološke odlike slične opijumu (morfinu) [40], u literaturi se mogu naći i pod imenom gluteomorfini (*eng. Gluteomorphins* - GM) i β -kazomorfini (*eng. β -Casomorphins* - BCM) [41].

Goveđi β -kazomorfini nastaju nepotpunim varenjem A1 β -kazeina koji je dominantna genetička varijanta β -kazeina kod goveda evropskog porekla. Ova varijanta nastala je tačkastom mutacijom Pro67 \rightarrow His67 originalne A2 varijante β -kazeina, koja dominira kod čistokrvnih azijskih i afričkih goveda [42]. Humani β -kazomorfini imaju sličnu aminokiselinsku sekvencu sa goveđim [43], ali pokazuju značajno nižu opioidnu aktivnost [44]. Pošto se opioidni receptori nalaze u nervnom, endokrinom, imunskom i gastrointestinalnom sistemu [45], pretpostavljeno je da bi prirodna uloga humanih β -kazomorfini u ranim fazama razvoja kod odojčadi mogla biti u emotivnom vezivanju za majku, regulaciji GI funkcije i stimulaciji sna. Međutim, kod odojčadi koja su bila hranjena adaptiranom formulom pokazano je da je povišen nivo goveđeg BCM-7 u plazmi bio pozitivno korelisan sa stepenom kašnjenja u psihomotornom razvoju, što je vodilo ka zaključku da povišeni nivoi goveđeg BCM-7 u cirkulaciji odojčadi mogu predstavljati faktor rizika za pojavu neurorazvojnih poremećaja poput autizma [46]. Ovakav negativan efekat goveđih, ali ne i humanih BCM, verovatno potiče od toga što goveđi BCM imaju 3-30 puta jaču opioidnu aktivnost u odnosu na humane [44].

Enzimskom digestijom glijadina (komponenta glutena) dobija se nekoliko opioidnih peptida, gluten (gliadin) egzorfina. Izolovano je i identifikovano nekoliko gluten egzorfina: A5, A4, B5, B4 [47] i C [48]. Prisustvo GE B4 i B5 u krvi primećeno je kod pacijenata sa celijačnom bolešću kod kojih je narušena intestinalna barijera [49], ali je merljiva količina GE B5 detektovana i kod zdravih osoba nakon prekomerne konzumacije glutena [15].

Povišen nivo egzorfina pronađen je u urinu obolelih od šizofrenije [36], depresije [37] i autizma [38, 50, 51]. Kako aktivacija opioidnih receptora na nivou CNS-a izaziva brojne efekte među kojima su analgezija, sedacija, kontrola raspoloženja i apetita itd, pretpostavljeno je da povišen nivo opioidnih peptida u cirkulaciji može uticati na pojavu nekih od simptoma u ovim neuropsihijatrijskim poremećajima poput socijalne ravnodušnosti, loše prilagodljivosti, stereotipnog i repetitivnog ponašanja, pojavu epilepsije, sniženog praga za bol, poremećaja sna i problema u govoru [52]. Ova hipoteza je potkrepljena eksperimentima na životinjama koji su potvrdili da egzorfini poreklom iz hrane mogu da prođu krvno-moždanu barijeru, kao i da svoj efekat ostvaruju posredstvom njihove interakcije sa opioidnim receptorima u CNS-u, usled čega dolazi do promena u ponašanju i pojave nekih neuropsihijatrijskih simptoma [53, 54]. Na osnovu navedenih zapažanja sugerisano je da bi restriktivne dijetе, koje bi podrazumevale isključivanje ovih proteina iz ishrane, mogle imati pozitivne efekte na simptome obolelih. Nekoliko studija je ukazalo da ishrana bez glutena i mlečnih proizvoda (*eng. GFCF diet*) dovodi do poboljšanja simptoma kod dece sa autizmom [55, 56] i obolelih od šizofrenije [57] što se može smatrati i kliničkom potvrdom opioidne teorije. Ovde treba istaći da prisustvo opioidnih peptida kao ni efikasnost GFCF dijetе [58] nije evidentirana u svim studijama. Velika fenotipska raznolikost u autističnom spektru poremećaja kao i veliki broj faktora koji potencijalno utiču na nastanak razvojnih poremećaja navelo je na konceptualnu promenu i izdvajanje posebnog fenotipa autizma koji je reaktivan na promene u ishrani [59] u odnosu na autizam kod koga su genetički faktori dominantni i kod koga efekat GFCF dijetе nije uočljiv.

Do sada su ispitivanja bila prevashodno fokusirana na pacijente sa autizmom, međutim iskustva iz kliničke prakse ukazala su da primena GFCF dijetе pokazuje pozitivne efekte i u tretmanu dece iz širokog spektra neurorazvojnih poremećaja. Stoga je ispitivano da li u grupi NRP pacijenata postoji povišen nivo egzorfina u cirkulaciji, što je posredno mereno nivoom ovih molekula u urinu.

Kod većine pacijenata je uočeno povećanje nivoa jednog ili više analiziranih opioidnih peptida iako nije primećeno značajno povećanje nivoa ukupnih peptida u uzorcima urina pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima [60]. Kako se prema opioidnoj teoriji pojava velikog broja simptoma autističnog poremećaja objašnjava interakcijom egzorfina sa opioidnim receptorima u CNS-u, na osnovu rezultata može se zaključiti da slični mehanizmi verovatno postoje i kod dece iz šireg spektra neurorazvojnih poremećaja. Ovaj rezultat objašnjava i zapažanja iz kliničke prakse o poboljšanju kliničke slike i ubrzanju rehabilitaciji ovih pacijenata nakon uvođenja GFCF dijetе.

Do povišenog nivoa peptida u cirkulaciji može doći usled deficijencije nekog enzima (peptidaza) ili usled povećane propustljivosti crevnog epitela. Jedan od enzima koji se u literaturi u poslednje vreme najčešće dovodi u vezu sa povišenim nivoom opioidnih peptida i nastankom autizma jeste dipeptidil peptidaza-4 (DPPIV) [61, 62] koji igra ključnu ulogu u digestiji malih peptida. Niža ekspresija ovog enzima ili njegova niža aktivnost zajedno sa sindromom propustljivih creva može da rezultuje akumulacijom aktivnih opioidnih peptida u cirkulaciji.

Drugi preduslov za povećanu apsorpciju peptida je povećana crevna propustljivost, do koje može doći usled sistemske inflamacije crevnog epitela [63]. Mnoge studije su pokazale da deca iz autističnog spektra

imaju oštećenje sluznice creva [64, 65] što predstavlja osnovu sindroma propustljivih creva [66]. Inflamaciju crevnog epitela može izazvati netolerisanje neke komponente hrane ili promena u sastavu mikrobiote (disbioza).

HLA-DQ varijante povezane sa celijačnom bolešću kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Celijačna bolest je genetički determinisana autoimunska bolest koju karakteriše netolerisanje glutena i hronična inflamacija creva, koja može biti uzrok povećane propustljivosti crevnog epitela i povišenog nivoa GE u cirkulaciji [49]. Hronična inflamacija creva kakva se sreće kod pacijenata sa CB dovodi do smanjene aktivnosti digestivnih enzima i povećane apsorpcije proteina i peptida [18]. Slučaj deteta sa CB koje je pogrešno dijagnostikovano kao dete sa autizmom, kod koga su se svi neurološki simptomi povukli nakon primene dijeta bez glutena, predstavlja potvrdu da inflamacija na nivou creva izazvana CB može drastično uticati na disfunkciju CNS-a [20]. Osim klasičnog ispoljavanja CB koje podrazumeva prisustvo GI smetnji kao što su dijareja i povraćanje, kod velikog broja pacijenata sa potvrđenom CB nema klasičnih GI simptoma glutenske intolerancije, te je postulirana "tiha opioidna hipoteza" u kojoj je predložen mehanizam kojim gluten egzorfini, ispoljavajući svoj analgetski efekat na nivou creva, mogu maskirati GI simptome CB [21].

Uzimajući sve navedeno u obzir, u grupi pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima je ispitivano prisustvo genetičkih varijanti Humanog leukocitnog antigena (eng. *human leukocyte antigen-HLA*) *HLADQ2* i *HLA-DQ8*, za koje se zna da su povezane sa CB [60]. Nisu utvrđene razlike u distribuciji analiziranih genetičkih varijanti između grupe pacijenata i kontrolne grupe kao ni veza između povišenih nivoa opioidnih peptida i analiziranih *HLA-DQ* varijanti. Iz toga je zaključeno da CB nije uzročnik povećane crevne propustljivosti i povišenih nivoa egzorfina u urinu dece sa neurorazvojnim poremećajima [60].

Varijante asocirane sa laktoznom intolerancijom kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Nepotpunom razgradnjom proteinske komponente mlečnih proizvoda (kazeina), nastaju kazomorfini, za koje se smatra da mogu da izazovu neke od simptoma autizma. Gastrointestinalne tegobe, inflamacija creva i povećana crevna propustljivost koji su česti kod ovih pacijenata, mogli bi biti posledica netolerisanja mleka i mlečnih proizvoda. Jedan od potencijalnih uzročnika intolerancije mleka jeste intolerancija na mlečni šećer - laktozu. Iz tih razloga ispitivana je učestalost genetičke varijante -13910 C> T uzvodno od gena za laktazu (*LCT*) povezane sa primarnom laktoznom intolerancijom. Nisu utvrđene razlike u distribuciji analiziranih genetičkih varijanti među ispitivanim grupama, kao ni postojanje njihove korelacije sa nivoom opioidnih peptida [60]. Prema prikazanim rezultatima zaključeno je da primarna LI nije povezana sa GI tegobama kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima, te da ukoliko je laktozna deficijencija prisutna kod tih pacijenata, ona nastaje usled oštećenja sluznice tankog creva, što predstavlja sekundarnu intoleranciju na laktozu [67].

Novija istraživanja ukazuju na to da je laktozna intolerancija mnogo ređe uzročnik netolerisanja mleka nego što se to ranije smatralo, i da je A1 β -kazein češći uzročnik ove intolerancije [68]. Pokazano je da unos A1, ali ne i A2, β -kazeina ima proinflamatorne efekte u crevima pacova i miševa [69, 70] kao i da je ovaj efekat izazivaju BCM-7 i -5 [71].

Imajući ovo u vidu, može se pretpostaviti da inflamacija izazvana konzumacijom mleka sa A1 polimorfizmom β -kazeina može da izazove GI poremećaje kao i sekundarnu intoleranciju na laktozu, koja je verovatno posredovana kazomorfinima, kod genetički predisponiranih individua koji su nosioci polimorfizama peptidaza sa nižom enzimskom aktivnošću.

Specifičnosti sastava crevne mikrobiote dece sa neurorazvojnim poremećajima

Poslednjih decenija intenzivno su proučavane razlike u sastavu crevne mikrobiote između dece sa autizmom i zdrave dece [72], ali ovakve studije nisu sprovedenje kod pacijenata sa drugim formama NRP. U nedavnom istraživanju je po prvi put ispitana specifičnost sastava crevne mikrobiote kod šireg spektra NRP pacijenata [73].

Povećana učestalost bakterijskih vrsta srodnih sa rodom Clostridium kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Među uslovnim patogenima koji su bili značajnije zastupljeni u grupi pacijenata uočene su tri vrste koje su srodne sa bakterijama iz roda *Clostridium*: *Desulfotomaculum guttoideum*, *Intestinibacter bartlettii* i *Romboutsia ilealis* [74]. *D. guttoideum*, čija 16S rDNK sekvenca (gen za 16S rRNK, najčešće korišćeni genetički marker u filogenetskoj analizi bakterija) pokazuje visok stepen homologije sa odgovarajućim nukleotidnim sekvencama vrsta iz roda *Clostridium* [74, 75], je sulfat-redukujuća bakterija, kao i *Desulfovibrio*, čija je veća zastupljenost kod dece sa autizmom pokazana u ranijim studijama [29, 76]. Pretpostavljeno je da organizmi koji redukuju sulfat mogu značajno doprineti nastanku poremećaja metabolizma sulfata koji postoji kod pacijenata sa autizmom, i koga karakterišu nizak nivo sulfata u krvi, pojačana urinarna ekskrecija, smanjeni kapacitet metilacije i hronični oksidativni stress [29]. S obzirom na veću zastupljenost vrsta iz rodova *Desulfovibrio* i *Clostridium* u mikrobioti dece sa autizmom u prethodnim studijama, pretpostavljeno je da ove bakterije doprinose pojavi nekih simptoma autizma [76]. Pretpostavljeno je da jedna forma autizma, tzv. regresivni autizam, kod koga se dete u početku razvija normalno, a zatim počinje da gubi socijalne veštine i govor u uzrastu od oko 18 meseci, može nastati kao posledica crevne dizbioze uzrokovane antibiotskom terapijom. Elen Bolte je 1998. godine postavila hipotezu prema kojoj bi *Clostridium tetani* (ili neka druga bakterija u crevima) mogla imati udela u nastanku regresivnog autizma [77]. Prema ovoj hipotezi, prekomeran rast mikroorganizama otpornih na antibiotsku terapiju, kao što je *Clostridium tetani* (ili *Clostridium difficile*) [78] dovodi do povećanog stvaranja neurotoksina *p*-krezol (fenolno jedinjenje sa bakteriostatskim dejstvom) ili nekih drugih toksičnih fenolnih i indolnih metabolita, koji mogu da uzrokuju pojavu anksioznog ponašanja [29, 77]. U skladu sa tim, rezultati nekih studija su pokazali da nakon terapije vankomicinom, antibiotikom koji se koristi kod infekcija izazvanih bakterijom *C. difficile*, dolazi do poboljšanja kognitivnog i socijalnog funkcionisanja osoba sa autizmom [79]. Snažan proizvođač indolnog jedinjenja, trans-3-indolil akrilne kiseline (*eng. Indolylacrylic Acid*, IAA), koja glicinskom konjugacijom može biti transformisana u indolil-3-akrililglicin (*eng. Indolyl-3-Acryloylglycine*, IAG) [80] je bakterijska vrsta *I. bartlettii* [81]. Ova bakterija, koja je pre reklasifikacije bila poznata kao *Clostridium bartlettii*, prvobitno je izolovana iz fecesa pacijenata sa autizmom [82]. Povišeni nivoi IAG pronađeni su u urinu pacijenata sa autizmom te se IAG smatra potencijalnim dijagnostičkim markerom za poremećaje iz autističnog spektra [83]. *Erysipelatoclostridium ramosum* (prethodno poznat kao *Clostridium ramosum*) koji je bio zastupljeniji kod pacijenta sa razvojnom disfazijom (poremećaj u razvoju govora), mešovitim razvojnim poremećajem i dečijim autizmom u poređenju sa zdravim kontrolama [73], takođe je izolovan i u uzorcima fecesa dece sa autizmom u okviru istraživanja drugih autora [30].

Smanjen diverzitet mlečnokiselinskih bakterija, bakterija roda Bifidobacterium, kao i bakterija koje proizvode buternu kiselinu kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Iako unutar grupa i pacijenata i kontrola postoji velika raznovrsnost, značajno smanjenje diverziteta mlečnokiselinskih bakterija uočeno je u grupi pacijenata sa NRP [73]. Identifikovani bakterijski sojevi koji su

bili u većoj meri zastupljeni u kontrolnim uzorcima u odnosu na pacijente, predstavljaju sastavni deo mikrobiote zdravih osoba uključujući i bakterije koje proizvode buternu kiselinu. Vrste *Enterococcus Faecalis*, *Enterococcus gallinarum* i *Streptococcus pasteurianus* koje su deo normalne crevne mikrobiote [84-86], otkrivene su u niskom broju ili su čak bile potpuno odsutne u nekim grupama pacijenata sa NRP. Među bakterijama iz roda *Lactobacillus*, pronađeno je da je *Lactobacillus rhamnosus*, manje zastupljen u grupi NRP pacijenata. Pokazano je da unos *L. rhamnosus* JB-1 ima uticaj na regulaciju emocionalnih ponašanja povezanih sa anksioznošću i depresijom kod zdravih miševa, putem regulacije ekspresije centralnog receptora gama-aminobuterne kiseline (eng. γ -aminobutyric acid - GABA) [87].

Takođe uočeno je i značajno smanjenje *bifidobacteria*, uključujući kompletno odsustvo *bifidobacteria* kod 12% ispitanika iz grupe NRP pacijenata, dok sa druge strane takav upadljiv nedostatak nije detektovan ni u jednom od kontrolnih uzoraka [73].

Bifidobacteria predstavljaju dominantni bakterijski rod dečije crevne mikrobiote [88, 89], prve kolonizuju creva odmah po rođenju [90] i značajan su deo crevne mikrobiote odraslog čoveka [91, 92]. Imaju niz pozitivnih uloga u očuvanju zdravlja čoveka kao što su digestija polisaharida koji su nesvarljivi za domaćina [93, 94], proizvodnja vitamina B grupe [95], inhibicija patogenih bakterija kroz kompetitivno isključivanje i/ili proizvodnju antimikrobnih agenasa [96] i imunska regulacija supresijom upalnih odgovora [97, 98]. Zabeleženo je da deca sa autizmom često imaju probleme sa varenjem [99], nedostatak vitamina B12 [100], imunsku disregulaciju/upalu creva [101] i svi ovi problemi bi mogli biti povezani sa smanjenim prisustvom *bifidobacteria* u crevima.

Pretpostavlja se i da određeni sojevi iz roda *Bifidobacterium* mogu biti od značaja u lečenju nekih psihijatrijskih oboljenja kao što su depresija i anksioznost. Pokazano je da tretman *B. infantis* može biti koristan u lečenju depresije tako što dovodi do povećanja prekursora serotonina - triptofana [102], kao i da može da poboljša odgovor na stres posredovan hipotalamus-hipofiznom osom (eng. *Hypothalamic-Pituitary Axis*, HPA) [103]. Sa druge strane pokazano je da tretman *B. longum* dovodi do anksiolitičkog efekta [104]. Primena antibiotske terapije u prvim godinama života mogla bi biti odgovorna za snižen diverzitet *bifidobacteria*. Značajno veća oralna upotreba antibiotika kod dece sa autizmom u odnosu na zdravu decu [9, 105] verovatno dovodi do smanjenje raznovrsnosti bakterijskih vrsta iz roda *Bifidobacterium*, kakva je registrovana kod novorođenčadi koja su tretirana antibioticima [106].

Prema rezultatima jedne studije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* je visoko zastupljen kod svih NRP grupa pacijenata, osim kod pacijenata iz grupe dečijeg autizma, dok s druge strane nije detektovan ni u jednom uzorku fecesa ispitanika iz kontrolne grupe [73]. S obzirom da se različiti sojevi ove bakterijske vrste koriste kao probiotici [107], veća zastupljenost *B. animalis* može biti posledica učestalije upotrebe probiotika u grupi pacijenata sa NRP, koji često imaju GI tegobe.

Tri bakterijske vrste koje proizvode buternu kiselinu: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Butyricoccus pulliaecorum* i *Eubacterium rectale* bile su takođe manje zastupljene u grupi pacijenata [73]. *F. prausnitzii* je jedna od najzastupljenijih bakterija u crevnoj mikrobioti čoveka [108]. *F. prausnitzii* i *B. pulliaecorum* su glavni proizvođači buterne kiseline koja je neophodna za normalno funkcionisanje crevnog epitela i njihov nedostatak doveden je u vezu sa nastankom sindroma iritabilnog creva [109]. Pokazano je da *B. pulliaecorum* jača epitelnu barijeru creva [110], za koju je pokazano da je narušena kod neke dece sa autizmom [17, 25, 66]. Neamiloički član familije *Ruminococcaceae*, vrsta *Ruminococcus champanellensis*, blisko srodna vrsti *F. prausnitzii* [111], manje je zastupljena u grupi pacijenata, pre svega u uzorcima pacijenata sa dečijim autizmom i razvojnom disfazijom [73]. *R. champanellensis* je jedina bakterijska vrsta u

debelom crevu čoveka koja može da razgradi kristalnu celulozu i izvrši fermentaciju nesvarljivih ugljenih hidrata. Na taj način ona obezbeđuje značajan deo energije i podržava rast mikroorganizama u crevima, te stoga ima veliki uticaj na zdravlje putem modulacije sastava mikrobiote [112, 113]. Istraživanje sprovedeno na uzorcima fecesa dece sa autizmom pokazalo je da su *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* i *Eubacteriaceae* u najmanjoj meri zastupljeni u fekalnoj mikrobioti dece sa autizmom [28], što je u skladu sa našim rezultatima.

Usled toga što je pokazano da SCFA mogu uticati na brojne funkcije kako na nivou creva, tako i na nivou CNS-a, pretpostavljeno je da SCFA mogu biti važni molekularni medijatori u komunikaciji između mikrobiote i CNS-a, kao i da mogu imati udela u nastanku nekih simptoma autizma [114]. Uočeno je da su vrednosti ukupnog nivoa SCFA, kao i nivoa buterne kiseline bile najniže u grupi pacijenata sa dečijim autizmom [73]. Prema podacima iz literature pozitivna korelacija nađena je između ukupnog nivoa SCFA i zastupljenosti vrsta *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* i *Bifidobacterium* [28], što je u skladu sa zapažanjima da su *F. prausnitzii* i *R. champanellensis*, kao i nekoliko bakterijskih vrsta roda *Bifidobacterium*, manje zastupljeni u grupi pacijenata. Iako bakterije koje pripadaju vrsti *Ruminococcus* ili rodu *Bifidobacterium* ne proizvode butirat, one mogu da stimulišu produkciju SCFA zahvaljujući njihovoj sposobnosti da razgrade nesvarljive ugljene hidrate, i na taj način obezbede supstrat za bakterije koje proizvode buternu kiselinu [115]. Pozitivna korelacija između broja rDNK amplikona dobijenih univerzalnim prajmerima i ukupnog nivoa SCFA u kontrolnoj grupi, koja je izgubljena u grupi pacijenata, vodi ka pretpostavci da je mikrobiota pacijenata sa NRP slabiji proizvođač SCFA [73].

Uočena je visoka sličnost bakterijskih profila između grupe pacijenata sa dečijim autizmom i nespecifičnim pervazivnim razvojnim poremećajem, (poznatog i kao "atipični autizam") [116], koje su prema kliničkoj slici najbližije [2]. Postojanje sličnosti u sastavu crevne mikrobiote kod pacijenata koji imaju slične neurološke i bihevioralne simptome vodi ka pretpostavci da crevna mikrobiota ima značajnu ulogu u patogenezi NRP [73].

Do sada je otkriveno nekoliko molekularnih mehanizama koji bi mogli da objasne uticaj mikrobiote na CNS i koji bi mogli da budu uključeni u mehanizam nastanka autizma, ali i drugih NRP. Mikrobiota ostvaruje komunikaciju sa CNS-om putem nervnog sistema (preko enteričkih nerava i vagus nerva) ili putem sistemske (humoralne) cirkulacije u koju dospevaju bakterijski metaboliti i toksini.

Predloženo je da kolonizacija creva mikrobiotom utiče na razvoj mozga sisara kao i na ponašanje u odraslom dobu, tako što menja ekspresiju nekih gena za koje se zna da su uključeni u transmisiju signala u nervnom sistemu i sinaptičku dugotrajnu potencijaciju (jačanje veza između dva neurona, mehanizam koji leži u osnovi učenja i pamćenja) u regionima mozga odgovornim za motoričku kontrolu i anksiozno ponašanje [117]. Pokazano je da produkti mikrobiote kao što su propionska i buterna kiselina, imaju jak epigenetički potencijal i da mogu izazvati promene u ekspresiji velikog broja gena, koji su već dovođeni u vezu sa autizmom [34].

Nedavno je prihvaćeno da mikrobiota ima značajnu ulogu u neurorazvoju, te da poremećaji u početnoj kolonizaciji mikrobiote u ranom uzrastu mogu dovesti do mentalnih poremećaja kasnije u životu [117, 118]. Pretpostavlja se da promene u sastavu crevne mikrobiote mogu imati uticaj na razvoj mozga u prvim godinama života i na taj način doprineti nastanku simptoma autizma [119]. Razvoj mikrobiote odvija se paralelno sa neurorazvojem, gde su prenatalni i rani postnatalni periodi prepoznati kao najvažniji za razvoj mozga i sazrevanje mikrobiote [120]. Ono što je značajno je da korekcija sastava mikrobiote u preadultnom periodu kod eksperimentalnih životinja može dovesti do normalizacije ponašanja [102, 103, 117, 121] dok korekcija sastava mikrobiote nakon ovog kritičnog perioda ne može dovesti do normalizacije ponašanja kao ni neurohemijskih poremećaja koji su nastali u ranim razvojnim periodima [122].

Rezultati istraživanja u ovoj oblasti otvaraju mogućnost za dalja ispitivanja promena u sastavu crevne mikrobiote kod pacijenata sa NRP, kao i razjašnjenje mogućih patogenih načina delovanja specifičnih bakterija.

Prema dostupnim rezultatima i podacima iz literature možemo zaključiti da analiza mikrobiote u ranom razvojnom periodu može biti korisna za prevenciju i lečenje kako GI poremećaja, tako i pratećih poremećaja u ponašanju koji su često deo kliničke slike autističnog spektra poremećaja, ali i drugih formi NRP. Važno je istaći da potencijalna korekcija sastava mikrobiote primenom ciljanih probiotika može biti korišćena kao dodatna terapija u lečenju neurorazvojnih poremećaja.

ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja pokazali su da ispitivanje prisustva opioidnih peptida u urinu, kao i analiza sastava crevne mikrobiote može imati terapijski potencijal u rehabilitaciji dece sa neurorazvojnim poremećajima. Može se pretpostaviti da primena individualizovanih nutritivnih tretmana i korekcija sastava crevne mikrobiote može značajno doprineti, ne samo poboljšanju GI smetnji dece sa dijagnozom neurorazvojnih poremećaja, već i saniranju nekih neuroloških i psihijatrijskih simptoma tipičnih za autizam. Pored toga navedeni parametri mogu biti i značajni dijagnostički i prognostički markeri koji bi omogućili detekciju posebnih kliničkih entiteta razvojnih poremećaja kod kojih bi pomenuti tretmani mogli da dovedu do povlačenja simptoma i brže rehabilitacije. Dobijeni rezultati bi mogli imati značajan uticaj na unapređenje dijagnostike, prevencije i tretmana razvojnih poremećaja kod dece.

ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije - broj ugovora III 41004, III 41030, OI173019, kao i ugovora o realizaciji i finansiranju istraživačkog rada u 2020. godini, matični brojevi: 451-03-68/2020-14/200042 i 451-03-68/2020-14/200007.

Autori se zahvaljuju Ordinaciji iz psihijatrije "Dr Selaković", pre svega dr Milijani Selaković, čiji je klinički rad postavio temelje za nastanak ovog istraživanja, na podršci i pomoći pri prikupljanju uzoraka, kao i svim kolegama sa IMGGI-a, IBISS-a i Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su učestvovali u izradi doktorske disertacije iz koje je proizašao ovaj revijski rad.

Literatura:

1. Swedo SE, Baird G, Cook EH, Happe FG, Harris JC, Kaufmann WE, et al. "Neurodevelopmental disorders," In: Schultz SK, Kuhl EA, editors. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC: American Psychiatric Association 2013. p. 31-87.
2. WHO. "Mental and behavioural disorders" International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD10), 10th revision. Geneva: World Health Organization 2015.
3. Fett-Conte AC, Bossolani-Martins AL, Pereira-Nascimento P. Genetic Etiology of Autism. In: Fitzgerald M, editor. Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I. IntechOpen 2013.
4. Lichtenstein P, Carlstrom E, Rastam M, Gillberg C, Anckarsater H. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. The American journal of psychiatry. 2010;167(11):1357-63.
5. Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. 2008;47(8):921-9.
6. Robert C, Pasquier L, Cohen D, Fradin M, Canitano R, Damaj L, et al. Role of Genetics in the Etiology of Autistic Spectrum Disorder: Towards a Hierarchical Diagnostic Strategy. International journal of molecular sciences. 2017;18(3).

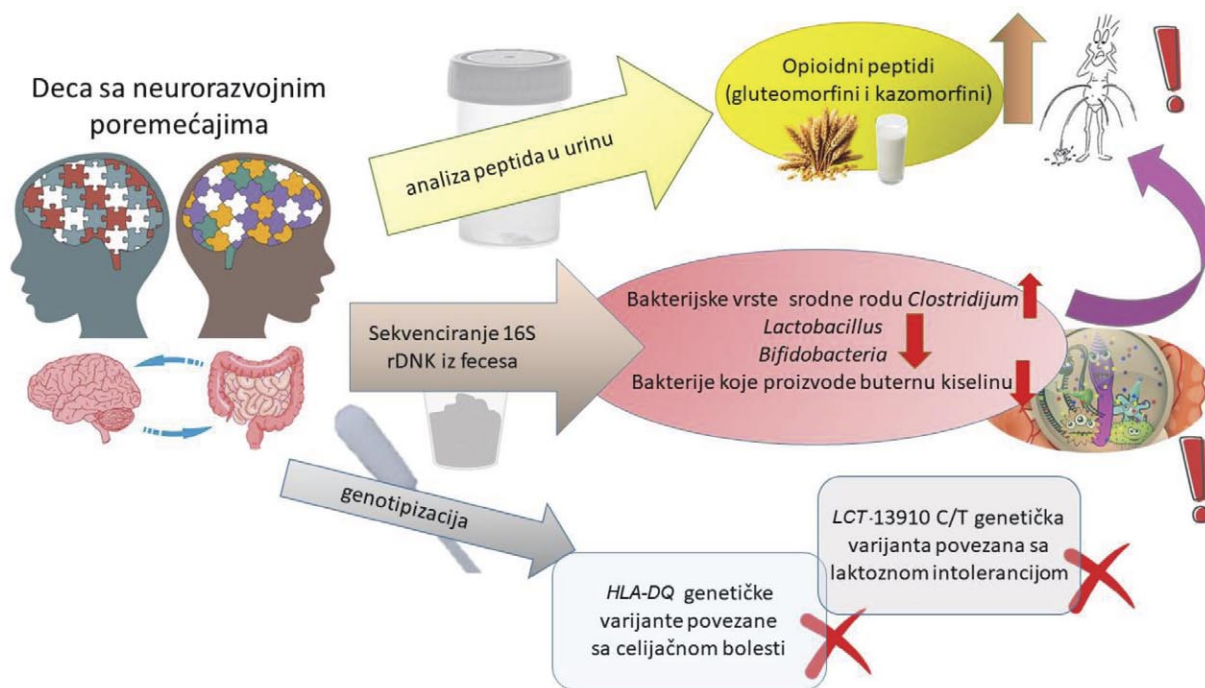
7. Jensen FE. Epilepsy as a spectrum disorder: Implications from novel clinical and basic neuroscience. *Epilepsia*. 2011;52 Suppl 1:1-6.
8. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism-comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology*. 2011;11:22.
9. Konstantareas MM, Homatidis S. Ear infections in autistic and normal children. *Journal of autism and developmental disorders*. 1987;17(4):585-94.
10. Theoharides TC, Tsilioni I, Patel AB, Doyle R. Atopic diseases and inflammation of the brain in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Translational psychiatry*. 2016;6(6):e844.
11. Tonacci A, Billeci L, Ruta L, Tartarisco G, Pioggia G, Gangemi S. A systematic review of the association between allergic asthma and autism. *Minerva pediatrica*. 2017;69(6):538-50.
12. Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ, 3rd, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, et al. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics*. 2010;125 Suppl 1:S1-18.
13. Coury DL, Ashwood P, Fasano A, Fuchs G, Geraghty M, Kaul A, et al. Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. *Pediatrics*. 2012;130 Suppl 2:S160-8.
14. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(3):859-904.
15. Reichelt KL, Tveiten D, Knivsberg AM, Bronstad G. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microbial ecology in health and disease*. 2012;23.
16. Reichelt KL, Knivsberg AM. The possibility and probability of a gut-to-brain connection in autism. *Annals of clinical psychiatry : official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists*. 2009;21(4):205-11.
17. Boukthir S, Matoussi N, Belhadj A, Mammou S, Dlala SB, Helayem M, et al. [Abnormal intestinal permeability in children with autism]. *La Tunisie medicale*. 2010;88(9):685-6.
18. Reichelt WH, Ek J, Stensrud M, Reichelt KL. Peptide excretion in celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1998;26(3):305-9.
19. Dohan FC. Wheat "consumption" and hospital admissions for schizophrenia during World War II. A preliminary report. *The American journal of clinical nutrition*. 1966;18(1):7-10.
20. Genus SJ, Bouchard TP. Celiac disease presenting as autism. *Journal of child neurology*. 2010;25(1):114-9.
21. Pruimboom L, de Punder K. The opioid effects of gluten exorphins: asymptomatic celiac disease. *Journal of health, population, and nutrition*. 2015;33:24.
22. Samasca G, Bruchental M, Butnariu A, Pirvan A, Andreica M, Cristea V, et al. Difficulties in Celiac Disease Diagnosis in Children - A case report. *Maedica*. 2011;6(1):32-5.
23. Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate medical journal*. 2005;81(953):167-73.
24. Kushak RI, Lauwers GY, Winter HS, Buie TM. Intestinal disaccharidase activity in patients with autism: effect of age, gender, and intestinal inflammation. *Autism : the international journal of research and practice*. 2011;15(3):285-94.
25. de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Frolli A, Iardino P, et al. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51(4):418-24.
26. Fiorentino M, Sapone A, Senger S, Camhi SS, Kadzielski SM, Buie TM, et al. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Molecular autism*. 2016;7:49.
27. Brandl K, Schnabl B. Is intestinal inflammation linking dysbiosis to gut barrier dysfunction during liver disease? Expert review of gastroenterology & hepatology. 2015;9(8):1069-76.
28. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazanetti DI, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS one*. 2013;8(10):e76993.
29. Finegold SM, Downes J, Summanen PH. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe*. 2012;18(2):260-2.
30. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;35(Suppl 1):S6-S16.
31. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(11):6459-65.
32. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*. 2013;54(9):2325-40.

33. Macfabe DF. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. *Microbial ecology in health and disease*. 2012;23.
34. Nankova BB, Agarwal R, MacFabe DF, La Gamma EF. Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells--possible relevance to autism spectrum disorders. *PloS one*. 2014;9(8):e103740.
35. Panskepp J. A neurochemical theory of autism. *Trends in neurosciences*. 1979;2:174-7.
36. Tveiten D, Reichelt KL. Exorphins in urine from schizoaffective psychotics. *Open Journal of Psychiatry*. 2012;2:220-7
37. Liu Y, Heiberg T, Reichelt KL. Towards a possible aetiology for depressions? *Behavioral and Brain Functions*. 2007;3.
38. Reichelt KL, Saelid G, Lindback T, Boler JB. Childhood autism: a complex disorder. *Biological psychiatry*. 1986;21(13):1279-90.
39. Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *The Journal of biological chemistry*. 1979;254(7):2446-9.
40. Meisel H, Schlimme E. Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends Food Sci & Technol* 1990;1:41-3.
41. De Noni I, FitzGerald RJ, Korhonen HJT, Roux YL, Livesey CT, Thorsdottir I, et al. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. *EFSA Scientific Report*. 2009;231:1-107.
42. Ng-Kwai-Hang KF, Grosclaude F. Genetic Polymorphism of Milk Proteins In: Fox PF, McSweeney LH, editors. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A & B*. Kluwer Academic/Plenum Publishers; New York, NY, USA2002. p. 739-816.
43. Wada Y, Lonnerdal B. Bioactive peptides released from in vitro digestion of human milk with or without pasteurization. *Pediatric research*. 2015;77(4):546-53.
44. Koch G, Wiedemann K, Teschemacher H. Opioid activities of human beta-casomorphins. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1985;331(4):351-4.
45. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 2006;16(9):945-60.
46. Kost NV, Sokolov OY, Kurasova OB, Dmitriev AD, Tarakanova JN, Gabaeva MV, et al. Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*. 2009;30(10):1854-60.
47. Fukudome S, Yoshikawa M. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS letters*. 1992;296(1):107-11.
48. Fukudome S, Yoshikawa M. Gluten exorphin C. A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS letters*. 1993;316(1):17-9.
49. Pennington C, Dufresne C, Fanciulli G, Wood T. Detection of Gluten Exorphin B4 and B5 in Human Blood by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry *The Open Spectroscopy Journal*. 2007;1:9-16.
50. Cade R, Privette M, Fregly M, Rowland N, Sun Z, Zele V, et al. Autism and Schizophrenia: Intestinal Disorders. *Nutritional neuroscience*. 2000;3(1):57-72.
51. Shattock P, Hooper M, Waring R. Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Developmental medicine and child neurology*. 2004;46(5):357; author reply -8.
52. Reichelt KL, Knivsberg AM. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutritional neuroscience*. 2003;6(1):19-28.
53. Sun Z, Cade R. A Peptide Found in Schizophrenia and Autism Causes Behavioral Changes in Rats *Autism : the international journal of research and practice*. 1999;3:85-95.
54. Sun Z, Cade R, Fregly M, Privette M. β -Casomorphin Induces Fos-Like Immunoreactivity in Discrete Brain Regions Relevant to Schizophrenia and Autism. *Autism : the international journal of research and practice*. 1999;3:67-83.
55. Klavness J, Bigam J, Reichelt KL. The varied rate of response to dietary intervention in autistic children. *Open Journal of Psychiatry*. 2013;3:56-60.
56. Pennesi CM, Klein LC. Effectiveness of the gluten-free, casein-free diet for children diagnosed with autism spectrum disorder: based on parental report. *Nutritional neuroscience*. 2012;15(2):85-91.
57. Cade R, Wagemaker H, Privette RM, Fregly MJ, Rogers J, Orlando J. Effect of dialysis and diet in schizophrenia. *Psychiatry: A World Perspective* 1990;3:494-500.
58. Johnson CR, Handen BL, Zimmer M, Sacco K, Turner K. Effects of gluten free/casein free diet in young children with autism: a pilot study. *J Dev Phys Disabil* 2011;23:213-25.
59. Whiteley P, Shattock P, Knivsberg AM, Seim A, Reichelt KL, Todd L, et al. Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Frontiers in human neuroscience*. 2012;6:344.

60. Bojovic K, Stankovic B, Kotur N, Krstic-Milosevic D, Gasic V, Pavlovic S, et al. Genetic predictors of celiac disease, lactose intolerance, and vitamin D function and presence of peptide morphins in urine of children with neurodevelopmental disorders. *Nutritional neuroscience*. 2019;22(1):40-50.
61. Hunter LC, O'Hare A, Herron WJ, Fisher LA, Jones GE. Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Developmental medicine and child neurology*. 2003;45(2):121-8.
62. Jarmolowska B, Bukalo M, Fiedorowicz E, Cieslinska A, Kordulewska NK, Moszynska M, et al. Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders. *Nutrients*. 2019;11(1).
63. Hietbrink F, Besselink MG, Renooij W, de Smet MB, Draisma A, van der Hoeven H, et al. Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. *Shock*. 2009;32(4):374-8.
64. Horvath K, Perman JA. Autism and gastrointestinal symptoms. *Current gastroenterology reports*. 2002;4(3):251-8.
65. Torrente F, Ashwood P, Day R, Machado N, Furlano RI, Anthony A, et al. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Molecular psychiatry*. 2002;7(4):375-82, 34.
66. D'Eufemia P, Celli M, Finocchiaro R, Pacifico L, Viozzi L, Zaccagnini M, et al. Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta paediatrica*. 1996;85(9):1076-9.
67. Radlovic N, Mladenovic M, Lekovic Z, Ristic D, Pavlovic M, Stojsic Z, et al. Lactose intolerance in infants with gluten-sensitive enteropathy: frequency and clinical characteristics. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2009;137(1-2):33-7.
68. Pal S, Woodford K, Kukuljan S, Ho S. Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose. *Nutrients*. 2015;7(9):7285-97.
69. Barnett MP, McNabb WC, Roy NC, Woodford KB, Clarke AJ. Dietary A1 beta-casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 beta-casein in Wistar rats. *International journal of food sciences and nutrition*. 2014;65(6):720-7.
70. Ul Haq MR, Kapila R, Sharma R, Saliganti V, Kapila S. Comparative evaluation of cow beta-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *European journal of nutrition*. 2014;53(4):1039-49.
71. Ul Haq MR, Kapila R, Saliganti V. Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *J Funct Foods* 2014;8:150–60.
72. Hughes HK, Rose D, Ashwood P. The Gut Microbiota and Dysbiosis in Autism Spectrum Disorders. *Current neurology and neuroscience reports*. 2018;18(11):81.
73. Bojovic K, Ignjatovic Eth I, Sokovic Bajic S, Vojnovic Milutinovic D, Tomic M, Golic N, et al. Gut Microbiota Dysbiosis Associated With Altered Production of Short Chain Fatty Acids in Children With Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020;10:223.
74. Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Pauker O, Hippe H. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*. 1997;47(4):1134-9.
75. Castro HF, Williams NH, Ogram A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria(1). *FEMS microbiology ecology*. 2000;31(1):1-9.
76. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, et al. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & behavior*. 2015;138:179-87.
77. Bolte ER. Autism and *Clostridium tetani*. *Medical hypotheses*. 1998;51(2):133-44.
78. Passmore IJ, Letertre MPM, Preston MD, Bianconi I, Harrison MA, Nasher F, et al. Para-cresol production by *Clostridium difficile* affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. *PLoS pathogens*. 2018;14(9):e1007191.
79. Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Vaisanen ML, et al. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of child neurology*. 2000;15(7):429-35.
80. Clayton TA. Metabolic differences underlying two distinct rat urinary phenotypes, a suggested role for gut microbial metabolism of phenylalanine and a possible connection to autism. *FEBS letters*. 2012;586(7):956-61.
81. Russell WR, Duncan SH, Scobbie L, Duncan G, Cantlay L, Calder AG, et al. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Molecular nutrition & food research*. 2013;57(3):523-35.
82. Song YL, Liu CX, McTeague M, Summanen P, Finegold SM. *Clostridium bartlettii* sp. nov., isolated from human faeces. *Anaerobe*. 2004;10(3):179-84.
83. Bull G, Shattock P, Whiteley P, Anderson R, Groundwater PW, Lough JW, et al. Indolyl-3-acryloylglycine (IAG) is a putative diagnostic urinary marker for autism spectrum disorders. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2003;9(10):CR422-5.
84. Alex D, Garvin DF, Peters SM. *Streptococcus pasteurianus* septicemia. *Indian journal of medical microbiology*. 2013;31(3):310-2.

85. Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *Journal of applied microbiology*. 2010;109(2):539-47.
86. Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental microbiology*. 2007;9(9):2125-36.
87. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(38):16050-5.
88. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;30(1):61-7.
89. Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in microbiology*. 2013;21(4):167-73.
90. Turrone F, Peano C, Pass DA, Foroni E, Severgnini M, Claesson MJ, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS one*. 2012;7(5):e36957.
91. Chaplin AV, Efimov BA, Smeianov VV, Kafarskaia LI, Pikina AP, Shkoporov AN. Intraspecies Genomic Diversity and Long-Term Persistence of *Bifidobacterium longum*. *PloS one*. 2015;10(8):e0135658.
92. Ringel-Kulka T, Cheng J, Ringel Y, Salojarvi J, Carroll I, Palva A, et al. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults--a high throughput microarray analysis. *PloS one*. 2013;8(5):e64315.
93. Lee JH, O'Sullivan DJ. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2010;74(3):378-416.
94. Sonnenburg JL, Chen CT, Gordon JI. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS biology*. 2006;4(12):e413.
95. Deguchi Y, Morishita T, Mutai M. Comparative Studies on Synthesis of Water-soluble Vitamins among Human Species of Bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*. 2014;49(1):13-9.
96. Mulle JG, Sharp WG, Cubells JF. The gut microbiome: a new frontier in autism research. *Current psychiatry reports*. 2013;15(2):337.
97. Miyauchi E, Ogita T, Miyamoto J, Kawamoto S, Morita H, Ohno H, et al. *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PloS one*. 2013;8(11):e79735.
98. Turrone F, Taverniti V, Ruas-Madiedo P, Duranti S, Guglielmetti S, Lugli GA, et al. *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 modulates the host innate immune response. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(2):730-40.
99. Wasilewska J, Klukowski M. Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks - a possible new overlap syndrome. *Pediatric health, medicine and therapeutics*. 2015;6:153-66.
100. Zhang Y, Hodgson NW, Trivedi MS, Abdolmaleky HM, Fournier M, Cuenod M, et al. Decreased Brain Levels of Vitamin B12 in Aging, Autism and Schizophrenia. *PloS one*. 2016;11(1):e0146797.
101. Rossignol DA, Frye RE. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. *Molecular psychiatry*. 2012;17(4):389-401.
102. Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular psychiatry*. 2014;19(2):146-8.
103. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology*. 2004;558(Pt 1):263-75.
104. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology and motility*. 2011;23(12):1132-9.
105. Niehus R, Lord C. Early medical history of children with autism spectrum disorders. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*. 2006;27(2 Suppl):S120-7.
106. Hussey S, Wall R, Gruffman E, O'Sullivan L, Ryan CA, Murphy B, et al. Parenteral antibiotics reduce bifidobacteria colonization and diversity in neonates. *International journal of microbiology*. 2011;2011.
107. Merenstein DJ, Tan TP, Molokin A, Smith KH, Roberts RF, Shara NM, et al. Safety of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B. lactis) strain BB-12-supplemented yogurt in healthy adults on antibiotics: a phase I safety study. *Gut microbes*. 2015;6(1):66-77.

108. Khan MT, Duncan SH, Stams AJ, van Dijk JM, Flint HJ, Harmsen HJ. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *The ISME journal*. 2012;6(8):1578-85.
109. Steppe M, Van Nieuwerburgh F, Vercauteren G, Boyen F, Eeckhaut V, Deforce D, et al. Safety assessment of the butyrate-producing *Butyricoccus pullicaecorum* strain 25-3(T), a potential probiotic for patients with inflammatory bowel disease, based on oral toxicity tests and whole genome sequencing. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2014;72:129-37.
110. Eeckhaut V, Machiels K, Perrier C, Romero C, Maes S, Flahou B, et al. *Butyricoccus pullicaecorum* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2013;62(12):1745-52.
111. Ze X, Ben David Y, Laverde-Gomez JA, Dassa B, Sheridan PO, Duncan SH, et al. Unique Organization of Extracellular Amylases into Amylosomes in the Resistant Starch-Utilizing Human Colonic Firmicutes Bacterium *Ruminococcus bromii*. *mBio*. 2015;6(5):e01058-15.
112. Ben David Y, Dassa B, Borovok I, Lamed R, Koropatkin NM, Martens EC, et al. Ruminococcal cellulosome systems from rumen to human. *Environmental microbiology*. 2015;17(9):3407-26.
113. Chassard C, Delmas E, Robert C, Bernalier-Donadille A. The cellulose-degrading microbial community of the human gut varies according to the presence or absence of methanogens. *FEMS microbiology ecology*. 2010;74(1):205-13.
114. Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Molecular psychiatry*. 2016;21(6):738-48.
115. Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, et al. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(5):3593-9.
116. Volkmar FR, Reichow B. Autism in DSM-5: progress and challenges. *Molecular autism*. 2013;4(1):13.
117. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(7):3047-52.
118. Borre YE, O'Keefe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine*. 2014;20(9):509-18.
119. Sajdel-Sulkowska EM, Zabielski R. Gut Microbiome and Brain-Gut Axis in Autism — Aberrant Development of Gut-Brain Communication and Reward Circuitry. In: Fitzgerald M, editor. *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I*. IntechOpen2013.
120. O'Mahony SM, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Early-life adversity and brain development: Is the microbiome a missing piece of the puzzle? *Neuroscience*. 2017;342:37-54.
121. Neufeld KA, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Communicative & integrative biology*. 2011;4(4):492-4.
122. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular psychiatry*. 2013;18(6):666-73.



Slika 1. Najverovatniji uzrok povećane crevne propustljivosti i povišenih nivoa egzorfina u urinu, za koje se smatra da mogu da uzrokuju neke od simptoma neurorazvojnih poremećaja, nije genetički determinisano netolerisanje glutena ili laktoze, već crevna disbioza.

Primena farmakogenetičkih markera odgovora na terapiju vinkristinom, metotreksatom i tiopurinskim lekovima kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije

Bojan Ristivojević, Branka Zukić

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

Kontakt: bojan.ristivojevic@imgge.bg.ac.rs

APSTRAKT

Akutna limfoblastna leukemija (ALL) je najčešća maligna bolest kod dece i lečenje obolelih od ALL predstavlja veliki izazov u pedijatrijskoj onkologiji. Iako se upotrebom savremenih protokola lečenja postiže visoka stopa preživljavanja, postoji značajna varijabilnost u odgovoru na terapiju i pojavi neželjenih efekata na lekove. Individualni odgovor na terapiju varira, između ostalog, i usled genetičkih faktora. Farmakogenetika pruža mogućnost prilagođavanja terapije individualnim genetičkim profilima pacijenata, čime se može poboljšati efikasnost lečenja i smanjiti toksičnost.

Okosnicu svih savremenih protokola lečenja dečje ALL čine citotoksični lekovi vinkristin, metotreksat i tiopurinski lekovi. Dosadašnjim farmakogenetičkim istraživanjima tražena je veza između povećane toksičnosti ili smanjene efikasnosti terapije ovim lekovima i varijanti u brojnim genima. Nedvosmisleno je pokazano da određene varijante u genu za tiopurin S-metiltransferazu mogu dovesti do ozbiljne mijelotoksičnosti usled primene tiopurina. Nedavno je pokazano da sličan efekat mogu imati i varijante u genu *NUDT15*, mada se one predominantno javljaju u azijskim populacijama. Što se uticaja genetičkih varijacija na efekte terapije vinkristinom i metotreksatom tiče dosadašnja istraživanja su bila manje jednoznačna. Kao potencijalni farmakogenetički markeri odgovora na terapiju vinkristinom izdvajaju se varijante u genima *CEP72* i *CYP3A5*, dok se u slučaju metotreksata najviše studija bavilo varijantama u genima *MTHFR* i *SLCO1B1*.

Očekuje se da će dalji napredak farmakogenetike, usled primene najsavremenijih metoda, omogućiti individualizaciju terapijskih protokola, smanjenje učestalosti terapijskih komplikacija i poboljšanje kvaliteta života pacijenata. Uvođenje farmakogenetičkih testiranja u rutinsku kliničku praksu predstavlja važan korak ka personalizovanoj medicini u lečenju ALL kod dece, jer povećava šanse za dobar odgovor na terapiju i dugoročno preživljavanje obolelih.

Ključne reči: farmakogenetika, dečja akutna limfoblastna leukemija, vinkristin, metotreksat, tiopurinski lekovi

The Application of Pharmacogenetic Markers of The Response to Vincristine, Methotrexate and Thiopurine Therapies in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia

Bojan Ristivojevic, Branka Zukic

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

Correspondence bojan.ristivojevic@imgge.bg.ac.rs

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignant disease in children and represents a significant challenge in pediatric oncology. Although modern treatment protocols achieve high survival rates, there is considerable variability in treatment response and the occurrence of adverse effects. The individual response to therapy varies, among other factors, due to genetic influences. Pharmacogenetics offers the possibility of tailoring therapy to the individual genetic profiles of patients, thereby improving treatment efficacy and reducing toxicity.

The cornerstone of all modern treatment protocols for pediatric ALL consists of cytotoxic drugs such as vincristine, methotrexate, and thiopurine drugs. Previous pharmacogenetic studies have sought to identify the connection between increased toxicity or reduced efficacy of these drugs and variants in various genes. It has been unequivocally demonstrated that certain variants in the *TPMT* gene can lead to severe myelotoxicity due to the use of thiopurines. Recently, it has been shown that similar effects can be caused by variants in the *NUDT15* gene, although these are predominantly found in Asian populations. Regarding the impact of genetic variations on the effects of vincristine and methotrexate therapy, research to date has been less conclusive. Potential pharmacogenetic markers for vincristine response include variants in the *CEP72* and *CYP3A5* genes, while in the case of methotrexate, most studies have focused on variants in the *MTHFR* and *SLCO1B1* genes.

It is expected that further advances in pharmacogenetics, driven by the application of the state-of-the-art methods, will enable the individualization of therapeutic protocols, reduce the incidence of therapeutic complications, and improve the quality of life for patients. The introduction of pharmacogenetic testing into routine clinical practice represents an important step toward personalized medicine in the treatment of ALL in children, as it increases the chances for optimal response to drug treatment and long-term survival of affected patients.

Key words: pharmacogenetics, childhood acute lymphoblastic leukemia, vincristine, methotrexat, thiopurine drugs

Personalizovana medicina i farmakogenetika

Personalizovana medicina podrazumeva prilagođavanje terapijskih ili preventivnih pristupa specifičnim karakteristikama svakog pacijenta, čime se postiže veća efikasnost lečenja, smanjenje rizika od nuspojava izazvanih lekovima i opšte poboljšanje zdravstvenog stanja obolelih. Farmakogenetika, jedan od stubova personalizovane medicine, je naučna disciplina koja proučava kako genetičke varijacije utiču na odgovor pojedinca na terapije lekovima. Cilj farmakogenetike je da razumevanjem odnosa između genetičkih varijanti i odgovora na lekove omogući optimizaciju ishoda lečenja, smanji neželjene reakcije na lekove i otvori put ka personalizovanoj medicini. Individualizovani odgovori na lekove mogu značajno uticati na ishode terapije. Kroz identifikaciju farmakogenetičkih markera, moguće je prilagoditi doze lekova ili odabrati alternativne terapije na osnovu genetičkog profila pacijenta, što značajno poboljšava bezbednost i efikasnost lečenja [1].

Dečja akutna limfoblastna leukemija (ALL)

ALL je najčešći oblik kancera pedijatrijskog uzrasta. Oko 25% svih dečjih kancera i oko 75% svih slučajeva dečje leukemije su ALL, a godišnje 3 do 4 dece od 100.000 oboli od ovog maligniteta [2]. Godišnje, oko 5000 dece u Evropi oboli od ove bolesti [3], a u Srbiji se godišnje beleži oko 60 novih dijagnoza dečje ALL [4]. Ova bolest najčešće pogađa decu uzrasta od 2 do 5 godina, javlja se nešto češće kod dečaka nego kod devojčica i sreće se češće u evropskim u poređenju sa afričkim ili azijskim populacijama [5,6].

Dečja ALL je heterogena bolest koju karakteriše maligna transformacija limfoidnih progenitorskih ćelija-limfoblasta. Nekontrolisanim razmnožavanjem limfoblasta koji zamenjuju zdrave ćelije u koštanoj srži dolazi do simptoma kao što su anemija, rekurentne infekcije i trombocitopenija. Sa daljim razvojem bolesti dolazi do nagomilavanja limfoblasta i u drugim organima, i to najčešće u limfoidnim organima, jetri i centralnom nervnom sistemu, što dovodi do poremećaja u njihovom radu [7].

Ovaj hematološki malignitet može nastati iz B-ćelijske ili T-ćelijske loze, pri čemu je B-ćelijska ALL (B-ALL) češća kod dece i čini 80-85% slučajeva. T-ćelijska ALL (T-ALL) je ređa, ali je povezana sa agresivnijim kliničkim tokom.

Etiologija dečje ALL nije potpuno razjašnjena, ali se smatra da nastaje kombinacijom genetičkih i sredinskih faktora. Češća je kod dece sa genetičkim poremećajima poput Daunovog sindroma, Fankonijeve anemije i Blumovog sindroma [8–10]. Izloženost jonizujućem zračenju, kao i infekcije određenim virusima, poput Epštajn-Bar i HIV, povezane su sa pojavom ALL-a [11–13]. Kod nekih obolelih, leukemijski klonovi mogu nastati još tokom intrauterinog razvoja [14].

Genetička klasifikacija je ključna za prognozu i određivanje terapije. Sa nastankom ALL povezano je nekoliko genetičkih abnormalnosti, uključujući hromozomske translokacije i mutacije. Najčešći podtip je hiperdiploidni ALL, gde leukemijske ćelije imaju više od 50 hromozoma, što je generalno povezano sa povoljnom prognozom [15]. Drugi značajan podtip uključuje *ETV6-RUNX1* translokaciju, koja se sreće u oko 25% slučajeva dečje B-ALL i takođe nosi dobru prognozu [16]. S druge strane, pacijenti sa Filadelfija hromozomom (*BCR-ABL1*) ili hipodiploidnim ALL (manje od 45 hromozoma) smatraju se visokorizičnim zbog lošijih ishoda lečenja [16].

Lečenje dečje ALL danas je veoma uspešno. Ishod lečenja poboljšan je pre svega razvojem dijagnostičkih metoda i modifikacijama postojećih protokola zasnovanim na stratifikaciji bolesnika u odnosu na rizik od relapsa [17]. Stratifikacija rizika kod ALL-a uključuje procenu genetičkih karakteristika, starosti

pacijenta, broja leukocita pri dijagnozi i odgovora na inicijalno lečenje. Pacijenti se klasifikuju u grupe sa niskim, srednjim ili visokim rizikom, što usmerava dalje terapijske odluke. Praćenje minimalne rezidualne bolesti (MRB), posebno nakon indukciono terapije, jedan je od najpouzdanijih prediktora relapsa i sada je ključni deo stratifikacije rizika.

Petogodišnje preživljavanje u zapadnim zemljama dostiže i 90%, dok je u zemljama sa skromnijim uslovima lečenja preživljavanje manje [18]. U Srbiji je petogodišnje preživljavanje obolelih od dečje ALL 73,1% [19].

Lečenje dečje ALL je vrlo slično širom sveta i obuhvata višefaznu hemoterapiju, koja se tipično deli na faze indukcije, konsolidacije i održavanja. Cilj faze indukcije je postizanje potpune remisije, dok faza konsolidacije cilja na eliminaciju preostalih leukemijskih ćelija, a faza održavanja sprečava relaps. Među lekove koji se najčešće koriste u lečenju ALL ubrajaju se vinkristin, metotreksat i tiopurinski lekovi (npr. 6-merkaptopurin). Kod pacijenata sa visokim rizikom ili kod onih kod kojih dođe do relapsa, tretman može uključivati transplantaciju matičnih ćelija. Iako se terapija zračenjem ređe koristi zbog dugoročnih nuspojava, može se primeniti u slučajevima zahvatanja centralnog nervnog sistema.

U Srbiji, dečja ALL leči se prema međunarodnom, višemodalnom Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protokolu. Terapija BFM protokolom je precizno definisana za svaku grupu rizika. Pored standardnih faza, terapija BFM protokolom u svim grupama rizika uključuje i dodatnu fazu intenzifikacije, koja nastupa između indukcije i konsolidacije. Predviđeno trajanje terapije prema BFM protokolu je 104 nedelje (24 meseca) [20].

Uprkos velikom uspehu protokola lečenja, toksičnost hemoterapije ostaje značajan problem, u čijem prevazilaženju značajnu ulogu može imati i primena farmakogenetike.

Farmakogenetika dečje ALL

Citotoksičnost je opšta karakteristika svih hemoterapijskih tretmana. Citostatici i drugi lekovi koji se koriste u terapiji maligniteta primenjuju se u dozama blizu toksičnih nivoa kako bi se postigao maksimalni terapijski učinak. U slučaju dečje ALL, ovaj pristup vodi do visoke stope izlečenja, ali i do znatnog broja letalnih ishoda u pedijatrijskom uzrastu. Otprilike tri četvrtine pacijenata tokom terapije doživi neki oblik neželjenih efekata, a smrtnost usled toksičnosti terapije iznosi između 1% i 3% [17]. Visoka učestalost ovih efekata može se pripisati niskoj specifičnosti lekova, uskom terapijskom indeksu i velikim kumulativnim dozama koje se koriste u lečenju [21].

Neželjeni efekti kod dece obolele od ALL najčešće uključuju reakcije preosetljivosti, gastrointestinalnu toksičnost, neurološke i nefrološke komplikacije, kao i mijelosupresiju, koja može biti opasna po život [22]. Ishod terapije zavisi od brojnih faktora, kao što su stadijum bolesti, interakcije lekova, uzrast, pol, kao i sredinski, fiziološki i genetički faktori. U poslednjih nekoliko decenija kroz veliki broj farmakogenetičkih istraživanja akumulirana su znanja koja ukazuju da su genetički faktori izuzetno značajni. Ovi faktori mogu biti povezani sa genomom zdravih ćelija pacijenta ili sa genomom maligno transformisanih ćelija. Genetički faktori zdravih ćelija utiču na farmakokinetiku i farmakodinamiku lekova, dok promene u genomu tumora doprinose razvoju rezistencije na terapiju [23]. Farmakogenetička istraživanja omogućavaju identifikaciju biomarkera koji predviđaju toksičnost ili smanjenu efikasnost lekova, što omogućava personalizaciju terapije pre njenog započinjanja.

ALL je idealan model za farmakogenetička istraživanja zbog standardizovanih protokola lečenja, njihove dugoročne efikasnosti i primene u različitim populacijama. Lekovi ključni za terapiju ALL, tiopurinski lekovi,

metotreksat i vinkristin, koriste se i u lečenju drugih bolesti, što čini rezultate ovih istraživanja potencijalno široko primenljivim [24]. Ovi lekovi imaju esencijalnu ulogu u ometanju deobe ćelija, metabolizma folata i biosinteze purina. Međutim, njihova upotreba je često povezana sa ozbiljnim nuspojavama, kao što su neurotoksičnost (vinkristin), hepatotoksičnost i oralni mukozitis (metotreksat) i mijelosupresija (tiopurini). Neželjene reakcije na lekove ne samo da smanjuju kvalitet života pacijenata, već mogu dovesti i do prekida u terapiji, što potencijalno ugrožava ishode lečenja. Farmakogenetički markeri pružaju ključne informacije za prilagođavanje ovih terapija kod dece sa ALL-om [25].

Farmakogenetika vinkristina

Vinkristin (VCR) je ključni citostatik u modernim protokolima za lečenje dečje (ALL). Ovaj prirodni alkaloid se dobija iz biljke *Catharanthus roseus* i koristi se kao antineoplastični agens u lečenju hematoloških i solidnih maligniteta [26]. Njegova primena se vrši intravenozno, nakon čega brzo dospeva do većine tkiva, osim centralnog nervnog sistema. Metabolizam vinkristina se pretežno odvija u jetri, uz pomoć enzima iz grupe citohroma P450, CYP3A4 i CYP3A5. Poluživot leka je dug, oko 85 sati, a eliminiše se uglavnom putem žuči (Slika 1). Zbog toga što retko izaziva mijelosupresiju, vinkristin je često deo terapijskih režima kod pacijenata sa leukopenijama i trombocitopenijama [27].

Mehanizam dejstva vinkristina zasniva se na njegovoj sposobnosti vezivanja za β -subjedinicu tubulina, čime se inhibira polimerizacija mikrotubula, što dovodi do zaustavljanja ćelija u metafazi i indukcije programirane ćelijske smrti [28]. Ipak, zbog neselektivnog vezivanja za mikrotubule nervnih vlakana, vinkristin često uzrokuje perifernu neuropatiju (VIPN, eng. *vincristine-induced peripheral neuropathy*). VIPN se manifestuje kroz slabost mišića, arefleksiju, neuropatski bol i senzorne gubitke, kao i autonomne poremećaje poput ortostatske hipotenzije i konstipacije [29]. Ove neuropatije mogu značajno uticati na kvalitet života pacijenata, a u težim slučajevima preporučuje se smanjenje doza ili potpuni prekid terapije, čime se ugrožava uspeh lečenja.

Pojava VIPN kod dece povezana je sa više faktora, uključujući uzrast, intenzitet terapije, koadministraciju drugih lekova, farmakokinetički profil pacijenta i genetičke predispozicije [29,30]. U novijim istraživanjima, pažnja je usmerena na identifikaciju genetičkih varijanti koje utiču na rizik od razvoja VIPN, kako bi se razvila preventivna testiranja i personalizovani pristupi terapiji. Studije kandidata gena i istraživanja genomske asocijacije ukazuju na moguću povezanost varijanti u genima koji regulišu farmakokinetiku i farmakodinamiku vinkristina sa nastankom VIPN, što predstavlja osnovu za dalja istraživanja.

Među prvim genima koji su dovođeni u vezu sa nastankom VIPN je gen *CYP3A5*. Proteinski produkt ovog gena je enzim važan za metabolizam više lekova i endogenih supstanci i najvažniji je enzim u metabolizmu vinkristina. Najčešći alel ovog gena, *CYP3A5*3*, odlikuje se varijantom rs776746 u trećem intronu gena, koja dovodi do uvođenja stop kodona i sinteze nefunkcionalnog enzima [31]. Učestalost ove varijante najveća je u evropskim, a najređa u afričkim populacijama, što je praćeno i razlikama u nivou ekspresije proteinskog produkta gena [32]. Egbelakin i saradnici su u studiji koja je uključivala ispitanike pretežno evropskog porekla, od kojih su 88% bili homozigotni nosioci za varijantni rs776746 alel, pokazali da je ova varijanta od značaja za razvoj VIPN [33]. Međutim, u više studija nije pokazano da varijanta rs776746 može biti asociirana sa nastankom VIPN do kojih dolazi usled primene vinkristina kod dece obolele od ALL [34–38].

Kao farmakogen od značaja za nastanak VIPN kod dece obolele od ALL u poslednje vreme najčešće se pominje gen *CEP72*. Proteinski produkt ovog gena važan je za formiranje mikrotubula i stabilnost

centrozoma. Nedavno je u studiji genomskih asocijacija pronađena veza između varijante rs924607 u promotorskom regionu ovog gena i većeg rizika za nastanak VIPN [39]. Ova varijanta dovodi do formiranja vezujućeg mesta za transkripcioni represor NKX-6.3, što rezultuje nižom ekspresijom informacione RNK gena *CEP72* [39]. Međutim, i dalje ne postoji konzistentnost u rezultatima između različitih studija. Stok i saradnici su pokazali da ova varijanta može biti povezana sa nastankom VIPN i kod odraslih obolelih od ALL [40]. U kasnije sprovedenoj metastudiji koja je uključivala više od 500 ispitanika, potvrđena je veza između varijante rs924607 u genu *CEP72* i nastanka VIPN [41]. Međutim, brojne studije nisu potvrdile ova zapažanja. Studijom sprovedenom u španskoj populaciji nije potvrđeno postojanje veze između ove varijante i nastanka VIPN u ranoj fazi lečenja dece obolele od ALL [42]. Slično zapažanje uočeno je i studiji koja je uključivala decu obolelu od ALL arapskog porekla [43]. Rezultati preliminarne studije koja je uključivala decu lečenu od ALL u Srbiji ne potkrepljuju hipotezu da varijanta rs924607 u genu *CEP72* može biti prediktivni marker razvoja VIPN kod dece obolele od ALL koja su lečena vinkristinom [38].

Transporteri iz ABC porodice igraju ključne uloge u transportu i eliminaciji vinkristina. U izlučivanju vinkristina putem žuči učestvuju *ABCB1* i *ABCC2* transporteri, dok *ABCC1* transportuje vinkristin u krv [44]. Pokazano je da varijanta rs4728709 u genu *ABCB1* može modulisati neurotoksičnost I-II stepena povezanu sa vinkristinom [34]. Za varijantu rs1045642 je pokazano da je često povezana sa smanjenom ekspresijom *ABCB1* gena, što ukazuje da nosioci varijantnog alela imaju slabiju sposobnost izbacivanja vinkristina iz hepatocita u žuč, što rezultuje višim nivoima vinkristina u plazmi i, samim tim, veće toksičnosti [43]. Lopez-Lopez i saradnici su pokazali da varijante rs2073337, rs4148396 i rs11192298 u genu *ABCC2* nemaju značajnu povezanost sa razvojem neurotoksičnosti, ali da su varijante rs3740066 i rs12826 povezane sa povećanim rizikom za razvoj VIPN stepena I-II [45]. U studiji Rajta i saradnika pokazano je da je varijanta rs3784867 u genu *ABCC1* povezana sa nastankom i stepenom VIPN [41].

Gen *ACTG1* kodira izoformu aktina koja je eksprimirana u gotovo svim tipovima ćelija i važna je za obrazovanje citoskeleta. Faktori koji dovode do promena u interakciji gama aktina i mikrotubula mogu biti važni u signalnoj transdukciji preko aktinskog citoskeleta [46]. Studija Cepija i saradnika pokazala je da varijanta rs1135989 može biti povezana sa većim rizikom od nastanka težih oblika VIPN, ali i sa tolerancijom na manje doze vinkristina [34]. Međutim, u studiji sprovedenoj u populaciji dece obolele od ALL u Srbiji ovo zapažanje nije potvrđeno [38].

Gen *CAPG* kodira protein iz porodice Gelsolin/Vilin proteina koji regulišu aktin. Studija sprovedena u populaciji dece obolele od ALL u Italiji pokazala je da varijanta rs3770102 u ovom genu, smeštena 17 nukleotida uzvodno od početnog mesta transkripcije, ima zaštitni efekat protiv neurotoksičnosti visokog stepena.

miRNK su male nekodirajuće RNK koje imaju funkciju u utišavanju ekspresije gena na posttranskripcionom nivou, a genetičke varijacije u miRNK mogu uticati na njihovu funkciju. Studija sprovedena u španskoj populaciji pokazala je da varijanta rs12402181 u genu *MIR3117* smanjuje verovatnoću pojave VIPN [47]. Protektivni efekat ove varijante zasnovan je na smanjenju tačnosti prepoznavanja targeta ove miRNK, među kojima su i transporteri *RALBP1* i *ABCC1*. Ranije studije pokazale su da su ovi transporteri odgovorni za izbacivanje vinkristina iz perifernih neurona [48,49]. Zbog lošijeg prepoznavanja iRNK ovih transportera, dolazi do veće ekspresije oba gena, *RALBP1* i *ABCC1*. Posledično, pojačava se izbacivanje vinkristina iz aksona, smanjuje njegovo vezivanje za mikrotubule, a time i štetni efekti vinkristina. Istom studijom utvrđeno je da varijanta rs7896283 u genu *MIR4481* potencijalno ometa procese regeneracije perifernih nerava, koji su od velike važnosti u oporavku od VIPN. Predloženi efekat ove varijante ostvaruje se putem povećanja stabilnosti pre-miRNK, što može pojačati efekat zrele miRNK [47].

Povećana stabilnost zrele miR-448 vodila bi smanjenoj ekspresiji ciljnih gena. Niska ekspresija gena uključenih u procese regeneracije perifernih neurona može biti razlog zbog koga dolazi do povećane incidence VIPN, asocirane sa varijantom rs7896283. Replikativnom studijom sprovedenom u Srbiji nisu potvrđena ova zapažanja [38].

Farmakogenetika metotreksata

Metotreksat je jedan od lekova koji se najduže koriste u lečenju dečje ALL i jedini lek koji se koristi u svim fazama savremenih višemodalnih terapija dečje ALL. Osim u lečenju dečje ALL, metotreksat se danas uspešno koristi i u lečenju drugih maligniteta, ali i autoimunskih i inflamatornih bolesti [50].

Metotreksat je analog folne kiseline i deluje kao antagonist, odnosno kompetitivni inhibitor folata, usled čega dovodi do zaustavljanja sinteze nukleinskih kiselina i programirane smrti ćelije.

Metabolizam folata i metotreksata je dobro poznat (Slika 2). I prirodni folati i metotreksat ulaze u ćeliju aktivnim transportom, preko odgovarajućih transportera. Nakon unosa u ćeliju dolazi do poliglutaminacije metotreksata, što mu omogućuje da efikasnije kompetitivno inhibira enzime uključene u metabolizam folata, i to dihidrofolat reduktazu (DHFR) i timidilat sintetazu (TYMS) [51]. DHFR stvara redukovane folate, prevodeći folnu kiselinu i dihidrofolat u tetrahidrofolat (THF). U ćeliji postoji nekoliko bioaktivnih formi redukovanih folata, među kojima su 5,10-metilen-THF i 5-metil-THF. Molekule 5,10-metilen-THF enzim TYMS koristi u sintezi timidilata, dok se 5-metil-THF troši za sintezu metionina [52]. Metionin je prekursor S-adenozil metionina (SAM) koji je važan za reakcije metilacije u ćeliji, uključujući i metilaciju DNK [53]. Nedostatak THF usled terapije metotreksatom dovodi do prekida brojnih procesa sinteze i metilacije DNK, zbog čega dolazi do programirane ćelijske smrti. Na taj način se postiže terapeutsko dejstvo ovog leka [54].

Farmakokinetika metotreksata je od ključne važnosti prilikom doziranja, kako bi se sprečili neželjeni efekti [55]. Membranski transporteri su važni faktori distribucije i klirensa metotreksata. Transporter SLC19A1 je važan za ulazak metotreksata u veliki broj tipova ćelija, dok je SLCO1B1 važan za unos metotreksata u ćelije jetre, odakle se uklanja putem žuči [56]. Izbacivanje metotreksata iz ćelije odvija se transporterima iz porodice ATP-vezujućih kaseti [52].

Iako je zbog istorijski dugotrajne upotrebe u lečenju dečje ALL metotreksat bio predmet brojnih farmakogenetičkih istraživanja, do danas nije identifikovan nijedan farmakogenetički marker koji bi bio uveden u kliničku praksu u cilju prediktivnog testiranja. Među najbolje proučenim farmakogenima koji se dovode u vezu sa odgovorom na terapiju metotreksatom su varijante u genima *SLCO1B1*, *MTHFR*, *DHFR*, *TYMS* i *SLC19A1* [57–61].

Gen *SLCO1B1* kodira protein iz porodice transportera organskih anjona koji je eksprimiran u hepatocitima, na bazolateralnoj strani ćelijske membrane [62]. Varijacije u ovom genu mogu da utiču na transport različitih endogenih metabolita i lekova, zbog čega dolazi do promena u njihovim farmakokinetičkim profilima. Identifikovano je preko 190 varijanti u genu *SLCO1B1* čije su učestalosti u različitim populacijama preko 5%. Za varijantu rs4149056 (c.521T>C) pokazano je da je od funkcionalnog značaja i da dovodi do smanjenja transporta nekoliko klasa lekova [63]. Važnost ove varijante, kao i drugih varijanti u genu *SLCO1B1*, u eliminaciji metotreksata i razvoju toksičnosti, kao što su hepatotoksičnost, gastrointestinalna toksičnost i razvoj oralnog mukozitisa, i dalje je predmet farmakogenetičkih ispitivanja. Iako je u više studija pokazano da rs4149056 *SLCO1B1* funkcionalna varijanta može imati uticaja na smanjenu eliminaciju metotreksata i pojavu toksičnosti [64–66], u drugim studijama ova zavisnost nije potvrđena [67–70].

Gen *MTHFR* eksprimiran je u značajnoj meri u velikom broju tkiva. Glavna ćelijska funkcija *MTHFR* je prevođenje 5,10-metilen-THF u 5-metil-THF, koji je neophodan za sintezu metionina. Jedan od mogućih metabolita metionina je i SAM, koji kao donor metil grupe igra važnu ulogu u metilaciji DNK. Varijanta ovog gena sa najvećim farmakogenetičkim potencijalom je varijanta c.677 C>T [71]. Ova nesinonimna nukleotidna zamena dovodi do ugradnje alanina umesto valina na 222. poziciji što dovodi do smanjene aktivnosti ovog enzima za oko 65% [72]. U kontekstu dečje ALL, pokazano je da nosioci varijantnog alela ređe oboljevaju od ove bolesti [73]. S druge strane, prisustvo ove varijante kod dece obolele od ALL dovedeno je u vezu sa većim rizikom od relapsa [57]. Ova varijanta bila je predmet istraživanja više farmakogenetičkih studija koje su se bavile efikasnošću i razvojem toksičnosti usled primene metotreksata u lečenju dečje ALL [67]. Dosadašnji rezultati ne upućuju na mogućnost upotrebe ove genetičke varijacije kao farmakogenetičkog markera [74].

Gen *SLC19A1* kodira transporter preko koga metotreksat ulazi u ćeliju. Varijanta rs1051266 u ovom genu dovedena je u vezu sa relapsom ALL-a i lošijim preživljavanjem [75]. U jednoj studiji pokazano je da je od svih genetičkih varijanti povezanih sa folatnim putem, prisustvo varijante rs1051266 najveći faktor rizika za razvoj ALL-a [76], dok je druga studija, suprotno, pokazala da ova varijanta ima zaštitni efekat [77]. Osim toga, pokazana je povezanost između varijante rs1051266 i veće verovatnoće održavanja remisije, kao i manje verovatnoće relapsa u grupi od 500 dece sa ALL-om, uz efekat veće toksičnosti zabeležene u koštanoj srži [78]. Studijom sprovedenom na populaciji dece obolele od ALL u Srbiji pokazano je da se pojava niskog klirensa metotreksata povećava sa prisustvom rs1051266 varijante [70]. Ovaj rezultat sugerise da je rs1051266 varijanta dobar farmakogenetički kandidat marker kinetike metotreksata. Istom studijom pokazano je da bi ova varijanta mogla biti farmakogenetički marker za hepatotoksičnost kod pedijatrijskih pacijenata sa ALL-om [70].

Gen *TYMS* kodira enzim neophodan za replikaciju i popravku DNK, prevodeći uridin monofosfat u timidin monofosfat. S obzirom na ključnu ulogu *TYMS* enzima u ćelijama koje se brzo dele target je u lečenju različitih vrsta malignih i inflamatornih bolesti. Među inhibitorima ovog enzima nalazi se i metotreksat [79]. Najviše proučavane genetičke varijante u genu *TYMS* nalaze se u 5'UTR i 3'UTR regionima, i utiču na stabilnost, lokalizaciju i efikasnost translacije iRNA [80]. Minisatelitski region, koji sadrži tri ili dva ponovka, dužine po 28 baza, nalazi se u 5'UTR regiji *TYMS* gena. Alel sa dva ponovka (2R) dovodi do smanjenja translacije *TYMS* u poređenju sa tri ponovka (3R) [81]. 3'UTR region gena *TYMS* sadrži indel dužine 6 bp. Aleli sa delecijom imaju smanjenu stabilnost iRNA, što rezultira nižim nivoima timidilat sintaze, usled veće podložnosti degradaciji [82]. Poliglutamati oblici MTX direktno se vezuju za *TYMS* enzim i time ga inhibiraju [83]. Ovaj mehanizam je povezan sa povećanom gastrointestinalnom toksičnošću. Pacijenti koji nose varijante u ovom genu koje dovode do smanjene ekspresije gena pokazuju veću verovatnoću za razvoj neželjene reakcije na lekove [84]. Studijom sprovedenom na grupi dece obolele od ALL u Srbiji pokazano je da homozigotni nosioci *TYMS* delecije od 6 bp imaju više od četiri puta veću verovatnoću da iskuse gastrointestinalnu toksičnost stepena 2 ili više u poređenju sa pacijentima sa drugim *TYMS* genotipovima [61,70].

Dihidrofolat reduktaza (DHFR) je ključni enzim u folatnom ciklusu, a inhibicija DHFR predstavlja jedan od glavnih mehanizama dejstva metotreksata. Stoga, farmakogenetičke varijante u genu *DHFR* mogu značajno uticati na odgovor pacijenata na terapiju metotreksatom, posebno u smislu toksičnosti i efikasnosti leka.

Jedna od najčešće proučavanih varijanti je delecija od 19 bp promotoru gena *DHFR*, koja može uzrokovati povećanu ekspresiju DHFR-a, smanjujući efikasnost inhibicije metotreksatom [85]. Ova varijanta

je povezana sa nižom toksičnošću, ali i slabijim terapijskim odgovorom kod pacijenata sa ALL-om. Pacijenti koji nose ovu varijantu mogu zahtevati prilagođavanje doza kako bi se postigla optimalna terapijska efikasnost.

Farmakogenetika tiopurinskih lekova

Tiopurinski lekovi 6-merkaptopurin (6-MP), azatioprin i 6-tioguanin (6-TG) su među antitumorskim lekovima koji su najduže u medicinskoj upotrebi [86]. Iako sva tri leka imaju slične efekte, u kliničkoj praksi se uglavnom koriste za različite namene: 6-TG se najčešće koristi u lečenju mijeloidnih leukemija, 6-MP se uglavnom koristi u lečenju limfoidnih maligniteta, dok se azatioprin najčešće koristi za ostvarivanje imunosupresivnog efekta prilikom transplantacija organa ili u lečenju inflamatornih i autoimunskih bolesti, kao što su inflamatorna bolest creva i reumatoidni artritis [87]. Tiopurinski lekovi su prolekovi koji sami po sebi nemaju citotoksičan efekat. Da bi ostvarili svoje terapeutsko dejstvo moraju biti transformisani u tioguaninske nukleotide (TGN) i kao takvi se ugrađuju u nukleinske kiseline (Slika 3).

Ugradnja TGN u nukleinske kiseline dovodi do inhibicije nekoliko enzima uključenih u mehanizme reparacije i replikacije DNK [88]. Ugradnja TGN dovodi i do direktnih oštećenja DNK molekula, u vidu jednonančanih prekida i formiranja kovalentnih veza između DNK i proteina [89,90]. Na ovaj način, 6-MP ostvaruje svoje glavno citotoksično dejstvo i dovodi do programirane ćelijske smrti [91].

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) je enzim koji detoksikuje tiopurinske lekove metilacijom tiopurinskih analoga, čime se sprečava njihova inkorporacija u DNK. Aktivnost TPMT enzima kod pacijenata zavisi od varijanti u genu *TPMT*, a ova osobina se nasledjuje kodominantno: pacijenti koji nose jedan nefunkcionalni alel imaju srednju aktivnost TPMT-a, dok pacijenti sa dva nefunkcionalna alela imaju veoma nisku TPMT aktivnost [92]. Tri česte varijante u genu *TPMT* (rs1800462, rs1800460 i rs1142345) uzrokuju većinu slučajeva promenjene funkcije TPMT enzima, a njihova zastupljenost je specifična za različite populacije. Kod Evropljana i Afrikanaca postoji veća učestalost nefunkcionalnih alela u poređenju sa istočnoazijskim populacijama. Takođe, kod Evropljana je najčešći nefunkcionalni alel *3A (koji sadrži dve varijante, rs1800460 i rs1142345), dok je u istočnoazijskim populacijama najčešći alel *3C (rs1142345). Doziranje tiopurina i njihova toksičnost usko su povezivani sa TPMT aktivnošću i genetikom. TPMT i tiopurinski lekovi predstavljaju jedan od prvih i najbolje dokumentovanih gen-lek parova u farmakogenetici, zbog čega su varijante u genu *TPMT* širom sveta prihvaćeni farmakogenetički markeri koji se koriste u rutinskim kliničkim preventivnim testiranjima [87,93–95].

NUDT15 je citoplazmatični enzim, među čije supstrate se ubrajaju i produkti oksidativnih oštećenja (npr. 8-okso-dGTP) koji mogu dovesti do pogrešnog sparivanja baza tokom replikacije DNK. NUDT15 je direktno uključen u metabolički put tiopurina, tako što prevodi aktivne tiopurinske metabolite u manje toksične forme. Na ovaj način sprečava se ugradnja toksičnih metabolita u RNK i DNK molekule, zbog čega je NUDT15 važan regulator nivoa tiopurinskih metabolita u ćeliji, a time i efekata terapije tiopurinskim lekovima [96].

Velika studija genomske asocijacije je 2014. godine pokazala da je varijanta c.415C>T (p.Arg139Cys) u genu *NUDT15* povezana sa ranom pojavom leukopenije usled primene tiopurinskih lekova kod obolelih od inflamatorne bolesti creva [97]. Ubrzo je utvrđena i korelacija između ove varijante i pojave teške leukopenije izazvane primenom tiopurinskih lekova kod dece obolele od ALL u Japanu [98]. U nezavisnoj studiji genomske asocijacije pokazano je da deca obolela od ALL koja su homozigotni nosioci za varijantu c.415C>T mogu da tolerišu samo 8.3% standardne doze 6-merkaptopurina tokom terapije održavanja [99].

U kliničkoj studiji koja je obuhvatala tri kohorte sa ukupno 270 dece obolele od ALL iz Singapura, Gvatemale i Japana osim varijante c.415C>T identifikovane su još tri kodirajuće varijante u ovom genu: c.416G>A, c.52G>A i c.36_37insGGAGTC. Efekat ovih varijanti je bio gubitak funkcije enzima između 74.4% i 100%, a diplotipovi koji su sadržali varijante sa gubitkom funkcije asocirani su sa netolerancijom na tiopurinske lekove u sve tri kohorte [100]. Varijantni aleli gena *NUDT15* uglavnom su zastupljeni u azijskim, hispanoameričkim i starosedelačkim američkim populacijama [99]. Dodatne studije pokazale su da u populacijama evropskog porekla, u kojima je varijanta c.415C>T retka, druge varijante u genu *NUDT15* mogu da doprinesu nastanku leukopenija kod pacijenata koji primaju terapiju tiopurinima i do 13% slučajeva [101].

Potencijalni farmakogeni koji kodiraju transportere i enzime uključene u eliminaciju tiopurinskih lekova su *ITPA* i *ABCC4*. *ITPA* katalizuje hidrolizu pirofosfatne grupe iz purinskih analognih trifosfata, čime se sprečava njihova ugradnja u DNK [102]. *ABCC4* je membranski transporter koji izbacuje tiopurinske lekove i njihove metabolite [103]. Varijante sa nižom aktivnošću gena *ITPA* i *ABCC4* povezane su sa smanjenom tolerancijom na tiopurinsku terapiju, premda ovi rezultati nisu konzistentni među različitim studijama [104–106].

Gen *PACSIN2* dospeo je u fokus farmakogenetičkih istraživanja tiopurinskih lekova nakon studije genomske asocijacije u kojoj je varijanta rs2413739 pokazala najvišu povezanost sa aktivnošću enzima *TPMT* [107]. Ovaj rezultat je potvrđen u jednoj studiji kod pacijenata sa ALL-om [108]. Međutim, povezanost *PACSIN2* varijanti sa aktivnošću *TPMT* enzima nije dokazana ni kod pacijenata sa ALL-om ni kod zdravih ispitanika u studijama genomske asocijacije [93,94].

Uticaj farmakogenetike na ishode lečenja dečje ALL: izazovi, ograničenja

Farmakogenetička istraživanja su značajno uticala na lečenje dečje ALL. Integriranjem genetičkih testova u terapijske protokole zdravstveni radnici mogu individualizovati lečenje pacijenata sa ALL-om, smanjujući rizik od toksičnosti, poboljšavajući stopu preživljavanja i povećavajući ukupni kvalitet života. Brojna klinička ispitivanja i studije istraživale su prednosti terapija vođenih farmakogenetikom u ALL-u, pokazujući ohrabrujuće rezultate u optimizaciji ishoda lečenja. Svakako najistaknutije farmakogenetičko otkriće u ALL-u predstavlja saznanje da varijante u genu *TPMT* dovode do smanjenja *TPMT* enzimske aktivnosti, odnosno sporijeg metabolizma leka tiopurina i većeg rizika od razvoja ozbiljnih toksičnosti prilikom primene standardnih doza ovih lekova. U ključnom istraživanju koje su sprovedi Relling i saradnici, farmakogenetičko testiranje za *TPMT* varijante pre započinjanja terapije tiopurinima značajno je smanjilo rizik od teške mijelosupresije, česte i potencijalno opasne nuspojave kod pacijenata sa ALL-om koji primaju 6-MP [109].

Pored toga, novija studija koju je sproveo Yang sa saradnicima ispitivala je uticaj varijanti u genu *NUDT15* na pacijente obolele od ALL. Njihovo istraživanje potvrdilo je da su pacijenti sa određenim *NUDT15* varijantama imali povećan rizik od toksičnosti povezane sa tiopurinima, uključujući neutropeniju. Zaključak ove studije je da je neophodno uključivanje *NUDT15* genotipizacije u kliničku praksu kako bi se usmerile odluke o doziranju i izbeglo prekomerno izlaganje leku [99].

Terapija vođena farmakogenetikom ima direktan i merljiv uticaj na stopu preživljavanja i kvalitet života kod dece sa ALL-om. Studije su pokazale da pacijenti koji prolaze kroz farmakogenetičko testiranje ređe doživljavaju prekide u lečenju zbog toksičnosti, što dovodi do boljeg kontrolisanja bolesti i smanjenog rizika od relapsa. Studija Morijame i saradnika pokazala je da je *NUDT15* genotipizacija poboljšala ukupne ishode lečenja, posebno kod pedijatrijskih pacijenata sa ALL-om, omogućavajući prilagođavanje doza koje su

smanjile teške neželjene efekte, uz očuvanje terapijske efikasnosti [100]. Ne treba zanemariti činjenicu da farmakogenetičko testiranje poboljšava i kvalitet života dece sa ALL-om smanjenjem fizičkog i emocionalnog opterećenja hemoterapijom. Manje ozbiljnih nuspojava znači da pacijenti doživljavaju manje umora izazvanog lečenjem, hospitalizacija i komplikacija, omogućavajući im da održe viši nivo funkcionalnosti tokom svog puta kroz borbu sa bolešću.

Premda farmakogenetika nosi veliki potencijal za primenu personalizovane medicine, implementacija farmakogenetičkog testiranja u kliničku praksu suočava se sa brojnim izazovima. Ovi izazovi su tehničke, etičke, ekonomske i naučne prirode i stvaraju prepreke za široko prihvatanje farmakogenetike.

Ključna prepreka u primeni farmakogenetike je tehnička složenost genetičkog testiranja. Genetički testovi zahtevaju sofisticiranu opremu, obučeno osoblje i napredne bioinformatičke alate za interpretaciju ogromne količine podataka koji se generišu. Tačnost ovih testova takođe zavisi od kvaliteta genetičkog materijala koji je prikupljen, metode za analizu koja se koristi i stručnosti prilikom interpretacije rezultata. Među tehničkim izazovima je i potreba da se prate brzi napreci u tehnologijama genetičkih testiranja, što otežava mnogim zdravstvenim ustanovama da ostanu u toku sa najnovijim alatima i metodologijama. Osim toga, veliki izazov je i interpretacija poligenskih uticaja (gde više gena utiče na metabolizam lekova).

Farmakogenetičko testiranje izaziva značajna etička pitanja, posebno u vezi sa pristupom testiranju i genetičkom privatnošću. Pristup testiranju nije ravnomerno raspoređen među populacijama i regionima, pri čemu mnogi ljudi u siromašnim ili ruralnim oblastima imaju ograničen ili nikakav pristup genetičkim testovima. Time dolazi do stvaranja razlike u koristima koje farmakogenetika može doneti, što izaziva zabrinutost zbog nejednakosti u zdravstvenoj zaštiti. Zabrinutost u vezi sa genetičkom privatnošću i diskriminacijom je važna tema u debati o farmakogenetici. Pacijenti mogu biti nerado spremni da prođu testiranje zbog straha da bi njihovi genetički podaci mogli biti zloupotrebljeni od strane osiguravajućih kompanija ili poslodavaca.

Značajno ograničenje predstavlja i trošak farmakogenetičkog testiranja. Iako genetičko testiranje potencijalno može dovesti do dugoročnih ušteda sprečavanjem neželjenih reakcija na lekove i optimizacijom terapija, početni troškovi testiranja mogu biti previsoki. Za mnoge zdravstvene sisteme, posebno one u siromašnijim sredinama, visoka cena genetičkog testiranja ograničava njegovu dostupnost i integraciju u rutinsku praksu.

Među poteškoćama sa kojima se implementacija farmakogenetičkog testiranja suočava je i genetička varijabilnost među različitim populacijama. Mnoge farmakogenetičke studije fokusirale su se na određene populacije, uglavnom evropskog porekla, što dovodi do ograničenog razumevanja kako genetičke varijante utiču na odgovore na lekove kod drugih etničkih grupa. Nedovoljna zastupljenost različitih populacija u istraživanjima može rezultirati farmakogenetičkim smernicama koje su manje efikasne, ili čak štetne, kada se primene na pojedince iz nedovoljno zastupljenih populacija. Stoga je potrebno više istraživanja kako bi se razumela genetička varijabilnost i njen uticaj na farmakogenetiku u različitim svetskim populacijama.

Najveći izazov verovatno predstavlja nedostatak standardizovanih smernica za primenu farmakogenetičkog testiranja u kliničkoj praksi. Iako neki vodiči postoje, često su nedosledni ili nepotpuni, što dovodi do varijacija u tome kako se farmakogenetički testovi naručuju, interpretiraju i primenjuju u lečenju pacijenata. Ova nedoslednost ometa širu primenu farmakogenetičkog testiranja i može stvoriti konfuziju kod zdravstvenih radnika koji nisu sigurni kada i kako da koriste ove testove na efikasan način. Uspostavljanje standardizovanih, na dokazima zasnovanih smernica je od ključnog značaja kako bi se

osiguralo da se farmakogenetičko testiranje primenjuje dosledno i efikasno u različitim zdravstvenim okruženjima [110].

Tekuća farmakogenetička istraživanja u dečjoj ALL se fokusiraju na otkrivanje novih markera, terapijskih targeta i tehnoloških unapređenja. Stalno se identifikuju potencijalni genetički markeri, što povećava mogućnosti za primenu personalizovane terapije. Ciljanjem novih gena, zajedno sa već poznatim markerima kao što su *TPMT* i *NUDT15*, poboljšaće se efikasnost lekova i smanjiti nuspojave. Takođe se istražuju novi terapijski targeti, uključujući imunske kontrolne tačke i signalne puteve specifične za ALL, kako bi se razvile preciznije terapije.

Napredak u tehnologijama za editovanje gena, kao što je CRISPR-Cas9, ima potencijal da direktno modifikuje genetičke varijante povezane sa rezistencijom na lekove ili toksičnošću kod ALL-a. Ovi alati mogu omogućiti korekciju štetnih mutacija, nudeći trajnije rešenje za probleme sa neadekvatnim odgovorom na lekove. Kako se personalizovana medicina razvija, prilagođavanje terapija na osnovu individualnih genetičkih profila postaje sve preciznije, omogućavajući kliničarima da optimizuju terapijske režime za svakog pacijenta.

„Big data“ i veštačka inteligencija (AI eng. *artificial intelligence*) uvode revoluciju u istraživanja u farmakogenetici omogućavajući analizu ogromnih genetičkih baza podataka. AI alati mogu identifikovati obrasce i predvideti reakcije pacijenata na specifične lekove, ubrzavajući otkrivanje novih farmakogenetičkih markera i optimizaciju strategija lečenja u ALL-u.

Literatura

1. Roden DM, McLeod HL, Relling M V, Williams MS, Mensah GA, Peterson JF, et al. Pharmacogenomics. *Lancet*. 2019 Aug;394(10197):521–32.
2. Sary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S. Intensive Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia : Results of the Randomized Intercontinental Trial ALL IC-BFM 2002. 2013;
3. Orphanet: Acute lymphoblastic leukemia [Internet]. [cited 2022 Aug 29]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3732&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=ALL&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group_of_diseases=Acute-lymphoblastic-leukemia&title=Acute_lymphoblastic_leukemia&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=3732&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=ALL&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group_of_diseases=Acute-lymphoblastic-leukemia&title=Acute_lymphoblastic_leukemia&search=Disease_Search_Simple)
4. Janić D, Dokmanović L, Jovanović N, Skorić D, Lazić J. Treatment results of children with Acute Lymphoblastic Leukemia according to modified BFM protocol. *Srp Arh Celok Lek*. 2004;132(suppl. 1):17–22.
5. Williams LA, Richardson M, Marcotte EL, Poynter JN, Spector LG. Sex ratio among childhood cancers by single year of age. *Pediatr Blood Cancer*. 2019 Jun 28;66(6):e27620.
6. Roganovic J. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. In: Longo DL, editor. *Leukemia*. InTech; 2013. p. 4939–5015.
7. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017 76. 2017 Jun 30;7(6):e577–e577.
8. Chessells JM, Harrison G, Richards SM, Bailey CC, Hill FG, Gibson BE, et al. Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Arch Dis Child*. 2001 Oct;85(4):321–6.
9. Shah A, John BM, Sondhi V. Acute lymphoblastic leukemia with treatment-naïve Fanconi anemia. *Indian Pediatr*. 2013 May 8;50(5):508–10.
10. German J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997 Jan;93(1):100–6.
11. Schüz J, Erdmann F. Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview. *Arch Med Res*. 2016;47(8):607–14.
12. Sehgal S, Mujtaba S, Gupta D, Aggarwal R, Marwaha RK. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol*. 53(1):63–7.
13. Gérinière L, Bastion Y, Dumontet C, Salles G, Espinouse D, Coiffier B. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1994 May;5(5):437–40.

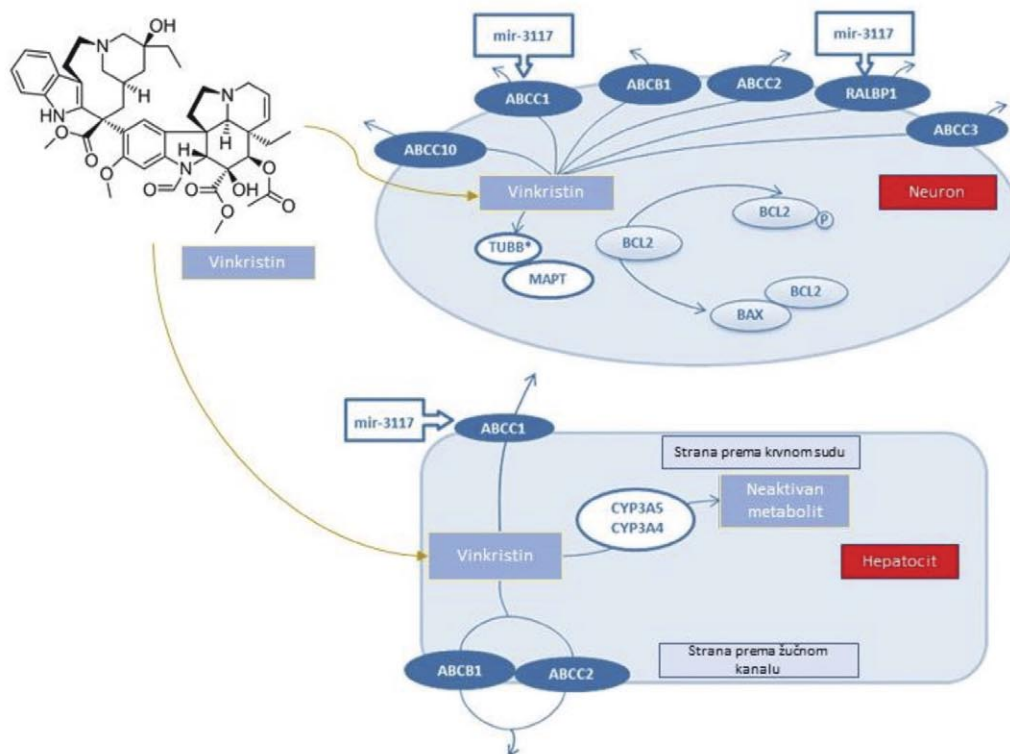
14. Marcotte EL, Spector LG, Mendes-de-Almeida DP, Nelson HH. The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening. *Front Pediatr*. 2021 Apr 23;9:188.
15. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1992 Apr;10(4):606–13.
16. Moorman A V, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia : results from the UK Medical Research Council ALL97 / 99 randomised trial. *Lancet Oncol*. 11(5):429–38.
17. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2015 Oct 15;373(16):1541–52.
18. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Progress through collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2938–48.
19. Micic D, Slavkovic B, Gvozdenovic NR, Kuzmanovic M, Dokmanovic L, Krstovski N, et al. History of treatment and long-term outcome in children with acute lymphoblastic leukaemia in Serbia. 2011;4:174–7.
20. ALL IC-BFM 2009. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia Final Version of Therapy Protocol from August-14-2009. 2015.
21. Maamari D, El-Khoury H, Saifi O, Muwakkit SA, Zgheib NK. Implementation of pharmacogenetics to individualize treatment regimens for children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmgenomics Pers Med*. 2020;13:295–317.
22. Gervasini G, Vagace JM. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. Vol. 3, *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media SA; 2012.
23. Mlakar V, Huezio-Diaz Curtis P, Satyanarayana Uppugunduri CR, Krajnovic M, Ansari M. Pharmacogenomics in Pediatric Oncology: Review of Gene-Drug Associations for Clinical Use. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 8;17(9).
24. Relling M V., Ramsey LB. Pharmacogenomics of acute lymphoid leukemia: new insights into treatment toxicity and efficacy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:126–30.
25. 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;10(3):191.
26. Gidding CEM, Kellie SJ, Kamps WA, De Graaf SSN. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999 Feb 1;29(3):267–87.
27. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(17):2816–26.
28. Lobert S, Vulevic B, Correia JJ. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: A comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry*. 1996 May 28;35(21):6806–14.
29. van de Velde ME, Kaspers GL, Abbink FCH, Wilhelm AJ, Ket JCF, van den Berg MH. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review. Vol. 114, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 114–30.
30. Moore A, Pinkerton R. Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Dec 15;53(7):1180–7.
31. van Schaik RHN. CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2008;11(3):77–98.
32. Lee SJ, Usmani KA, Chanas B, Ghanayem B, Xi T, Hodgson E, et al. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics*. 2003;13(8):461–72.
33. Egbelakin A, Ferguson MJ, MacGill EA, Lehmann AS, Topletz AR, Quinney SK, et al. Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Mar;56(3):361–7.
34. Ceppi F, Langlois-Pelletier C, Gagné V, Rousseau J, Ciolino C, Lorenzo S De, et al. Polymorphisms of the vincristine pathway and response to treatment in children with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2014 Jun 1;15(8):1105–16.
35. Hartman A, van Schaik RHNHN, van der Heiden IPP, Broekhuis MJJC, Meier M, den Boer MLL, et al. Polymorphisms in genes involved in vincristine pharmacokinetics or pharmacodynamics are not related to impaired motor performance in children with leukemia. *Leuk Res*. 2010 Feb;34(2):154–9.
36. Guilhaumou R, Solas C, Bourgarel-Rey V, Quaranta S, Rome A, Simon N, et al. Impact of plasma and intracellular exposure and CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 genetic polymorphisms on vincristine-induced neurotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Dec 4;68(6):1633–8.

37. Moore AS, Norris R, Price G, Nguyen T, Ni M, George R, et al. Vincristine pharmacodynamics and pharmacogenetics in children with cancer: a limited-sampling, population modelling approach. *J Paediatr Child Health*. 2011 Dec;47(12):875–82.
38. Ristivojevic B, Kotur N, Stankovic B, Gasic V, Lazic J, Pavlovic S, et al. The pharmacogenomics of vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Serbia - a single center experience. *Srp Arh Celok Lek*. 2022;150(1–2):53–8.
39. Diouf B, Crews KR, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2015 Feb 24;313(8):815–23.
40. Stock W, Diouf B, Crews KR, Pei D, Cheng C, Laumann K, et al. An Inherited Genetic Variant in CEP72 Promoter Predisposes to Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;101(3):391–5.
41. Wright GEB, Amstutz U, Drögemöller BI, Shih J, Rassekh SR, Hayden MR, et al. Pharmacogenomics of Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy Implicates Pharmacokinetic and Inherited Neuropathy Genes. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(2):402–10.
42. Gutierrez-Camino A, Martin-Guerrero I, Lopez-Lopez E, Echebarria-Barona A, Zabalza I, Ruiz I, et al. Lack of association of the CEP72 rs924607 TT genotype with vincristine-related peripheral neuropathy during the early phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment in a Spanish population. *Pharmacogenet Genomics*. 2016 Feb;26(2):100–2.
43. Zgheib NK, Ghanem KM, Tamim H, Aridi C, Shahine R, Tarek N, et al. Genetic polymorphisms in candidate genes are not associated with increased vincristine-related peripheral neuropathy in Arab children treated for acute childhood leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2018 Aug;28(8):189–95.
44. Rodríguez-Vicente AE, Lumbreras E, Hernández JM, Martín M, Calles A, Otín CL, et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. *Drug Metab Pers Ther*. 2016;31(1):25–34.
45. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Astigarraga I, Navajas A, Echebarria-Barona A, Garcia-Miguel P, et al. Vincristine pharmacokinetics pathway and neurotoxicity during early phases of treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2016 May 1;17(7):731–41.
46. Verrills NM, Po'uha ST, Liu MLM, Liaw TYE, Larsen MR, Ivery MT, et al. Alterations in γ -Actin and Tubulin-Targeted Drug Resistance in Childhood Leukemia. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2006 Oct 4;98(19):1363–74.
47. Gutierrez-Camino Á, Umerez M, Martin-Guerrero I, García de Andoin N, Santos B, Sastre A, et al. Mir-pharmacogenetics of Vincristine and peripheral neurotoxicity in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2018 Dec 27;18(6):704–12.
48. Winter SS, Ricci J, Luo L, Lovato DM, Khawaja HM, Serna-Gallegos T, et al. ATP Binding Cassette C1 (ABCC1/MRP1)-mediated drug efflux contributes to disease progression in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Health (Irvine Calif)*. 2013 May;5(5A):41–50.
49. Drake KJ, Singhal J, Yadav S, Nadkar A, Pungaliya C, Singhal SS, et al. RALBP1/RLIP76 mediates multidrug resistance. *Int J Oncol*. 2007 Jan;30(1):139–44.
50. Malaviya AN. Landmark papers on the discovery of methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases: a fascinating story. *Int J Rheum Dis*. 2016;19(9):844–51.
51. FARBER S, DIAMOND LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med*. 1948 Jun 3;238(23):787–93.
52. Kodidela S, Suresh Chandra P, Dubashi B. Pharmacogenetics of methotrexate in acute lymphoblastic leukaemia: Why still at the bench level? *Eur J Clin Pharmacol*. 2014;70(3):253–60.
53. Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Mar;26(1):153–81.
54. Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat*. 9(4–5):227–46.
55. Giletti A, Esperon P. Genetic markers in methotrexate treatments. *Pharmacogenomics J*. 2018;18(6):689–703.
56. Jagsi R, Jiang J, Momoh AO, Alderman A, Giordano SH, Buchholz TA, et al. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Lin*. 2017;263(2):219–27.
57. Sepe DM, McWilliams T, Chen J, Kershenbaum A, Zhao H, La M, et al. Germline genetic variation and treatment response on CCG-1891. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 May;58(5):695–700.
58. Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnott D, Labuda D, et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*. 2008;111(7):3692–700.

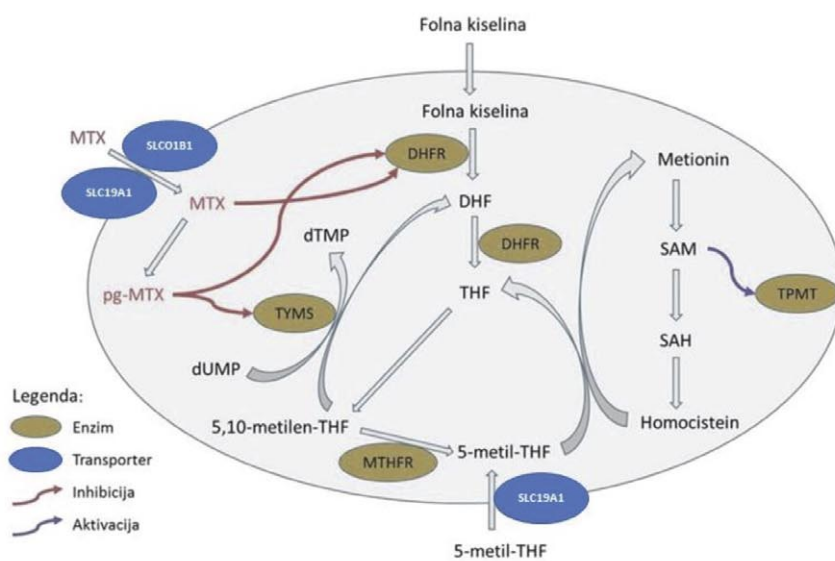
59. Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(6):374–80.
60. Liu SG, Gao C, Zhang RD, Zhao XX, Cui L, Li WJ, et al. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2017;8(23):37761–72.
61. Milosevic G, Kotur N, Lazic J, Krstovski N, Stankovic B, Zukic B, et al. Influence of variants in folate metabolism genes on 6-mercaptopurine induced toxicity during treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *J BUON*. 2019;24(5):2075–83.
62. 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 Jun 11;274(24):17159–63.
63. Oshiro C, Mangravite L, Klein T, Altman R. PharmGKB very important pharmacogene: SLC01B1. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Mar;20(3):211–6.
64. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Möricke A, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013 Jun 27;121(26):5145–53.
65. Ramsey LB, Bruun GH, Yang W, Trevino LR, Vattathil S, Scheet P, et al. Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLC01B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Res*. 2012 Jan 1;22(1):1–8.
66. Treviño LR, Shimasaki N, Yang W, Panetta JC, Cheng C, Pei D, et al. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5972–8.
67. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan MA, Sanchez De Toledo J, Garcia De Andoin N, Garcia-Miguel P, et al. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: A new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(2):53–61.
68. Fukushima H, Fukushima T, Sakai A, Suzuki R, Nakajima-Yamaguchi R, Kobayashi C, et al. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leuk Res Treatment*. 2013;2013:238528.
69. Giletti A, Vital M, Lorenzo M, Cardozo P, Borelli G, Gabus R, et al. Methotrexate pharmacogenetics in Uruguayan adults with hematological malignant diseases. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Nov 15;109:480–5.
70. Kotur N, Lazic J, Ristivojevic B, Stankovic B, Gasic V, Dokmanovic L, et al. Pharmacogenomic markers of methotrexate response in the consolidation phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment. *Genes (Basel)*. 2020;11(4):1–17.
71. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015 Jan 10;14:6.
72. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998 Jul;64(3):169–72.
73. Koppen IJN, Hermans FJR, Kaspers GJL. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010 Jan;148(1):3–14.
74. Lazic J, Kotur N, Krstovski N, Dokmanovic L, Zukic B, Predojevic-Samardzic J, et al. Importance of pharmacogenetic markers in the methylenetetrahydrofolate reductase gene during methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Arch Biol Sci*. 2017;69(2):239–46.
75. Leyva-Vázquez MA, Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Contreras-Quiroz A, Flores-Alfaro E, Illades-Aguilar B. Polymorphism G80A in the Reduced Folate Carrier Gene and its Relationship to Survival and Risk of Relapse in Acute Lymphoblastic Leukemia. <https://doi.org/10.2310/JIM0b013e31826803c1>. 2012 Oct 1;60(7):1064–7.
76. De Jonge R, Tissing WJE, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJL, Lindemans J, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2284–9.
77. Silva RMS, Fontes ACL, Silva KA, Sant’Ana TA, Ramos FJDC, Marques-Salles TDJ, et al. Polymorphisms involved in folate metabolism pathways and the risk of the development of childhood acute leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013 Feb 1;17(2):147–52.
78. Gregers J, Christensen IJ, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthoj S, et al. The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4671–7.
79. Lima A, Azevedo R, Sousa H, Seabra V, Medeiros R. Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2013;14(11):1337–51.
80. Lynch M, Scofield DG, Hong X. The evolution of transcription-initiation sites. *Mol Biol Evol*. 2005 Apr;22(4):1137–46.

81. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):4096–101.
82. Pullmann R, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Ladner RD, Gorospe M. Differential stability of thymidylate synthase 3'-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1. *J Biol Chem*. 2006 Aug 18;281(33):23456–63.
83. Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D, Jolivet J. Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem*. 1985 Aug 15;260(17):9720–6.
84. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2001;1(1):65–70.
85. Xu X, Gammon MD, Wetmur JG, Rao M, Gaudet MM, Teitelbaum SL, et al. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. *Am J Clin Nutr*. 2007 Apr;85(4):1098–102.
86. Bostrom B, Erdmann G. Cellular pharmacology of 6-mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1993 Feb;15(1):80–86.
87. 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 Mar 3;21(1):53–62.
88. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, et al. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*. 1996 Aug 23;273(5278):1109–11.
89. Inamochi H, Higashigawa M, Shimono Y, Nagata T, Cao DC, Mao XY, et al. Delayed cytotoxicity of 6-mercaptopurine is compatible with mitotic death caused by DNA damage due to incorporation of 6-thioguanine into DNA as 6-thioguanine nucleotide. *J Exp Clin Cancer Res*. 1999 Sep;18(3):417–24.
90. Christie NT, Drake S, Meyn RE, Nelson JA. 6-Thioguanine-induced DNA damage as a determinant of cytotoxicity in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. 1984 Sep;44(9):3665–71.
91. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertioni F. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochem Pharmacol*. 2010 May 1;79(9):1211–20.
92. Relling M V, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C-H, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Mar;89(3):387–91.
93. Liu C, Yang W, Pei D, Cheng C, Smith C, Landier W, et al. Genomewide Approach Validates Thiopurine Methyltransferase Activity Is a Monogenic Pharmacogenomic Trait. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 Mar 1;101(3):373–81.
94. Tamm R, Mägi R, Tremmel R, Winter S, Mihailov E, Smid A, et al. Polymorphic variation in TPMT is the principal determinant of TPMT phenotype: A meta-analysis of three genome-wide association studies. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 May 1;101(5):684–95.
95. Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucevic B, Tosic N, et al. Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit*. 2006 Dec;28(6):800–6.
96. Moyer AM. NUDT15: A bench to bedside success story. *Clin Biochem*. 2021;92(March):1–8.
97. Yang SK, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, et al. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet*. 2014;46(9):1017–20.
98. Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, et al. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015;171(1):109–15.
99. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2015 Apr 1;33(11):1235–42.
100. Moriyama T, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klusmann FA, Zhao X, et al. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nat Genet*. 2016 Apr 15;48(4):367–73.
101. Schaeffeler E, Jaeger SU, Klumpp V, Yang JJ, Igel S, Hinze L, et al. Impact of NUDT15 genetics on severe thiopurine-related hematotoxicity in patients with European ancestry. *Genet Med*. 2019;0(0).
102. Gerbek T, Ebbesen M, Nersting J, Frandsen TL, Appell ML, Schmiegelow K. Role of TPMT and ITPA variants in mercaptopurine disposition. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018 Mar 1;81(3):579–86.
103. Liu C, Janke LJ, Yang JJ, Evans WE, Schuetz JD, Relling M V. Differential effects of thiopurine methyltransferase (TPMT) and multidrug resistance-associated protein gene 4 (MRP4) on mercaptopurine toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 Aug 1;80(2):287–93.

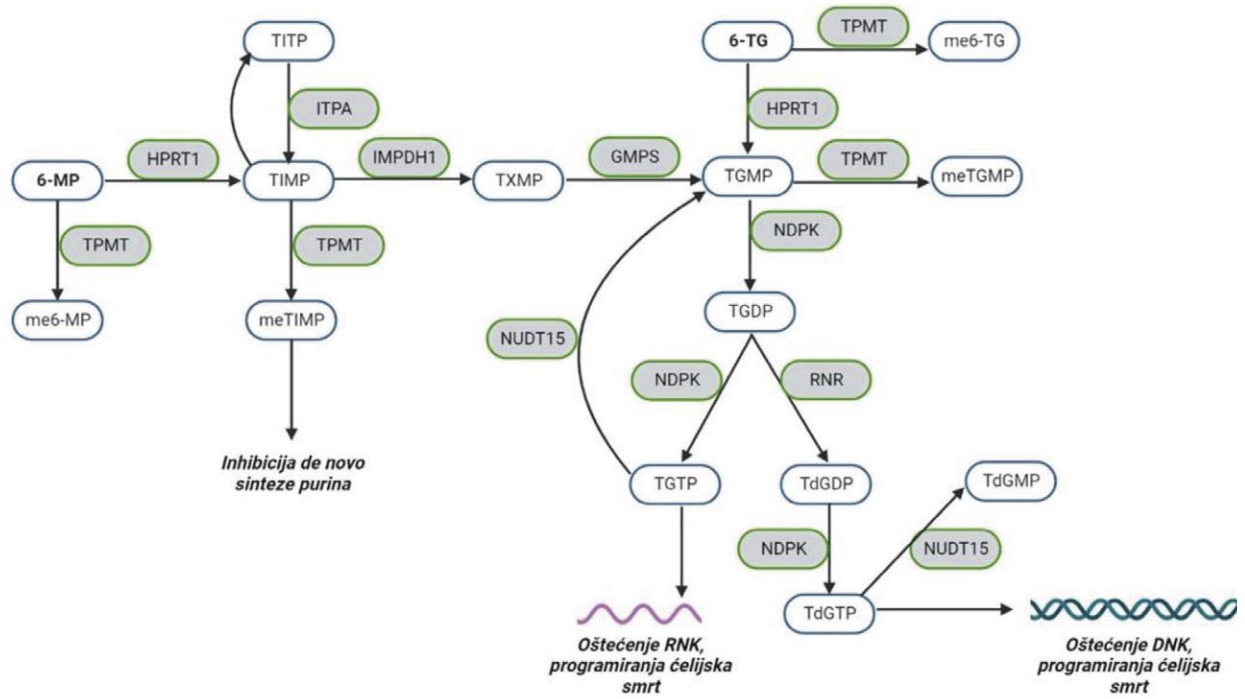
104. Tanaka Y, Manabe A, Fukushima H, Suzuki R, Nakadate H, Kondoh K, et al. Multidrug resistance protein 4 (MRP4) polymorphisms impact the 6-mercaptopurine dose tolerance during maintenance therapy in Japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2015 Aug 25;15(4):380–4.
105. Milosevic G, Kotur N, Krstovski N, Lazic J, Zukic B, Stankovic B, et al. Variants in TPMT, ITPA, ABCC4 and ABCB1 Genes as Predictors of 6-Mercaptopurine Induced Toxicity in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Med Biochem*. 2018 Jan 24;37(3):320–7.
106. Zhou H, Li L, Yang P, Yang L, Zheng JE, Zhou Y, et al. Optimal predictor for 6-mercaptopurine intolerance in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia: NUDT15, TPMT, or ITPA genetic variants? *BMC Cancer*. 2018 May 2;18(1).
107. Stocco G, Yang W, Crews KR, Thierfelder WE, Decorti G, Londero M, et al. PACSIN2 polymorphism influences TPMT activity and mercaptopurine-related gastrointestinal toxicity. *Hum Mol Genet*. 2012 Nov;21(21):4793–804.
108. Franca R, Stocco G, Favretto D, Giurici N, Del Rizzo I, Locatelli F, et al. PACSIN2 rs2413739 influence on thiopurine pharmacokinetics: validation studies in pediatric patients. *Pharmacogenomics J*. 2020 Jun;20(3):415–25.
109. Relling M V, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Dec 1;91(23):2001–8.
110. Klein ME, Parvez MM, Shin J-G. Clinical Implementation of Pharmacogenomics for Personalized Precision Medicine: Barriers and Solutions. *J Pharm Sci*. 2017 Sep;106(9):2368–79.



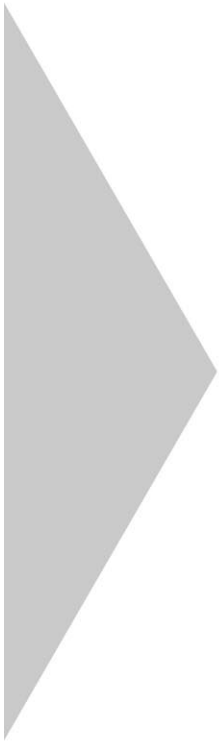
Slika 1. Sematski prikaz najvažnijih enzima, transportera i njihovih regulatora u predoženom vinkristinskom putu, preuzeto i modificirano iz: *Gutierrez-Camino A. et al, Pharmacogenomics J. 2018*



Slika 2. Šematski prikaz uloge metotreksata u folatnom metaboličkom putu, preuzeto i modificirano iz: *Kotur et al, Genes 2020.*



Slika 3. Sematski prikaz metaboličkog puta tiopurinskih lekova



MOLEKULARNA BIOLOGIJA BILJAKA

MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS



Neograničeni potencijal CRISPR/Cas9 tehnologije u biljnim naukama i poljoprivredi: ilustracija kroz primer mutageneze dva mala, visoko homologna biljna gena *DSS1*

Ivana Nikolić, Jelena Samardžić, Mira Milisavljević, Gordana Timotijević

Grupa za molekularnu biologiju biljaka, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: ivana.nikolic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Pronalaženje novih ćelijskih komponenti koje leže u osnovi molekularnih mehanizama odgovora biljaka na abiotički ili biotički stres može prosteći iz kombinacije genetičkih, biohemijskih i fizioloških pristupa. Mutageneza, kojom se deaktivira određeni gen, predstavlja ključnu strategiju u utvrđivanju uloge datog gena u određenim ćelijskim funkcijama. Kompleksnost biljnih genoma u poređenju sa životinjskim, prisustvo velikog broja genskih familija, kao i pseudogena naučnicima je oduvek predstavljao problem da uspešno generišu željene mutante. Revolucionarna CRISPR/Cas9 tehnologija donela je ogroman napredak na polju biljne mutageneze i istraživanja funkcije biljnih gena. Ovaj rad daje kratki pregled dosadašnjih znanja vezanih za primenu CRISPR/Cas9 tehnologije u biljnim funkcionalnim studijama, kao i u unapređenju ekonomski značajnih useva. Takođe, na primeru mutageneze dva mala, visoko homologna gena *DSS1* koji kodiraju prirodno neuređene proteine, biće prikazane mogućnosti i rešenja koje donosi ova savremena tehnologija kada su veličina gena i visoka identičnost sekvenci biljnih homologa ograničavajući faktori za mutagenezu. Između ostalog, ovde su predstavljeni mnogobrojni izazovi u izučavanju biljaka sa kojima smo se susreli prilikom CRISPR/Cas9 editovanja gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* vrste *Arabidopsis thaliana*, kao što su: prevazilaženje efekata *off-target* mutacija, pronalaženje efikasnih metoda za isporuku CRISPR/Cas9 kasete u biljne ćelije, kao i načina za brzo pretraživanje velikih kolekcija biljaka u potrazi za mutantnim biljkama sa željenim indelima.

Ključne reči: *DSS1(I)*, *DSS1(V)*, CRISPR/Cas9 tehnologija, *Arabidopsis thaliana*

The unlimited potential of CRISPR/Cas9 technology in plant sciences and agriculture: an illustration through the example of mutagenesis of two small, highly homologous plant *DSS1* genes

Ivana Nikolić, Jelena Samardžić, Mira Milisavljević, Gordana Timotijević

Group for Plant Molecular Biology, Institute of molecular genetics and genetic engineering, University of Belgrade

Correspondence: ivana.nikolic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

The search for new cellular components underlying the molecular mechanisms of plant response to abiotic or biotic stress can be accomplished through a combination of genetic, biochemical, and physiological approaches. Deactivating specific genes via mutagenesis is a key strategy for determining their roles in specific cell functions. Due to the complexity of plant genomes compared to animal genomes the presence of numerous gene families, and the presence of pseudogenes, generating desired mutants has always been challenging for scientists. The revolutionary CRISPR/Cas9 technology has brought tremendous progress in the field of plant mutagenesis and the study of plant gene functions. This study provides a brief overview of the current state of knowledge regarding the application of CRISPR/Cas9 technology in plant gene function research and the improvement of economically important crops. Also, the possibilities and solutions offered by this modern technology will be shown when gene size and high sequence identity of plant homologs are limiting factors in the example of mutagenesis of two small, highly homologous *DSS1* genes encoding intrinsically disordered proteins. Furthermore, we highlight challenges encountered during CRISPR/Cas9 editing of the *DSS1(I)* and *DSS1(V)* genes in *Arabidopsis thaliana*, including overcoming off-target effects, developing successful methods for transferring CRISPR/Cas9 cassettes into plant cells, and efficiently screening large plant collections for gene-edited plants with desired indels.

Keywords: *DSS1(I)*, *DSS1(V)*, CRISPR/Cas9 technology, *Arabidopsis thaliana*

Uvod

Otkrivanje i istraživanje novih ćelijskih faktora uključenih u percepciju i odgovor biljaka na stres je ključno ne samo za razumevanje načina na koji biljke kao sesilni organizmi preživljavaju nepovoljne sredinske uslove, već i za oplemenjivanje useva u cilju povećanja prinosa i otpornosti na stres. Biljke otporne na izazove životne sredine, dobijene savremenim metodama molekularnog oplemenjivanja, omogućavaju proizvodnju hrane na održiv način uz smanjenu upotrebu hemijskih pesticida i đubriva, što se direktno odražava i na zdravlje ljudi.

Kratki istorijski pregled metodologije za biljnu mutagenezu

Mutagenaza, uvođenje manjih ili većih promena u strukturu gena kojom se deaktivira određeni gen, predstavlja ključnu strategiju u potvrđivanju uloge datog gena u određenim ćelijskim funkcijama. Shodno tome, otkrivanje novih, efikasnijih pristupa za mutagenezu i transformaciju biljaka oduvek je predstavljao izazov i imperativ za naučnike.

Ubrzo nakon otkrića zračenja i hemikalija sa jakim mutagenim potencijalom, kraj XIX i prva polovina XX veka, obeleženi su prvim naporima da se generišu mutirane biljke primenom različitih fizičkih ili hemijskih agenasa [1, 2]. Ipak, tradicionalni koncept klasične genetike koji se bazira na primeni mutagenih agenasa i traganju za biljkama izmenjenog fenotipa je zbog svoje nasumične prirode, ali i štetnosti za ljude i okolinu uglavnom napušten nastupanjem ere molekularne genetike. Ipak, jedna metoda za nasumičnu mutagenezu, koja je značajno doprinela napretku biljne nauke je T-DNK inserciona mutagenaza. T-DNK je fragment DNK poreklom iz plazmida bakterija, poput *Agrobacterium tumefaciens*, koje izazivaju biljne tumore i može se prenositi sa bakterija na biljke i integrisati u biljni genom [3]. Ujedno, isporuka transgena posredovana ovom bakterijom učinila je T-DNK svestranim alatom za mutagenezu biljaka. Za istraživače u biljnim naukama velika prekretnica bilo je osnivanje ABCR (od eng. *Arabidopsis Biology Resource Center*) u Ohaju, 1991. gde se nalazi repozitorijum od preko 20 000 T-DNA insercionih mutanata Arabidopsisa, tj. kolekcija koja sadrži biljke sa mutacijama u gotovo svim genima u genomu. Naučnicima je pored semena raspoloživih za istraživanja osnovnih procesa postala dostupna i informacija o preciznoj poziciji T-DNK insercije. Iako je ABRC kolekcija insercionih mutanata značajno pomerila istraživanja u domenu ispitivanja funkcija biljnih gena, ipak T-DNK inserciona tehnologija ima i raznorazne nedostatke. Na primer, u mnogim genima razoreni su introni ili regulatorni regioni, čime se funkcija gena ne isključuje u potpunosti. U zavisnosti od pozicije insercije u genu zavisi i verodostojnost veze između datog gena i njegovog doprinosa određenom fenotipu. Pojava *knockout* tehnologija zasnovanih na disrupciji gena uvođenjem različitih inserata imala je takođe ozbiljna ograničenja u slučaju ispitivanja gena, koji pripadaju genskim familijama i koji se javljaju u većem broju kopija što je čest slučaj sa biljnim genima.

Otkriće PCR metode 1986. god. kao i mehanizma ciljanja gena homolognom rekombinacijom koja je indukovana dvolančanim prekidima, pružila su naučnicima veliki broj mogućnosti da razvijaju nove alate za preciznu i ciljanu mutagenezu gena. Kasnih devedesetih godina, razvijene su napredne metodologije za generisanje *knockdown* linija, u kojima su određeni geni utišavani. Metode za redukovanje ekspresije gena, koje su zasnovane ili na antisens RNK hibridizaciji ili na RNK interferenciji, tj. primeni kratkih komplementarnih oligonukleotida, čijim vezivanjem za target sekvencu dolazi do degradacije transkripta, primenjuvane su i na različite biljne sisteme. Zanimljivo je da je fenomen RNK intereferencije upravo otkriven u petuniji, prilikom pokušaja da se ova biljka transformiše tako da eksprimira više enzima odgovornog za biosintezu određenog pigmenta [4]. Međutim, *knockdown* strategije koje dovode do utišavanja gena, često nisu dovoljno učinkovite u istraživanjima, jer je utišavanje ekspresije ispitivanih gena kratkotrajnog karaktera.

Kraj devedesetih i rane dvehiljadite obeležile su dve inovativne tehnologije, koje su obezbedile značajan pomak u povećanju efikasnosti i preciznosti editovanja gena, a koje su se zasnivale na dizajniranju specifičnih DNK vezujućih motiva spojenih sa nukleazama kao što su ZFN (od eng. *zinc finger nuclease*) ili TALEN (od eng. *transcription activator like endonuclease nuclease*) koje omogućavaju generisanje *knockout* mutiranih linija. Biljni model organizmi, kao što su *Arabidopsis thaliana* i duvan su uspešno transformisani primenom ovakvih "programabilnih nukleaza" [5, 6], ali su i genomi komercijalno važnih vrsta kao što su soja, paradajz i pšenica takođe uspešno editovani ZFN i TALEN pristupima [7].

Stupanjem na scenu revolucionarne CRISPR/Cas9 tehnologije za mutagenezu 2012. godine otpočinje nova era u editovanju gena. Nakon što je 2020. god. dodeljena Nobelova nagrada za ovu, do sada najmoćniju i najpouzdaniju platformu za mutagenezu, usledila su njena brojna unapređenja, kao i proširenja primene van okvira mesto specifične mutagenize [8]. Ukratko, CRISPR/Cas9 tehnologija predstavlja sistem koji zahteva dve komponente: vodeću ili *guide* RNK (gRNK), komplementarnu ciljnoj sekvenci u kojoj želimo da izvršimo promenu i endonukleazu - kaspazu 9 (Cas9). gRNK vodi Cas9 do specifične lokacije u genu, a zatim Cas9 prepoznaje PAM protospeser - susedni motiv, tj. kratki NGG motiv koji se nalazi odmah nakon ciljne sekvence. Cas9 odmotava DNK lance, stvarajući dvolančani prekid, obično 3 ili 4 nukleotida uzvodno od PAM-a. U ovom trenutku otpočiju da deluju reparativni mehanizmi, koji pokušavaju da poprave oštećenu DNK, ali često ostavljaju malu inserciju ili deleciju na mestu prekida (indeli) [9]. U poređenju sa ranije uspostavljenim metodama zasnovanim na primeni nukleaza, CRISPR tehnologija ima veliki broj prednosti. CRISPR/Cas9 odlikuje visoka efikasnost zbog jednostavnog dizajna i sinteze gRNK. Dovoljna je samo promena vodeće RNK da bi se ciljano mutirale različite DNK sekvence, a moguće je uvesti i više genskih mutacija istovremeno (multipleksiranje) korišćenjem većeg broja gRNK. Takođe, ova metoda ima širok spektar primena, uključujući uvođenje gena (*knockin*), prekomerno ekspimiranje gena inkorporiranjem transkripcionog aktivatora, editovanje epigenoma, itd. Ova vrlo dinamična i fleksibilna metodologija, široke primene, prvi put je upotrebljena još 2013. za modifikaciju genoma model biljka *Arabidopsis* i *Nicotiana* [10, 11]. Osim toga, CRISPR/Cas9 se od 2016. uspešno primenjuje i za modifikovanje genoma gajenih biljaka kao što su pirinač, soja, pšenica i kukuruz. Primenom CRISPR/Cas9 tehnologije u poljoprivredi su značajno poboljšana svojstva useva, kao što su: povećanje prinosa putem uvećanja zrna pirinča [12], poboljšanje kvaliteta useva disrupcijom gena za sintezu glutena kod pšenice [13] i unapređenje otpornosti prema različitim bolestima i patogenima kao što je slučaj sa pirinčem otpornim na bakteriju *Xantomonas* [14], itd.

Iako CRISPR/Cas tehnologija otvara mnogobrojne mogućnosti za unapređenje ekonomski značajnih biljaka i prevazilaženje problema savremenog društva, kao što je nestašica hrane usled ubrzanog povećanje svetske populacije, intezivnih klimatskih promena i vremenskih ekstrema, javnost je ipak i dalje uzdržana ili zabrinuta oko upotrebe CRISPR/Cas9 sistema u ove svrhe, jer ga izjednačava sa metodološkim postupcima koji se primenjuju za dobijanje genetički modifikovanih biljaka.

Biljni *DSS1* geni i strategija ciljane mutagenize CRISPR/Cas9 tehnologijom

Odnosi između živih organizama i neživih faktora sredine odigravaju se po principu visoko sinhronizovanih, regulisanih i balansiranih prirodnih procesa. Kada faktori sredine postanu ekstremni, dolazi do narušavanja ravnoteže i takvi efekti imaju štetan uticaj na živi svet. Iako su biljke sesilni organizmi, veoma su uspešno adaptirane na promene iz svog prirodnog okruženja i te adaptacije su uočljive na biohemijskom, fiziološkom i morfološkom nivou. Ipak, različiti nepovoljni uticaji sredine (faktori sredinskog stresa) izazivaju poremećaje u funkcionisanju biljnih ćelija [15]. Glavni uzrok narušavanja ćelijske homeostaze je povećano

stvaranje i akumuliranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) što dovodi do pojave oksidativnog stresa [16]. Da bi se izborile sa oksidativnim stresom izazvanim dejstvom nepovoljnih abiotičkih i biotičkih faktora biljke su razvile snažne i kompleksne antioksidativne sisteme zaštite [17].

Bitnu ulogu u pružanju adekvatnog odgovora biljaka na stres imaju i proteini iz velike porodice prirodno neuređenih proteina (eng. IDP - *intrinsically disordered protein*). Kada su deo signalnih kaskada koje se pokreću kao odgovor na spoljašnje stimulse, IDP imaju ulogu integratora. U abiotičkom stresu IDP imaju i funkciju u mehaničkoj zaštiti važnih ćelijskih struktura, slično proteinskim šaperonima. Za IDP je karakteristično da nemaju definisanu trodimenzionalnu strukturu u formi samostalnog proteina, a zadobijaju je tek nakon interakcije sa odgovarajućim partner proteinima u različitim biološkim kompleksima [18].

Predstavnik ove familije, protein DSS1 (od eng. *deletion of split hand/split foot 1*) je multifunkcionalni protein koji interagujući sa komponentama mnogobrojnih proteinskih kompleksa učestvuje u različitim biološkim procesima. Humani DSS1, ili drugačije SHFM1 (od eng. *split hand/split foot malformation type 1*), identifikovan je tokom karakterizacije razvojnog poremećaja ektradaktilije, odnosno malformacije kod koje dolazi do odsustva ili fuzije pojedinih prstiju šake i stopala [19]. DSS1 je mali, izuzetno kiseo, visoko konzervisan protein. Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju da DSS1 svoje funkcije ostvaruje na nivou protein-protein i protein-DNK interakcija čime obezbeđuje stabilizaciju proteinskih kompleksa [20-22]. On učestvuje u formiranju kompleksa uključenih u raznovrsne biološke mehanizme, kao što su: popravka DNK posredovana homolognom rekombinacijom, degradacija proteina putem 26S proteazoma, eksport i procesuiranje pre-iRNK kao deo TREX-2 kompleksa, itd. [20, 22]. Takođe, DSS1 ima veoma važnu ulogu u odgovoru na oksidativni stres, tako što specifično prepoznaje proteine oštećene oksidacijom, obeležava ih i dalje usmerava u proces degradacije kroz ubikvitin-proteazni sistem [23]. Prema malobrojnim podacima iz literature poznato je da biljni DSS1 doprinosi pravilnom funkcionisanju BRCA2 kompleksa u homolognoj rekombinaciji, stabilnosti kompleksa TREX-2 i 26S proteazoma, kao i u uspostavljanju njihove fizičke veze. Takođe, tek je u novijim istraživanjima pokazana potencijalna uloga biljnog proteina DSS1 u odbrani od oksidativnog stresa, održanju proteinske homeostaze i očuvanju genetičke informacije [24-27]. U radovima Nikolić i saradnici [24-27] su metodama reverzne genetike utvrđene posledice isključivanja gena DSS1 na fenotip biljaka i analizirana osetljivost mutanata na oksidativni stres. U tu svrhu su korišćeni T-DNK insercioni i CRISPR/Cas9 mutanti.

U genomu *A. thaliana* su na hromozomima I i V identifikovana dva visoko homologna gena, *DSS1(I)* (pristupni br. AT1G64750) i *DSS1(V)* (pristupni br. AT5G45010) [28]. U cilju funkcionalne karakterizacije izoformi DSS1 u *A. thaliana*, korišćeni su komercijalno dostupni T-DNK insercioni mutanti. Povratnim ukrštanjem dobijene su dve homozigotne linije od kojih je jedna sadržavala inserciju u 5' regulatornom regionu gena *DSS1(I)*, dok je druga imala razoren deo introna gena *DSS1(V)*. Dok u *dss1(I)* mutiranoj liniji biljaka nije bila narušena ekspresija gena, u *dss1(V)* ekspresija je bila značajno redukovana [24, 27]. Iako je dalje detaljno fenotipski okarakterisana *knockdown dss1(V)* linija, ipak je bilo neophodno pronaći alternativni pristup za generisanje mutanata, jer je cilj naših istraživanja bio utvrđivanje biološkog smisla postojanja dve izoforme proteina DSS1, odnosno rasvetljavanje njihove potencijalne različite funkcije u biljnim ćelijama. Za efikasniju i precizniju mutagenezu kojim bi oba gena bila uspešno isključena, upotrebljena je CRISPR/Cas9 tehnologija. Međutim, kako su skoro identične i izuzetno kratke sekvence gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)* *A. thaliana*, ciljana mutageneza gena *DSS1* je predstavljala tehnički izazov čak i prilikom primene savremene CRISPR/Cas9 tehnologije.

Tehnički izazovi tokom primene CRISPR/Cas9 ciljane mutageneze visoko homolognih biljnih gena *DSS1*

Promene u genomu semenih zametaka, a pre prve deobe ćelija embriona, koje izvrši CRISPR/Cas9 sistem odmah nakon infekcije *A. tumefaciens* (generacija T0) se mogu detektovati u narednoj generaciji (generacija T1). U T1 generaciji se uglavnom mogu detektovati mozaične i *wild-type* (WT) biljke. Mozaične biljke imaju različite modifikacije gena u ciljnim mestima, a u različitim delovima iste biljke. U T2 generaciji mogući ishodi mutageneze su generisanje: homozigotnih, heterozigotnih, bialelnih, mozaičnih i WT biljaka, koje su Cas9 pozitivne [29]. U narednim generacijama mutacije se u većini slučajeva prenose po klasičnom Mendelovom pravilu, dok mozaici pokazuju složenije obrasce nasleđivanja. U T3 generaciji je većina biljaka Cas9 negativna, što je rezultat procesa segregiranja Cas9-gRNA kasete tokom favorizovanja modifikacija u ciljnim genima [29]. Najređi i najpoželjniji ishod je generisanje homozigotnih mutanata već u T1 generaciji što je jedino postignuto kada je korišćena metoda transformacije embriogenog kalusa [30-32]. Slabija uspešnost CRISPR/Cas9 sistema na početku njegove primene je bila posledica snižene aktivnosti konstitutivnog promotora mozaičnog virusa karfiola 35S (*CaMV 35S*) u fazi jednoćelijskog embriona [33]. U molekularnoj biologiji biljaka, za ekspresiju transgena najčešće je korišćen snažni, konstitutivno ekspimiran *CaMV 35S* promotor te je primenjen i za dizajniranje CRISPR/Cas9 mašinerije [34]. Međutim, ovakav tip promotora u kasnijim fazama razvića biljaka obezbeđuje ekspresiju Cas9 proteina u svim tkivima, tako da je veća šansa nastanka mozaika i samim tim teža detekcija mutacija i praćenje promene fenotipa [33]. Da bi se prevazišla pojava mozaicizma kod editovanih biljaka, Wang i saradnici su razvili inovativni tkivno-specifični promotor za ekspresiju Cas9 i editovanje genoma isključivo u jajnim ćelijama (*Egg-cell-specific promoter*) [33]. Tokom pomenute studije autori su upoređivali kombinaciju 8 promotorskih sekvenci i 2 terminatora koja kontolišu ekspresiju CRISPR/Cas9 kasete. Efikasnost fuzije pojačivač/promotor je potvrđena generisanjem mutacija u čak tri gena istovremeno. Takođe je uočeno da CRISPR/Cas9 funkcioniše ne samo na nivou semenog zametka, već i u fazi jednoćelijskog i ranog embriona, što se pripisuje stabilnosti transkripta i proteina Cas9 [33]. Ova strategija skraćuje vreme neophodno za produkciju biljnih mutanata kroz dve ili tri generacije, čime se postiže brži i isplativiji pristup generisanja nove populacije mutanata *A. thaliana* za jedan ili više gena. Treba napomenuti da, pored promotorskih sekvenci, važnu ulogu u stabilnosti transkripta *Cas9* ima i terminatorska sekvenca *rbcS E9* [24, 33]. Optimizovana kombinacija fuzionisanih promotora i terminatora je u velikoj meri poboljšava efikasnost dobijanja mutacija u ciljnim genima, povećava šansu dobijanja mutacija u linijama semenog zametka, uz izbegavanje ili smanjivanje broja somatskih mutacija, a takođe i smanjuje verovatnoću kreiranja *off-target-a*.

U okviru naših istraživanja u cilju rasvetljavanja potencijalnih razlika u funkcijama dva visoko homologna gena *DSS1(I)* i *DSS1(V)*, bilo je potrebno generisati *knockout* mutante biljaka *A. thaliana*. Dizajnirane su pojedinačne gRNK sekvence za editovanje koje sadrže sekvence ciljnog gena komplementarne delu 5'-kraja prvog egzona gena i koje su specifične za pojedinačne izoforme *DSS1* (Slika 1A). Sintetisani oligonukleotidi gRNK-*DSS1(I)* i gRNK-*DSS1(V)* su pojedinačno uklonirani u CRISPR/Cas9 kasetu u okviru binarnog vektora pHEE401E i stavljeni pod jak promotor *U6-26p* (U6 promotor za vezivanje RNK polimeraze III) (Slika 1B). U okviru CRISPR/Cas9 kasete se nalazi fuzionisani promotor i pojačivač koji kontolišu tkivno-specifičnu ekspresiju Cas9 proteina u ćelijama semenih zametaka (na eng. *egg-cell-specific promoter/enhancer*, *EC1.2en/EC1.1p*) u kombinaciji sa terminatorom *rbcS E9* (od eng. *the pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit E9 terminator*) (Slika 1B). Koristeći ovakav unapređen sistem za editovanje, u narednoj T1 generaciji dobijeni su heterozigotni mutanti za obe varijante gena *DSS1*.

Efikasnost i izazovi metode *Agrobacterium*-posredovane *floral dip* metode u kreiranju transgenih *dss1* mutanata

Za razliku od transformacije direktnim injektiranjem RNK koja nosi informaciju za CRISPR/Cas9 sistem u humane ili životinjske ćelije, kod biljaka ovaj pristup nije primenljiv zbog prisustva ćelijskog zida. Izuzetak je metoda transformacije embriogenog kalusa, koja se može smatrati analognom transformaciji jednoćelijskih embriona životinja. Međutim, u eksperimentima na paradajzu i kukuruзу je pokazano da je primenom ove tehnike moguće stvoriti mozaične mutantne biljke za ciljni gen ili gene, što samim tim komplikuje nalaženje potencijalnih homozigotnih mutanata, čak i kroz veći broj generacija [30, 32]. Iz tog razloga, u svrhu izvođenja CRISPR/Cas9 editovanja, generisanje biljnih transgenih linija se vrši alternativnim metodama. Upravo, *Agrobacterium*-posredovana transformacija je metoda izbora za dobijanje transgenih biljaka sa pomenutim ciljem, ali i ovde postoji više različitih eksperimentalnih pristupa. Jedan od najčešće primenjivanih je *in vitro* transformacija koja se vrši na kulturi tkiva i podrazumeva regeneraciju biljaka iz same kulture. Nedostatak ove metode je upravo regeneracija iz somatskih ćelija i nemogućnost dobijanja uniformnih transformacija svake ćelije jedne biljke. Procedura *in vitro* transformacije i regeneracije je zahtevna, duga i neophodno je optimizovati ne samo za različite biljne vrste, već i za različite ekotipove i sorte iste vrste [35]. Jednostavniji, brži i jeftiniji pristup *Agrobacterium*-posredovane transformacije *A. thaliana* je *floral dip* metoda.

Upravo ovom metodom su dobijeni CRISPR/Cas9 mutanti *dss1* (Slika 2) [24, 26]. *Floral dip* metoda se zasniva na potapanju zatvorenih mladih cvetnih delova biljke u suspeziју *Agrobacterium tumefaciens* sa jakim surfaktantom Silwet-77. Surfaktant obezbeđuje infekciju i transfer DNK (u našem slučaju CRISPR/Cas9 kasete) uglavnom u ovule, ali ne i u polen [36]. Nakon fertilizacije, zigot sa ugrađenom DNK daje transgeni embrion, a nakon klijanja i transgenu biljku [37]. Iako je integracija strane DNK nasumičan proces, konstantovano je da ređe dolazi do ugradnje ovih sekvenci u heterohromatinske regione genoma, centromere i gene za rRNK, što rezultuje češćom pojavom integracije DNK u transkripcione aktivne regione [38]. Tokom generisanja CRISPR/Cas9 mutanata *dss1* detektovana učestalost transformacije je iznosila 0,4 - 0,8% [24, 26]. Dodatna tehnička prepreka u postizanju visoke efikasnosti *floral dip* transformacije proizilazi iz zahteva da se metoda izvrši na zatvorenim cvetovima pre nego što dođe do samooprašivanja, pri čemu cvetne strukture predstavljaju fizičku barijeru i ometaju direktan kontakt između bakterija i ciljnih ćelija [39]. Takođe, imunski odgovor biljaka na patogene može ograničiti efikasnost unosa T-DNK [40]. Iz tih razloga, preporuka je da se transformacija na istim biljkama ponovi nakon par dana kako bi se povećala verovatnoća uspešne transformacije [41]. Kako se cvetovi i ovule nalaze u različitim fazama razvića, ponavljanje transformacije povećava verovatnoću da će neki cvetovi biti u optimalnoj fazi za infekciju [39]. Ponavljanjem postupka se produžava kontakt između *Agrobacterium* i tkiva cveta, što povećava šansu za unos DNK [41]. Iako ova metoda ima nisku frekvenciju insercije željene DNK u genom, podesna je za rutinsku transformaciju, jer zahteva manje vremena što kod vrsta poput *A. thaliana* rezultira velikim prinosom semena.

Strategije pretraživanja CRISPR/Cas9 biljnih mutanata *dss1* kroz generacije

Pristupi koji se koriste za detektovanje gRNK/Cas9 indukovane modifikacije željenih gena su u izvesnoj meri određeni kvalitetom dizajna sekvence gRNK. Dizajn gRNK za mutagenezu dupliranih gena sa skoro identičnim, ekstremno kratkim sekvencama i funkcionalnom redundantnošću, kao što su ispitivane varijante *DSS1* gena, bio je veliki izazov. Kako bismo dizajnirali odgovarajuće visokokvalitetne sekvence gRNA, bilo je neophodno da ispunimo nekoliko važnih zahteva. Naime, gRNK je morala da bude locirana u kodirajućem regionu što bliže 5'-kraju gena kako bi se uveo dvolančani prekid na samom početku gena, zatim da sadrži

odgovarajuću sekvencu susednog motiva protospesjera (PAM) za prepoznavanje Cas9 i da sadrži specifična restrikciona mesta na poziciji očekivane mutacije, radi sprovođenja brzog skrininga restrikcijom analizom. Nekodirajuća gRNK formira kompleks sa Cas9 proteinom i navodi ga da izvrši dvolančani prekid u komplementarnoj sekvenci DNK u genomu semenih zametaka T0 generacije *A.thaliana* (Slika 2). Mutacije koje nastaju popravkom dvolančanih prekida DNK su uglavnom promene na nivou jednog baznog para insercije/delecije. Drugi tipovi mutacija koji se događaju sa manjom učestalošću su delecije manje od 20 bp [33].

U radu Nikolić i saradnici [24, 26] je opisana prva faza skrininga semena T0 generacije koja su selektovana na osnovu rezistencije na antibiotik gajenjem na hranljivim podlogama sa higromicinom [42] (Slika 2). Sve odabrane biljke T1 generacije su higromicin rezistentne, sadržavale su funkcionalnu CRISPR/Cas9 kasetu budući da se kasete i gen za antibiotsku rezistenciju nalaze na istoj plazmidnoj DNK. Dalja genotipizacija biljaka T1 generacije u cilju pronalaženja heterozigotnih nosilaca mutacija u genima *DSS1(I)* i *DSS1(V)* (Slika 2) je sprovedena korišćenjem tri najčešće primenjivane strategije koje se razlikuju po uspešnosti, pristupačnosti i zahtevima za resursima: analiza dužine PCR fragmenta, restrikcijom analiza PCR proizvoda i PCR visoke rezolucije topljenja (HRM) (Slika 3). Prvi, opšte poznati pristup podrazumeva identifikaciju PCR fragmenata koji usled uvedenih indela, par desetina nukleotida dugih, odstupaju od WT fragmenata (Slika 3A). Međutim ovaj pristup je slabo efikasan jer su ovako veliki indeli ipak retki u CRISPR mutagenesi. Princip restrikcijom analize PCR proizvoda se zasniva na korišćenju specifičnog enzima, čije mesto sečenja se preklapa sa očekivanim indelom, 3 do 4 nt uzvodno od PAM sekvence, te ukoliko dođe do uspešne disrupcije tj. uvođenja indela, digestija izostaje (Slika 3B). Jedine gRNA komplementarne *DSS1* genima, koje su zadovoljavale kriterijum specifičnosti, nisu u sebi sadržavale restrikcijom mesto, već je najbliže mesto digestije padalo nizvodno od mesta očekivanog indela, i to u okviru PAM sekvence. Očekivano je da u ovom slučaju, restrikcijom analiza ne bude previše efikasan način skrininga, jer je verovatno da kaspaza greškom izmeni i region PAM veoma mala, ali ne i nemoguća. Treći pristup za detektovanje i identifikaciju malih promena u sekvencama, kao što su mikroindeli od 1 nt ili čak supstitucije je HRM metoda (od eng. *High resolution melting PCR*), koja je zahtevna jer je za izvođenje neophodna specifična aparatura, softver, kao i specifična PCR hemija. HRM se zasniva na praćenju denaturacije fluorescentno obeleženog dvolančanog PCR fragmeta. Nakon amplifikacije, uzorak se postepeno zagreva, kako temperatura raste, dvolančana DNK se denaturiše pri čemu se intenzitet fluorescencije menja usled oslobađanja boja vezanih za dvolančanu DNK. Dobijena kriva topljenja predstavlja postepenu disocijaciju lanaca DNK (Slika 3C). HRM analiza omogućava otkrivanje malih razlika u krivama topljenja različitih fragmenata. Softver normalizuje i analizira signale, omogućavajući otkrivanje suptilnih razlika u profilima topljenja, koje se odražavaju u obliku krivih topljenja na osnovu čega se vrši diskriminacija sekvenci.

Za pretraživanje prve serije biljaka koje su potencijalni nosioci mutacija u genu *DSS1(I)*, odnosno *DSS1(V)*, sprovedena je PCR analiza pomoću prajmera koji umnožavaju produkte koji obuhvataju potencijalna mesta promena. Od velikog broja analiziranih kandidata za gen *DSS1(I)*, detektovan je samo jedan PCR produkt koji je kraći za 25 nt u odnosu na WT i koji je označen kao *dss1(I).19* (Slika 3A). Takođe, kao proizvod PCR umnožavanja uz upotrebu prajmera specifičnih za *DSS1(V)*, u biljci *dss1(V).20* detektovan je umnožak koji je bio 18 nt duži u odnosu na WT (Slika 3A). Potraga za dodatnim mutantima vršena je restrikcijom analizom PCR umnožaka korišćenjem Bsp143I enzima na nekoliko desetina kandidata, i u potomstvu higromicin-rezistentnih biljaka CRISPR/Cas9-*DSS1(V)* je pokazano da postoje amplikoni koji su izgubili restrikcijom mesto za Bsp143I i stoga ih je moguće identifikovati na gel elektroforezi (Slika 3B). U sledećoj fazi, radi preciznog potvrđivanja mutiranih sekvenci ili pronalaženje novih mutiranih linija primenjena je HRM metoda. U ovoj analizi korišćeni

su insert-specifični prajmeri dizajnirani za umnožavanje kratkih fragmenata (oko 100 bp). HRM metodom je identifikovana još jedna mutirana biljka i potvrđena je heterozigotnost u *dss1(l).19* i *dss1(v).15* (Slika 3C). Biljku *dss1(l).7* analizom PCR fragmenata nije bilo moguće detektovati, s obzirom na to da nije izgubila restrikciono mesto za Bsp143I i nije se razlikovala od WT kontrole na gel elektroforezi (Slika 3A i B). Nesečeni PCR proizvod koji je detektovan u biljci sa oznakom *dss1(v).15*, imao je takođe promenjen profil krive topljenja DNK u odnosu na WT sekvencu (Slika 3C). PCR umnošci sa različitim krivama topljenja u odnosu na WT krive topljenja su dalje analizirani sekvenciranjem. Naše analize pokazuju da su se sva tri pristupa za pretraživanje mutanata u ovom kompleksnom slučaju pokazala svrsishodnim.

Sekvenciranje je dalo finalnu potvrdu da su kandidati T1 generacije biljaka: *dss1(l).7*, *dss1(l).19*, *dss1(v).15* i *dss1(v).20*, nosioci mutacija u heterozigotnom stanju (Slika 2, 3C). Biljka *dss1(l).7* sadrži inserciju jednog nukleotida na poziciji tri nukleotida uzvodno od PAM mesta, dok je u biljci *dss1(l).19* došlo do delecije 25 nt u sekvenci *DSS1(l)* (Slika 4A). Za mutanta *dss1(v).15* je ustanovljeno da ima nekoliko promena u sekvenci: inserciju od jednog nukleotida i dve delecije od četiri nukleotida i dva nukleotida, od kojih je druga locirana u PAM regionu. Biljka *dss1(v).20* sadrži tri insercije u genu *DSS1(v)*, odnosno ukupno 18 dodatno ugrađenih nukleotida (+5 nt, +6 nt i +7 nt) (Slika 4B).

U narednom setu eksperimenata odabrane su dve linije mutanta sa velikim promenama u genima koje se jednostavno detektuju genotipizacijom. Nakon kontrolisanog oprašivanja odabranih biljaka T1 generacije, među biljkama T2 generacije dobijene su dve homozigotne linije mutanata – jedna linija koja sadrži deleciju dužine 25 nt na oba alela gena *DSS1(l)* i druga linija sa insercijom od 18 nt na oba alela gena *DSS1(v)*. Analizom izvedene aminokiselinske sekvence je pokazano da CRISPR/Cas9-indukovane mutacije u odabranim linijama biljaka rezultuju formiranjem preuranjenog stop kodona, tj. okrnjenim proteinskim produktom.

Analiza fenotipskih karakteristika CRISPR/Cas9 mutanata za gene *DSS1* i njihove osetljivosti na oksidativni stres

U daljem radu biljke sa CRISPR-indukovanim mutacijama u visoko homolognim genima *DSS1(l)* i *DSS1(v)* su morfološki okarakterisane kako bi se utvrdilo da li ovi geni utiču na stvaranje specifičnog fenotipa biljaka [24, 26]. Na osnovu poređenja fenotipova mutanata i WT biljaka uočeno je da mutirane *dss1(v).20* biljke imaju ubrzano razviće, viši rast i intenzivnije grananje u odnosu na mutante *dss1(l).19* i WT biljke. Ubrzano razviće ove linije mutanata se ogledalo kroz nagli rast, preuranjeno sazrevanje i pucanje čaura, kao i oslobađanje semena. Ovakva dinamika razvića *dss1(v).20* biljaka se objašnjava neadekvatnim odgovorom na fitohormone usled izostanka pretpostavljene interakcije između proteina EER5 (od eng. *enhanced ethylene response 5 protein*) i *DSS1(v)*. *In silico* predikcije su pokazale da je *DSS1(v)* direktan partner proteinu EER5, koji je deo jezgra TREX-2 kompleksa i učestvuje u negativnoj regulaciji odgovora na etilen [26, 43, 44]. Primećeno je da se razgranati fenotip *dss1(v).20* podudara sa *brca2* mutantom *A. thaliana* [45] što nije iznenađujuće s obzirom na već pomenuto učešće proteina *DSS1* u homolognoj rekombinaciji gde formira kompleksa sa *BRCA2* proteinom. Nasuprot *dss1(v).20*, biljke *dss1(l).19* imaju rozete manjeg prečnika i kraće stabljike. Takođe je uočeno da mutanti *dss1(l).19* proizvode čaure sa samo par razvijenih semena, što se može povezati sa narušenom funkcijom *BRCA2* kompleksa usled izostanka interakcije *DSS1(l)* i proteina *BRCA2*, što ometa proces homologne rekombinacije u mejozi tokom reproduktivne faze *A. thaliana*.

U pokušaju dobijanja duplih *dss1* mutanata, ukrštene su *dss1(l).19* i *dss1(v).20* linije *A. thaliana* i među stotinak testiranih biljaka nije detektovano prisustvo *dss1(l)^{-/-}dss1(v)^{-/-}* genotipa [24, 26]. Očigledno, istovremeni izostanak obe izoforme *DSS1* utiče na vijabilnost biljke i ima letalni efekat.

Da bi se pokazala uloga ovih gena u oksidativnom stresu, analizirana je osetljivosti mutiranih biljaka starih 14 dana na tretmane vodonik-peroksidom. Uočeno je da u poređenju sa WT biljkama mutanti imaju smanjenu stopu preživljavanja kao i povećanu osetljivost na stres koja se ogleda u povišenom nivou markera oksidativnog stresa – malondialdehida. Velika zastupljenost oksidovanih proteina je detektovana kod obe mutirane linije, ali je u *dss1(V).20* biljkama ona bila značajno veća nego u *dss1(l).19* i WT biljkama. Rezultati ukazuju da nedostatak proteina DSS1(V) uslovljava povećanu akumulaciju oksidovanih proteina i njihovo neefikasno uklanjanje, dok disrupcija gena *DSS1(l)* ima manji efekat na ovaj proces [24, 26].

Zanimljivo je istaći da je primećeno postojanje značajne morfološke razlike između testiranih T-DNK insercionih i CRISPR/Cas9 mutanata *A. thaliana* za gen *DSS1(V)* (Slika 5) [24, 26, 27]. U odnosu na razvijenije odrasle CRISPR/Cas9 *knockout dss1(V).20* biljke, čija rozeta je žbunasta i sa brojnim izdancima, *t-dss1(V) knockdown* mutanti su imali zakržljali rast i poleglo stablo. Pretpostavljamo da je zbog T-DNK insercije u okviru intronske sekvence koja potencijalno sadrži regulatorne elemente moglo doći do narušavanja ekspresije i drugih gena koji su ovim elementima regulisani, a koji regulišu procese razvića. Pomenuti regulatorni elementi mogu biti geni za mikroRNK i/ili promotorske sekvence za alternativno procesovanje transkriptata locirani u intronu [46-50]. Na osnovu naših istraživanja još jednom je potvrđeno da CRISPR/Cas9 pristup omogućava precizno uvođenje mutacija u genomu, dok T-DNK nasumičnom integracijom može praviti nezgrapne genetičke rearanžmane koji imaju uticaj i na druge gene. Imajući u vidu navedene literaturne podatke jasan je nemerljiv značaj predvidljivog i preciznog editovanja gena upotrebom CRISPR/Cas9 tehnologije u naučne svrhe, ali s obzirom na univerzalnost i primenljivost kod svih organizama, ova metoda će nedvosmisleno postati nezamenljiv i dragocen alat u biotehnologiji biljaka.

Zahvalnica

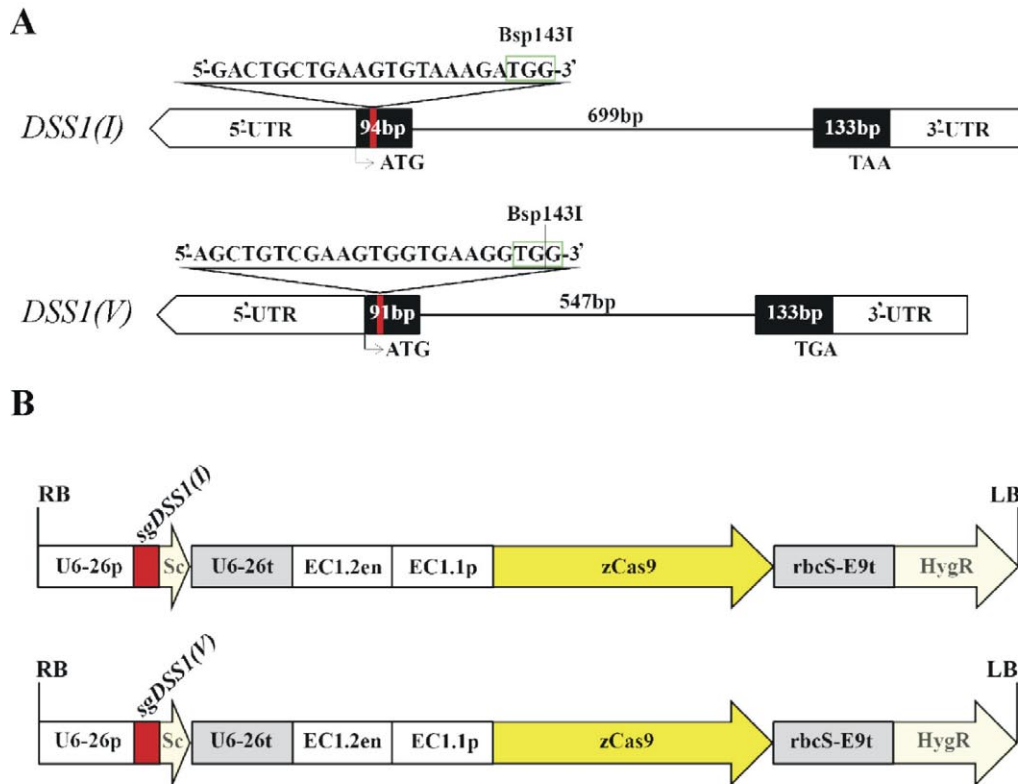
Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući Programu rada IMGGI za 2022. godinu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, 451-03-68/2022-14/200042 i Projektu Program IDEJE, Fond za nauku Republike Srbije, 7730230, 2021-2024

Literatura

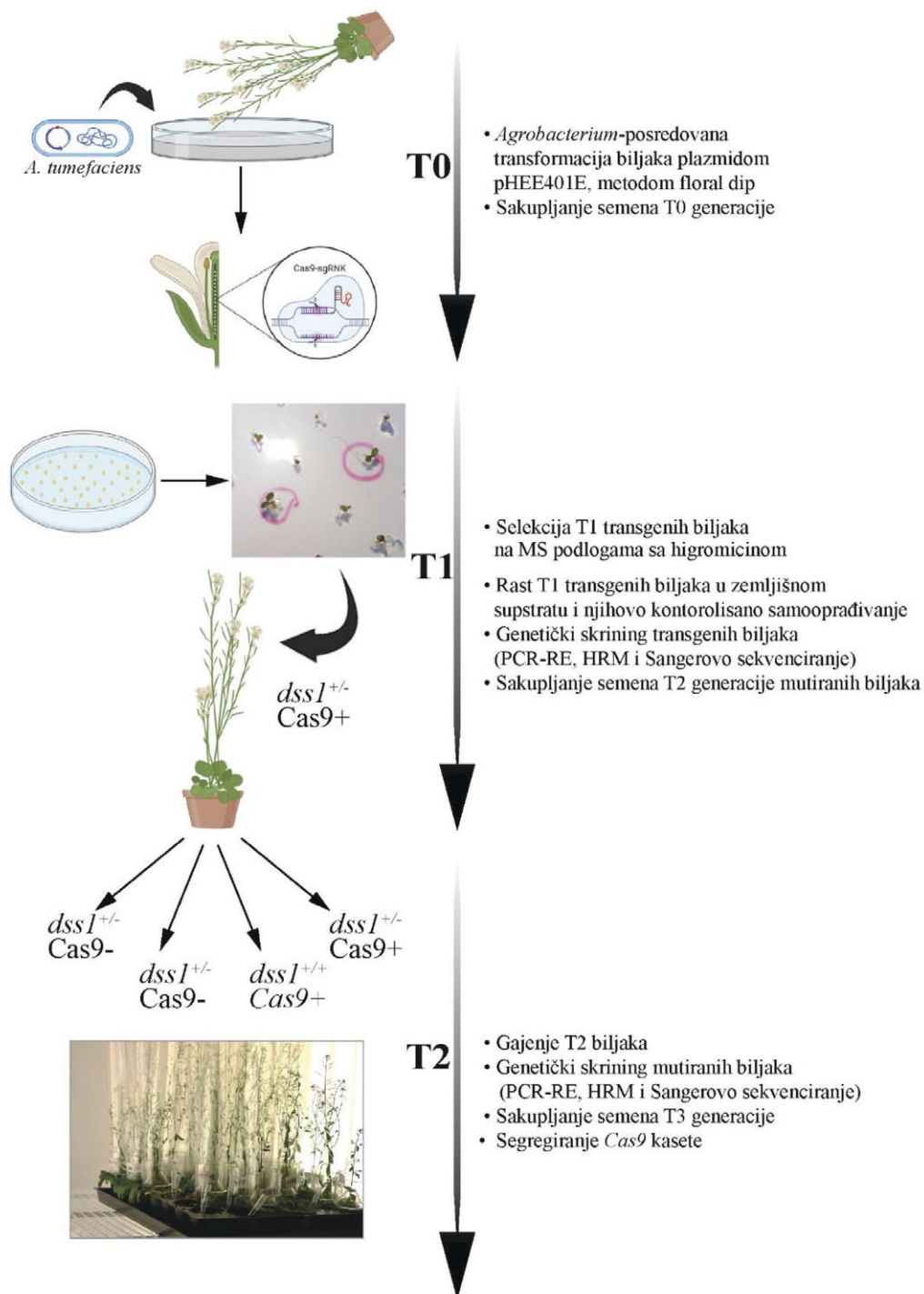
1. Stadler L. Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*. 1928;68(1756):186-7.
2. Auerbach C, Robson JM. Production of Mutations by Allyl Isothiocyanate. *Nature*. 1944;154(3898):81-.
3. Krysan PJ, Young JC, Sussman MR. T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *The plant cell*. 1999;11(12):2283-90.
4. Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol J, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell*. 1990;2(4):291-9.
5. Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, et al. High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(26):12028-33.
6. Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, et al. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant physiology*. 2013;161(1):20-7.
7. Khan Z, Khan SH, Mubarak MS, Sadia B, Ahmad A. Use of TALEs and TALEN technology for genetic improvement of plants. *Plant molecular biology reporter*. 2017;35:1-19.
8. Anton T, Karg E, Bultmann S. Applications of the CRISPR/Cas system beyond gene editing. *Biology Methods and Protocols*. 2018;3(1):bpy002.
9. Hillary VE, Ceasar SA. A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*. 2023;65(3):311-25.
10. Li J-F, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*. 2013;31(8):688-91.

11. Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*. 2013;9:1-10.
12. Zeng Y, Wen J, Zhao W, Wang Q, Huang W. Rational improvement of rice yield and cold tolerance by editing the three genes *OsPIN5b*, *GS3*, and *OsMYB30* with the CRISPR-Cas9 system. *Frontiers in plant science*. 2020;10:1663.
13. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(4):902-10.
14. Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, Huguet-Tapia JC, Perez-Quintero A, Li T, et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nature biotechnology*. 2019;37(11):1344-50.
15. Singh A, Kumar A, Yadav S, Singh IK. Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. *Plant Gene*. 2019;18:100173.
16. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:373-99.
17. Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*. 2014;2:53.
18. Sun X, Rikkerink EH, Jones WT, Uversky VN. Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *The Plant Cell*. 2013;25(1):38-55.
19. Crackower MA, Scherer SW, Rommens JM, Hui C-C, Poorkaj P, Soder S, et al. Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Human molecular genetics*. 1996;5(5):571-9.
20. Kragelund BB, Schenstrom SM, Rebula CA, Panse VG, Hartmann-Petersen R. DSS1/Sem1, a Multifunctional and Intrinsically Disordered Protein. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(5):446-59.
21. Le HP, Ma X, Vaquero J, Brinkmeyer M, Guo F, Heyer W-D, et al. DSS1 and ssDNA regulate oligomerization of BRCA2. *Nucleic acids research*. 2020;48(14):7818-33.
22. Schenstrøm SM, Rebula CA, Tatham MH, Hendus-Altnerburger R, Jourdain I, Hay RT, et al. Expanded Interactome of the Intrinsically Disordered Protein Dss1. *Cell Rep*. 2018;25(4):862-70.
23. Zhang Y, Chang FM, Huang J, Junco JJ, Maffi SK, Pridgen HI, et al. DSSylation, a novel protein modification targets proteins induced by oxidative stress, and facilitates their degradation in cells. *Protein Cell*. 2014;5(2):124-40.
24. Nikolić I. Funkcionalna karakterizacija gena *DSS1(l)* i *DSS1(V)* u odgovoru *Arabidopsis thaliana* na oksidativni stres: Univerzitet u Beogradu; 2023.
25. Nikolić I, Milisavljević M, Timotijević G. Assessing Transcriptomic Responses to Oxidative Stress: Contrasting Wild-Type *Arabidopsis* Seedlings with *dss1(l)* and *dss1(V)* Gene Knockout Mutants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(12):6291.
26. Nikolić I, Samardžić J, Stevanović S, Miljuš-Đukić J, Milisavljević M, Timotijević G. CRISPR/Cas9-Targeted Disruption of Two Highly Homologous *Arabidopsis thaliana* DSS1 Genes with Roles in Development and the Oxidative Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2442.
27. Nikolić IP, Nešić SB, Samardžić JT, Timotijević GS. Intrinsically disordered protein AtDSS1(V) participates in plant defense response to oxidative stress. *Protoplasma*. 2021;258(4):779-92.
28. Dray E, Siaud N, Dubois E, Doutriaux MP. Interaction between *Arabidopsis Brca2* and its partners Rad51, Dmc1, and Dss1. *Plant Physiol*. 2006;140(3):1059-69.
29. Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(12):4632-7.
30. Xing H-L, Dong L, Wang Z-P, Zhang H-Y, Han C-Y, Liu B, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*. 2014;14(1):1-12.
31. Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant biotechnology journal*. 2014;12(6):797-807.
32. Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology*. 2014;166(3):1292-7.
33. Wang Z-P, Xing H-L, Dong L, Zhang H-Y, Han C-Y, Wang X-C, et al. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome biology*. 2015;16:1-12.

34. Amack SC, Antunes MS. CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology*. 2020;24:100179.
35. Zlobin NE, Lebedeva MV, Taranov VV. CRISPR/Cas9 genome editing through in planta transformation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2020;40(2):153-68.
36. Desfeux C, Clough SJ, Bent AF. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant physiology*. 2000;123(3):895-904.
37. Bent AF. *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant physiology*. 2000;124(4):1540-7.
38. Szabados L, Kovács I, Oberschall A, Abrahám E, Kerekés I, Zsigmond L, et al. Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *The Plant Journal*. 2002;32(2):233-42.
39. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*. 1998;16(6):735-43.
40. Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(1):16-37, table of contents.
41. Zhang X, Henriques R, Lin S-S, Niu Q-W, Chua N-H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols*. 2006;1(2):641-6.
42. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(3):473-97.
43. Christians MJ, Robles LM, Zeller SM, Larsen PB. The eer5 mutation, which affects a novel proteasome-related subunit, indicates a prominent role for the COP9 signalosome in resetting the ethylene-signaling pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2008;55(3):467-77.
44. O'Malley RC, Ecker JR. Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *Plant J*. 2010;61(6):928-40.
45. Seeliger K, Dukowic-Schulze S, Wurz-Wildersinn R, Pacher M, Puchta H. BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2012;193(2):364-75.
46. Furger A, O'Sullivan JM, Binnie A, Lee BA, Proudfoot NJ. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes & development*. 2002;16(21):2792-9.
47. Gallegos JE, Rose AB. Intron DNA sequences can be more important than the proximal promoter in determining the site of transcript initiation. *The Plant Cell*. 2017;29(4):843-53.
48. Heyn P, Kalinka AT, Tomancak P, Neugebauer KM. Introns and gene expression: cellular constraints, transcriptional regulation, and evolutionary consequences. *Bioessays*. 2015;37(2):148-54.
49. Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Current Biology*. 2003;13(10):807-18.
50. Meng Y, Shao C. Large-scale identification of mirtrons in *Arabidopsis* and rice. *PLoS One*. 2012;7(2):e31163.

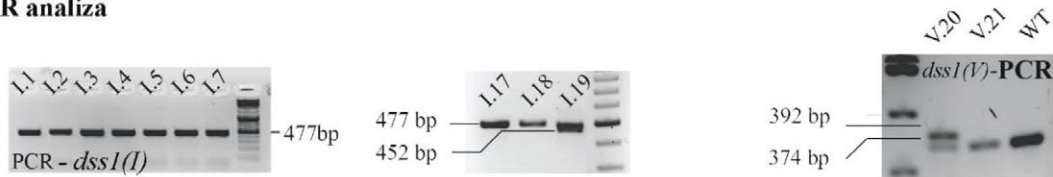


Slika 1. Pozicije gRNK sekvenci za ciljne gene *DSS1(I)/DSS1(V)* i struktura pojedinačnih CRISPR/Cas9 kaseti u okviru vektora pHEE401E. (A) Šematski prikaz gena *DSS1(I)* (gore) i *DSS1(V)* (dole): crni kvadrati – egzoni; linija između intron; beli petougao na levom i četvorougao na desnom kraju reprezentuju regione 5'-UTR i 3'-UTR; beli trougao sa sekvencom gRNK iznad ukazuje na komplementarno ciljno mesto označeno crvenom linijom u egzonu; zeleni pravougaonik uokviruje PAM region i mesto za digestiju enzimom Bsp143I; ATG – start kodon i TAA, TGA – stop kodoni. **(B)** Fizičke mape sekvenci T-DNK CRISPR/Cas9 binarnog vektora pHEE401E za transformaciju *A. thaliana*: RB/LB – granične sekvence T-DNK inserta; *gDSS1(I)* (crveni pravougaonik gore) i *gDSS1(V)* (crveni pravougaonik dole) – gRNK pod kontrolom promotora *U6-26p*; Sc – scaffold vektora; *U6-26t* – terminator; *EC1.2en/EC1.1p* – specifična kombinacija pojačivača *EC1.2* i promotora *EC1.1* za ekspresiju Cas9 u semenim zamecima; *zCas9* – sekvenca optimizovanog proteina kukuruza Cas9; *rbcS-E9t* – terminatorska sekvenca za Cas9; *HygR* – gen za rezistenciju na higromicin.



Slika 2. Sematski prikaz metodološkog pristupa uspostavljanja linija CRISPR/Cas9 mutanata za homologne gene *DSS1 A. thaliana*. Kreirano pomoću programa BioRender (<https://www.biorender.com/>).

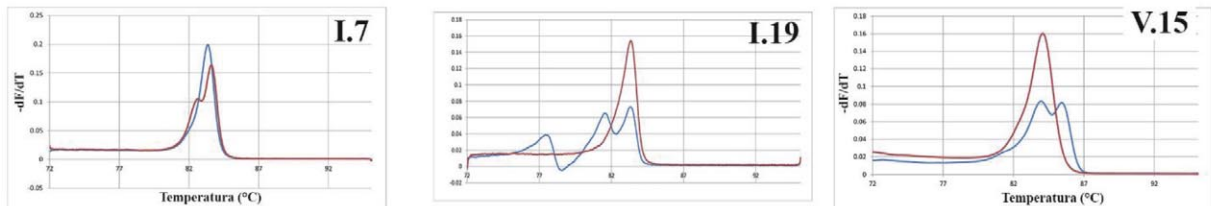
A PCR analiza



B Analiza PCR fragmenata restrikcionim enzimom Bsp143I



C HRM analiza



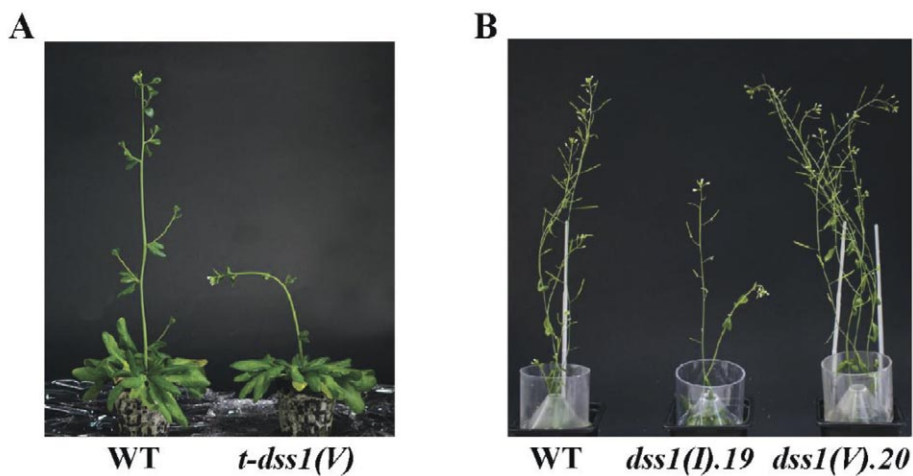
Slika 3. Strategije za detekciju gRNK/Cas9-posredovanih DNK modifikacija. (A) Analiza PCR produkata umnoženih prajmerima koji obuhvataju potencijalnu promenu u genomu na gel elektroforezi. **(B)** RE – Analiza PCR fragmenata restrikcionim enzimom Bsp143I. **(C)** Krive topljenja PCR proizvoda amplifikovanih iz heterozigota *dss1(I).7*, *dss1(I).19* i *dss1(V).15* u odnosu na WT, analizom *High resolution melting PCR* (HRM). Krive topljenja sa dva pika ukazuju da se radi o heterozigotnoj mutaciji, dok kriva topljenja sa jednim pikom označava WT. -dF/dT je promena fluorescenca pri promeni temperature.

A

		<u>Ciljna sekvenca</u>	<u>PAM</u>	
WT	5'	ATGGCGGCAGAACCGATGGCAGC	<u>GACTGCTGAAGTAGTAAAGATGG</u>	3'
<i>dss1(I).7</i>	5'	ATGGCGGCAGAACCGATGGCAGCGACTGCTGAAGTAGTAAGAGATGG		3'
<i>dss1(I).19</i>	5'	ATGGCGGCAGAACCG-----AGATGG		3'

B

		<u>Ciljna sekvenca</u>	<u>PAM</u>	
WT	5'	GGCAGCTGAGCTGTCGAAGTGGTGAA-GGTGG	<u>ATCTATTCG</u>	3'
<i>dss1(V).15</i>	5'	GGCAGCTGAGCTG----AGTCGTGAACGGT--ATCTATTCG		3'
<i>dss1(V).20</i>	5'	GGCAGCTGTCTGAAGTGGTGATCTGAAGGTGAGTCTGGAGCTGGTTT		3'

Slika 4. Poređenje DNK sekvenci WT i datog mutanta za gen *DSS1(I)* (A), odnosno *DSS1(V)* (B).Slika 5. Morfološke razlike između T-DNK insercionih (A) i CRISPR/Cas9 (B) mutanata *A. thaliana* za gen *DSS1(V)*. Prikazani su reprezentativni fenotipovi biljaka.



MOLEKULARNA BIOLOGIJA PROKARIOTA

MOLECULAR BIOLOGY OF PROKARYOTES



Razotkrivanje mehanizama unosa piocina: perspektive za razvoj antibiotika

Iva Atanasković

Biološki fakultet – Univerzitet u Beogradu

Kontakt: iva.atanaskovic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Piocini su raznovrsna grupa bakteriocina, proteinskih antibiotika koje proizvode sojevi bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Ova bakterija je od strane Svetske zdravstvene organizacije proglašena za patogena od prioriteta za razvoj novih antibiotika, zato što su pojedini sojevi rezistentni na sve trenutno dostupne antibiotike. Piocini su visoko-specifični i potentni antibiotici koji mogu pronaći primenu u suzbijanju rezistentnih sojeva ove bakterije, a naročito u slučaju hroničnih infekcija kod imunokompromitovanih osoba. Ovo poglavlje daje prikaz novih otkrića koja se odnose na mehanizam delovanja piocina, i način na koji ovi višedomenski proteinski antibiotici prolaze kroz bakterijski ćelijski zid. Priča započinje sa TonB zavisnim receptorima koji prenose piocine preko spoljašnje membrane, a završava sa TonB sistemom i FtsH proteazom i njihovom aktivnošću u prenosu piocina kroz unutrašnju membranu. Takođe ćemo se osvrnuti na delove u strukturi piocina koji su angažovani u pojedinim fazama njihovog unosa u bakterijsku ćeliju. Prikazaćemo i molekularno-biološke metode koje se trenutno koriste za izučavanje procesa unosa piocina. Cilj poglavlja je da objasni kako poznavanje molekularnih detalja o unosu piocina može pomoći njihov razvoj u novu grupu potentnih antibiotika.

Ključne reči: piocin, bakteriocin, *Pseudomonas aeruginosa*, proteinski antibiotik, transport proteina

Decoding Pyocin Import Mechanisms: Insights for Antibiotic Development

Iva Atanasković

Biološki fakultet – Univerzitet u Beogradu

Correspondence: iva.atanaskovic@bio.bg.ac.rs

Abstract

Piocins are a diverse group of bacteriocins, protein antibiotics produced by strains of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. This bacterium has been declared a priority pathogen for the development of new antibiotics by the World Health Organization, because some strains are resistant to all currently available antibiotics. Piocins are highly specific and potent antibiotics that could be used to combat resistant strains of this bacterium, particularly in the case of chronic infections in immunocompromised individuals. This chapter provides an overview of new discoveries related to the mechanism of action of piocins and how these multi-domain protein antibiotics traverse the bacterial cell wall. Our journey begins with TonB-dependent receptors that transport piocins across the outer membrane, and concludes with the TonB system and the FtsH protease and their activity in transferring piocins through the inner membrane. Also, the structural parts of piocins involved in various stages of their uptake into the bacterial cell will be discussed. Additionally, the molecular-biological methods currently used to study the process of piocin uptake will be presented. The aim of the chapter is to explain how understanding the molecular details of piocin uptake can assist in their development into a new group of potent antibiotics.

Key words: pyocin, bacteriocin, *Pseudomonas aeruginosa*, protein antibiotic, protein transport

***Pseudomonas aeruginosa*: patogen od kritičnog prioriteta za razvoj novih antibiotika**

Pseudomonas aeruginosa je gram-negativna bakterija koja predstavlja značajnu pretnju javnom zdravlju zbog svoje visoke prirodne otpornosti na mnoge antibiotike i sposobnosti da stekne dodatne mehanizme otpornosti. Svetska zdravstvena organizacija (WHO) je klasifikovala *P. aeruginosa* kao patogen od kritičnog prioriteta, što zahteva hitan razvoj novih antibiotika [1]. Ova klasifikacija je vođena sa nekoliko faktora:

1. Visoka stopa otpornosti: *P. aeruginosa* ima izuzetnu sposobnost da razvije otpornost na više klasa antibiotika putem različitih mehanizama, uključujući efluks pumpe, proizvodnju β -laktamaza i promene u mestu vezivanja antibiotika [2].
2. Ograničene mogućnosti lečenja: Npropustljivost spoljašnje membrane ćelijskog zida u kombinaciji sa sposobnošću stvaranja biofilma čini lečenje infekcija izuzetno izazovnim. Biofilm štiti *P. aeruginosa* od imunog sistema domaćina i antibiotika [3].
3. Ozbiljne infekcije: *P. aeruginosa* je povezana sa visokim stopama morbiditeta i mortaliteta zbog učešća u teško lečivim infekcijama kao što su pneumonija povezana sa sistemima za ventilaciju u bolnicama, infekcije krvotoka i hronične plućne infekcije kod pacijenata sa cističnom fibrozom [4].

Sastav višeslojnog ćelijskog zida kod *P. aeruginosa* je ono što omogućava ovoj bakteriji da uspeva u različitim sredinama: od vode i tla do biljnih i životinjskih tkiva [5]. Kod ljudi, *P. aeruginosa* je oportunistički patogen i obično inficira imunokompromitovane pacijente. Takve infekcije mogu biti fatalne, posebno u slučaju hronične pneumonije kod pacijenata koji boluju od cistične fibroze, multisistemske bolesti uzrokovane mutacijom gena za regulator transmembranskog provodnika za hloridne jone (CFTR). Disfunkcija CFTR provodnika dovodi do nakupljanja sluzi u plućima. To omogućava *P. aeruginosa* da formira kompaktan biofilm u plućima obolele osobe, gde se prilagođava plućnom okruženju i ostaje neometena od strane inflamatornog odgovora domaćina. Hronična pneumonija kod ovih pacijenata može dovesti do respiratorne insuficijencije i smrti [6]. Stoga, postoji potreba za razumevanjem patogenog načina života *P. aeruginosa* i za razvojem efikasnog antibiotskog tretmana protiv ove bakterije. Potreba za razvojem antibiotika protiv *P. aeruginosa* je naglašena pojavom multirezistentnih sojeva, koji se često izoluju sa bolničke opreme i kod pacijenata sa bolničkim infekcijama [7]. Podaci prikupljeni u poslednjih 5 godina pokazuju da prevalencija multirezistentnih sojeva *P. aeruginosa* značajno varira u zavisnosti od regiona. U Evropi, stope rezistencije na antibiotike kao što su fluorokinoloni, piperacilin/tazobaktam, karbapenemi, ceftazidim i aminoglikozidi prelaze 10%. Najviše stope, od 50% do 75%, zabeležene su u Egiptu. Na globalnom nivou, trendovi ukazuju na rastuću rezistenciju, sa prijavljenim stopama u rasponu od 15% do 30% širom Evrope, Severne Amerike i Južne Amerike [2, 6]. Molekularni mehanizmi antimikrobne rezistencije *P. aeruginosa* su različiti: promena propustljivosti ćelijskog omotača, izbacivanje antibiotika kroz pumpe, razgradnja ili inaktivacija antibiotika i formiranje biofilma [5]. Zbog ovih mehanizama, sojevi *P. aeruginosa* mogu biti rezistentni na većinu dostupnih antimikrobnih sredstava, od karbapenema do cefalosporina treće generacije, koji su preferirani izbor za lečenje multirezistentnih bakterijskih infekcija [6]. Karbapenem-rezistentni sojevi *P. aeruginosa* su navedeni kao patogen od kritičnog prioriteta za istraživanje i otkrivanje novih antibiotika [1]. Istraživači su se stoga fokusirali na razvoj novih terapijskih strategija protiv multirezistentne *P. aeruginosa*: inhibiciju međućelijske komunikacije, inhibiciju i razgradnju biofilma, inhibiciju faktora virulencije, razvoj vakcina, terapiju bakteriofazima i razvoj antimikrobnih peptida i proteina [8].

Kao i kod drugih gram-negativnih bakterija, ćelijski omotač *P. aeruginosa* se sastoji od asimetrične spoljašnje membrane sa fosfolipidnim unutrašnjim slojem i lipopolisaharidnim (LPS) spoljašnjim slojem, periplazme i citoplazmatske membrane sa simetričnim fosfolipidnim dvoslojem [9]. Spoljašnja membrana

P. aeruginosa funkcioniše kao selektivna barijera za propustljivost, jer sadrži brojne transportere za razmenu signala i hranljivih materija sa okruženjem. Sastav ovih transportera varira sa promenama u okruženju [10] i od toga zavisi propustljivost omotača za antibiotike. Spoljašnja membrana *P. aeruginosa* je karakterisana veoma niskom propustljivošću, 12,5 puta manje propustljivom od *Escherichia coli*, što delimično doprinosi visokoj antibiotskoj rezistenciji ove bakterije [11]. To je posledica manje ekspresije porina u spoljašnjoj membrani ove bakterijske vrste [9]. Pored porina, TonB zavisni transporteri (TBDT, eng. *TonB dependant transporters*) su druga grupa proteina koja značajno utiče na propustljivost ćelijskog zida kod *P. aeruginosa*. Oni su uključeni u unos helatora gvožđa zvanih siderofore, koje variraju u složenosti od malih molekula kao što je citrat, do proteina koji sadrže gvožđe, kao što su hemoglobin i transferin [12]. TBDT su takođe uključeni u unos cinka [13] i bakra [14]. Pored svoje funkcije unosa hranljivih materija, TBDT mogu služiti i kao površinski senzori u signalnim kaskadama, od kojih su neke povezane sa virulencijom [15]. Spoljašnja membrana *P. aeruginosa* takođe sadrži transportere koji su uključeni u eksport liganda, umesto u import. Takvi proteini su uključeni u efluksne mehanizme, biogenezu spoljašnje membrane ili sekreciju proteina. Efluks pumpe su proteinski aktivni transporteri sa širokom specifičnošću supstrata. Kod *P. aeruginosa* one su uključene u eksport toksina, kao što su antibiotici i drugi sekundarni metaboliti, što ih povezuje sa multirezistencijom. Postoji nekoliko porodica pumpi, ali većina njih pripada RND (RND, eng. *resistance nodulation division*) porodici [16]. RND pumpe su tripartitne i sastoje se od transportera citoplazmatske membrane, periplazmatski vezanih proteina i spoljašnjeg membranskog porina. Neki primeri su MexAB-OprM pumpa, povezana sa rezistencijom na β -laktame [17], i MexXY-OprM, povezana sa rezistencijom na tetraciklin, eritromicin i gentamicin [6]. Istovremena ekspresija više efluks pumpi je pronađena u brojnim multirezistentnim kliničkim izolatima *P. aeruginosa* [18]. Konačno, *P. aeruginosa* proizvodi širok spektar sekretornih sistema (TSS), od kojih svi imaju eksportere u spoljašnjoj membrani [19]. Transporteri spoljašnje membrane mogu biti deo dvostepenih sistema (T2SS, T5SS), povezanih sa Sec ili Tat mehanizmom u unutrašnjoj membrani, ili formirati translokone sa jedinstvenim mehanizmom za direktnu injekciju egzoproteina iz citoplazme u ćeliju domaćina (T4SS, T3SS, T6SS). Ovi sistemi nisu direktno povezani sa antibiotskom rezistentnošću, ali jesu značajan faktor virulencije kod *P. aeruginosa* [20; 21; 22].

Piocini – oružje u intraspecijskoj kompeticiji kod *P. aeruginosa*

Bakteriocini su peptidni i proteinski antibiotici koji proizvode bakterije kako bi inhibirale rast ili ubile druge bakterije u procesima inter i intraspecijske kompeticije. Kod Gram-pozitivnih bakterija, to su najčešće peptidi male molekulske mase, dok su bakteriocini Gram-negativnih bakterija najčešće multidomenski proteini molekulske mase između 20 i 80 kDa [23]. Bakteriocini Gram-negativnih bakterija su specifični za određene vrste ili sojeve bakterija i deluju tako što se vezuju za specifične receptore na ciljnim ćelijama, prodiru kroz bakterijske membrane i izazivaju smrt osetljivog bakterijskog soja putem različitih mehanizama, kao što su degradacija nukleinskih kiselina, inhibicija sinteze ćelijskog zida ili perforacija unutrašnje ćelijske membrane. Soj koji produkuje bakteriocin je zaštićen od njegovog toksičnog delovanja usled ko-ekspresije imunskog proteina koji gradi čvrstu interakciju sa bakteriocinom. Osetljivi soj ne eksprimira imunski protein, te je stoga podložan delovanju bakteriocina (Slika 1).

Piocini su grupa bakteriocina koje proizvode sojevi Gram-negativne bakterije *P. aeruginosa*. To su potentni i visoko specifični proteinski antibiotici aktivni protiv multi-rezistentnih sojeva ovog patogena [25]. Strukturno raznovrsni, piocini se sastoje od više funkcionalnih domena koji igraju ključne uloge u njihovom mehanizmu delovanja, uključujući vezivanje za ciljne ćelije, translokaciju kroz višeslojni ćelijski zid i ispoljavanje citotoksičnog efekta.

Modularna struktura piocina

Piocini se obično sastoje od nekoliko ključnih regiona: nestruktuisani N-terminus, domen za vezivanje receptora (R), domen za translokaciju preko unutrašnje membrane (IMT, eng. *inner membrane translocation*) i citotoksični domen (C). Svaki od ovih domena ima specifične funkcije koje doprinose ukupnoj aktivnosti piocina (Slika 2A).

1. Nestrukturisani N-terminus: Ovaj region često sadrži sekvence koje su ključne za inicijalne interakcije sa ciljanim ćelijama i može uključivati motive neophodne za vezivanje za specifične receptore na površini bakterija. Sadrži konzervisanu sekvencu koja se naziva TonB Box [26, 27]. Ova sekvencija je esencijalna za interakciju piocina sa TonB sistemom, i stoga je neophodna za korake transporta preko spoljašnje i preko unutrašnje ćelijske membrane, kao što će detaljnije biti objašnjeno u narednim odeljcima.
2. R domen: Nalazi se nakon N-terminusa i odgovoran je za prepoznavanje i vezivanje za specifične receptore na spoljašnjoj membrani ciljnih bakterija. Na primer, kod Piocina G (PyoG), R domen je ključan za translokaciju kroz spoljašnju membranu interakcijom sa Hur receptorom [26].
3. IMT domen: Konzervirani region koji se nalazi u nukleaznim bakteriocinima. Ovaj domen je neophodan za translokaciju piocina preko unutrašnje membrane u citoplazmu ciljne ćelije [28]. Prisustvo IMT domena ukazuje na to da piocin svoju aktivnost ostvaruje delujući na komponente bakterijske citoplazme, kao što su bakterijska DNK ili RNK. Odsustvo ovog domena ukazuje da se piocin ne prenosi preko unutrašnje membrane i da je aktivan na nivou bakterijskog ćelijskog zida, na primer tako što inhibira sintezu peptidoglikanskog omotača [27].
4. C domen: C-terminalni domen piocina sadrži citotoksičnu aktivnost, koja može varirati u zavisnosti od tipa piocina. Kod nukleaznih piocina ovaj domen ima DNaznu ili RNaznu aktivnost, što dovodi do degradacije nukleinskih kiselina u ciljnoj ćeliji, na kraju uzrokujući smrt ćelije [23]. Pored nukleaznog domena postoje i C domeni koji formiraju pore u unutrašnjoj membrani, pa usled narušavanja osmotske ravnoteže dolazi do smrti ćelije [27], kao i C domeni koji inhibiraju sintezu peptidoglikana [29] ili inhibiraju inserciju esencijalnih proteina u spoljašnju ćelijsku membranu [30]. Citotoksični domen mora da interaguje sa imunskim proteinom koje proizvodi isti soj kako bi se sprečila auto-toksičnost. Ova interakcija se narušava u procesu unosa piocina u bakterijsku ćeliju [31].

Raznovrsnost piocina

Piocini pokazuju značajnu raznovrsnost u strukturi (Slika 2), mehanizmu delovanja i unosa, što im omogućava da ciljaju širok spektar bakterijskih sojeva i adaptiraju se različitim mehanizmima unosa i ubijanja. Dele se na: piocine S-tipa, letinima slične piocine i tailocine. Modularni ili piocini S-tipa imaju konvencionalnu multidomensku strukturu opisanu u prethodnom odeljku. Raznovrsnost među piocinima osigurava širok spektar aktivnosti i adaptabilnosti različitim bakterijskim odbrambenim mehanizmima, čineći ih potentnim alatima za borbu protiv bakterija otpornih na antibiotike. Ova raznovrsnost je očigledna u varijacijama R i C domena, koji se mogu značajno razlikovati među piocinima kako bi ciljali različite receptore i različite mete delovanja u bakterijskim ćelijama. Modularna struktura piocina, kombinovana sa njihovom raznovrsnošću, omogućava da se kombinovanjem domena i inženjeringom hibridnih piocina poveća broj proteinskih antibiotika u okviru ove klase. Lektinima slični piocini (Slika 2B) takođe imaju modularnu strukturu, no sadrže samo dva domena. Oba domena imaju dvostruku receptor-vezujuću i citotoksičnu ulogu. Sadrže ponavljajuće motive koji se vezuju za šećernu komponentu LPS omotača. Citotoksična

aktivnost ovih piocina podrazumeva inhibiciju insercije esencijalnih proteina u spoljašnju membranu, čime se blokira normalno asembliranje bakterijskog ćelijskog zida [30].

Pored S, postoje i R i F tip piocina, koji se još nazivaju tailocini. Ovi piocini imaju kontraktilni rep sličan bakteriofagima (Slika 2C) i koriste različit mehanizam za ubrizgavanje svojih citotoksičnih domena u ciljne ćelije. R-tip je izgrađen od duplog šupljeg cilindra koji se sastoji od krutog unutrašnjeg jezgra i kontraktilnog spoljnog trupa. Vrh unutrašnjeg jezgra sadrži proteinske šiljke. Na trup je pričvršćena bazalna ploča, koja služi kao tačka vezivanja za šest repnih vlakana. Kao kod bakteriofaga, vlakna imaju ulogu u usidrenju tailocina za ciljne ćelije, obično kroz vezivanje za LPS na površini bakterijske ćelije. Proteini koji određuju specifičnost tailocina za određeni bakterijski soj se nalaze se na distalnom delu vlakana [33]. F-tip ima nešto drugačiju strukturu, sa štapićem, bazalnom pločom i vlaknima za vezivanje za ciljne ćelije, ali mu nedostaje spoljašnji trup. Oba tipa ubijaju ćelije na isti način: nakon vezivanja za ciljne ćelije, tailocin se kontrahuje, jezgro se ubacuje u ćelijski omotač, a proteinski šiljci perforiraju unutrašnju membranu uzrokujući depolarizaciju i smrt ćelije [34].

Prenos modularnih piocina preko spoljašnje membrane

Uprkos njihovoj raznolikosti, neke karakteristike unosa modularnih piocina su konzervirane ne samo između piocina, nego i između modularnih bakteriocina kod različitih vrsta Gram-negativnih bakterija. Svi piocini parazitiraju mašinerije za unos hranljivih materija kako bi se transportovali preko ćelijske membrane i stigli do svojih periplazmatskih ili citoplazmatskih meta. Ovaj proces zahteva interakcije između piocina i komponenti ćelijskog omotača, kao i protonsku motornu silu kao izvor energije [35].

Unos piocina počinje vezivanjem za receptor spoljašnje membrane (Slika 3A), što pričvršćuje piocin na površinu ćelije. U najvećem broju slučajeva, receptor za piocin ujedno obavlja i funkciju piocinskog transportera kroz spoljašnju membranu. Svi do sada okarakterisani proteinski receptori za piocine pripadaju klasi TonB zavisnih transportera. TBDT-ovi su energizovani TonB proteinskim sistemom, koji povezuje protonsku motornu silu generisanu preko unutrašnje membrane sa prenosom hranljivih materija preko spoljašnje membrane bakterijskog ćelijskog zida. Ovi transporteri se sastoje od β -ploča koje grade transmembransku strukturu bureta, u kojoj proteinski lanac 22 puta španuje ćelijsku membranu. Unutar bureta se nalazi globularna struktura nalik lopti, koja u mirujućoj konformaciji transportera zatvara kanal unutar strukture bureta. Mesta za vezivanje liganda formirana su od aminokiselinskih bočnih grupa na zidovima i vanćelijskim petljama β -bureta, kao i na površini globularnog čepa koja je okrenuta ka unutrašnjosti kanala bureta [35]. Sa druge strane koja je okrenuta ka periplazmi, globularni čep interaguje sa TonB kompleksom, koji će biti detaljnije objašnjen u narednom odeljku. Nakon vezivanja liganda za receptor, transporter prolazi kroz konformacionu promenu. Trenutni modeli unosa, koji su i dalje kontroverzni, sugerišu da se čep odmotava i da ga TonB povlači ka periplazmi, prilikom čega se otvara kanal β -bureta. Ova dislokacija čepa zapravo stvara kanal za unos liganda [27, 35]. Mnoge finese ovog molekularnog mehanizma ostaju nerazjašnjene i tema su trenutnih istraživanja: koliki je obim kretanja i odmotavanja čepa, da li čep potpuno izlazi iz bureta i da li su ove karakteristike transporta sačuvane za različite TBDT-ove i različite piocine.

TBDT-ovi kod *P. aeruginosa* su takođe uključeni u unos vitamina i heliranih metalnih kompleksa, obično gvožđa i cinka, u obliku siderofora. Pored njihove funkcije unosa hranljivih materija, TBDT-ovi mogu takođe služiti kao površinski senzori u signalnim kaskadama, od kojih su neke povezane sa virulentnošću. Neki TBDT-ovi imaju signalni domen na N-terminusu. Nakon vezivanja liganda, ova sekvenca interaguje sa

periplazmatskim proteinima i moduliše aktivaciju σ faktora koji regulišu ekspresiju gena za faktore virulencije. Na primer, receptor za sideroforu feri-pioverdin, FpvA, aktivira PvdS σ faktor u citoplazmi, kao rezultat vezivanja feri-pioverdina za FpvA. PvdS zatim izaziva ekspresiju faktora virulentnosti, kao što su egzotoksini i endopeptidaze [36]. Piocini, iako su značajno veći od siderofora, imitiraju ove ligande i koriste ista mesta za vezivanje za TBDT. Po principu molekularne mimikrije, pokreću iste konformacione promene u transporteru i tako ulaze u periplazmu bakterijskog ćelijskog zida. Sa obzirom na to da su TBDT faktori virulencije i da su esencijalni za opstanak *P. aeruginosa* u procesu uspostavljanja infekcije, ovi transporter predstavljaju pogodne ciljne molekule u kontekstu primene piocina kao novih antibiotika. Na primer, PyoG se vezuje za TBDT koji se zove Hur [26]. Hur ima funkciju u unosu hemina u bakterijsku ćeliju, koji predstavlja esencijalni izvor gvožđa za *P. aeruginosa* kada se ona nađe u pogodnom domaćinu. Dakle, TBDT-ovi su eksprimirani u domaćinu, na mestu infekcije, jer je restrikcija u dostupnosti gvožđa i drugih mikronutrijenata jedan od načina putem kojih se organizam bori protiv *P. aeruginosa* [37]. Samim tim je *P. aeruginosa* u inficiranom tkivu visoko-osetljiva na piocine, što je evidentno i iz visoke aktivnosti ovih antibiotika u različitim *in vivo* sistemima [27].

Neki piocini, pored TBDT transportera, koriste LPS kao dodatan receptor (Slika 2A). Ovakvi piocini se vezuju za celu površinu bakterijske ćelije i tu se koncentruju. Primer su nukleazni piocini S2, SD2, SD3, kao i piocin S5 koji perforira unutrašnju membranu bakterijske ćelije [27,35]. Dakle, aktivnost nekih piocina takođe zavisi od strukture LPS-a, koja se može menjati u procesu uspostavljanja infekcije. Obično se u ovim uslovima LPS zadebljava, jer ga bakterije koriste kao dodatnu protektivnu barijeru, pa se ovo svojstvo može iskoristiti u kontekstu primene piocina kao antibiotika. Takođe je bitno napomenuti da postoji nekoliko piocina za koje receptori nisu poznati, što je tema tekućih istraživanja. Poznavanje celokupnog panela piocinskih receptora može da pomogne njihov razvoj u antibiotike. Ukoliko znamo koje piocinske receptore ima određeni multi-rezistentan soj *P. aeruginosa*, sa velikom sigurnošću možemo osmisliti koktel piocina na koji je taj soj osetljiv. Time se povećava uspešnost primenjene terapije u suzbijanju ovakvog soja.

Translokacija preko spoljašnje membrane može se podeliti u nekoliko faza (Slika 2B). Prvo, piocin se vezuje za LPS pa za određeni TBDT, ili se direktno vezuje za svoj TBDT. Vezivanje za TBDT uključuje molekularnu mimikriju gde piocin imitira kognatni ligand TBDT-a i zauzima isto mesto vezivanja [35]. Usled toga, globularni zatvarač TBDT-a pomera TonB sistem, otvarajući kanal u TBDT-u na način zavistan od protonske motorne sile. Piocin prvo prolazi kroz kanal TBDT-a svojim nestruktuiranim N-terminusom, koji se i sam vezuje za isti ili drugi molekul TonB-a [26,27]. Na ovaj način piocin ulazi u periplazmu, takođe zavisno od protonske motorne sile [35].

TonB sistem i put kroz periplazmu

Naše viđenje periplazme kod Gram-negativnih bakterija značajno se promenilo u zadnjih nekoliko godina, i to baš zahvaljujući istraživanjima na mehanizmima unosa multidomenskih bakteriocina. Ispitivanje transporta bakteriocina i bakterijskih egzotoksina su ukazala da je periplazma kompartmentalizovana: sastoji se iz cis strane ka spoljašnjoj i trans strane orijentisane ka unutrašnjoj ćelijskoj membrani. Ulogu graničnika vrši tanak sloj peptidoglikana, koji ima strukturu perforirane mreže i funkcioniše po principu molekulskog sita: zavisno od veličine i naelektrisanja, neki molekuli zahtevaju aktivnost energetski zavisnih transportera kako bi prešli sa jedne na drugu stranu peptidoglikana [38]. Upravo su piocini takvi molekuli. Njihov prelaz sa trans na cis stranu periplazme, slično prolazu kroz spoljašnju membranu, zahteva aktivnost TonB sistema [28].

TonB sistem se nalazi u unutrašnjoj ćelijskoj membrani i omogućava transdukciju ekstracelularnih signala. Zavisno od ovih signala, sistem energizuje konformacione promene proteina ćelijskog zida kod Gram-negativnih bakterija. Mehanizmom koji još nije u potpunosti razjašnjen, TonB sistem povezuje protonsku motornu silu, tj gradijent u koncentraciji protona preko unutrašnje membrane, sa događajima na spoljašnjoj membrani i u periplazmi. Sistem se sastoji od tri proteina unutrašnje membrane: ExbB, ExbD i TonB. TonB i ExbD imaju sličnu topologiju: kratak N-terminalni domen, transmembranski domen, fleksibilni linker i C-terminalni periplazmatski domen. Periplazmatski domen TonB-a je veći od onog kod ExbD-a. Proteže se kroz periplazmu i interaguje sa proteinima spoljašnje membrane [35]. ExbB ima tri transmembranska segmenta i citoplazmatski domen [39]. Ova tri proteina su funkcionalna samo u kompleksu. Pet kopija ExbB su raspoređena kao pentamer oko ExbD dimera, formirajući kanal za prolaz protona. Membranski heliks TonB-a direktno interaguje sa ExbBD oligomerom. Ova organizacija kompleksa omogućava da se prolaz protona kroz ExbBD poveže sa konformacionim promenama TonB-a. Svojim periplazmatskim segmentom, TonB potom interaguje sa proteinima ćelijskog zida i indukuje njihove konformacione promene. Finese ovog prenosa protonske motorne sile sa TonB na druge proteine ćelijskog zida su još uvek nerazjašnjene. Postoji nekoliko modela, i u kontekstu transporta piocina najviše molekularnih dokaza ide u prilog modelu propelera i modelu povlačenja. U modelu propelera, dimer TonB prolazi kroz rotaciono kretanje zavisno od protonske motorne sile. TonB se vezuje za TonB kutiju TBDT-a i rotira da bi povukao globularni čep, omogućavajući otvaranje kanala TBDT-a i unos liganda. Na ovaj način se energija rotacionog kretanja prenosi na spoljašnju membranu [40]. U modelu povlačenja, periplazmatski domen TonB-a se vezuje za ligand vezani TBDT. Ton kompleks zatim vrši povlačnu silu koja delimično odmotava globularni čep, omogućavajući ligandu da pređe u periplazmu. Ovaj model je podržan molekularnim simulacijama koje pokazuju da je interakcija između TonB-a i TBDT-a dovoljno jaka da TonB ostane vezan za TonB kutiju dok primenjena sila postepeno odmotava čep [41]. Po sličnom mehanizmu, TonB bi mogao da povuče i N-terminus piocina koji imitira ligand i prolazi kroz kanal TBDT-a, jer i sam piocin sadrži TonB vezujuću sekvencu. Pored toga, pokazano je da je prisustvo TonB-a i interakcija između TonB sistema i piocina esencijalna kako za prolazak piocina kroz spoljašnju, tako i za prolazak kroz unutrašnju membranu. Stoga, pored toga što povlači piocin kroz kanal TBDT-a, TonB ima i ulogu u pozicioniranju piocina u periplazmi i u njegovom usmeravanju u naredne etape transporta [28]. Tačna uloga TonB u ovom procesu još uvek nije razotkrivena, no ustanovljeno je da je dužina periplazmatskog domena TonB proteina značajna za ovaj proces [27]. Stoga je trenutna hipoteza ta da TonB, po modelu povlačenja, prvo povlači prolazak piocina kroz TBDT, a potom povlači prolazak kroz pore peptidoglikana i prolazak sa trans na cis stranu periplazme. Tek na cis strani, piocin stupa u interakciju sa proteinima unutrašnje ćelijske membrane i započinje ulazak u citoplazmu [28].

Kod *P. aeruginosa* postoje 3 izoforme TonB proteina (TonB1, TonB2, TonB3), svaka povezana sa različitim ćelijskim funkcijama. TonB1 je povezan sa unosom gvožđa i ćelijskom signalizacijom. Na primer, TonB1 je neophodan za unos siderofore pioverdina kroz FpvA receptor. Interakcija TonB1 i FpvA je takođe neophodna za aktivaciju σ faktora uključenih u regulaciju ekspresije FpvA i pioverdina, u zavisnosti od dostupnosti ekstracelularnog gvožđa [42]. TonB2 je takođe povezan sa ExbB-ExbD, ali njegova uloga još uvek nije razjašnjena. Za razliku od TonB1, TonB2 nije esencijalan za rast u uslovima nedostatka gvožđa, ali se ipak njegova ekspresija povećava u ovim uslovima [43]. Nije poznato da li je treća izoforma, TonB3, povezana sa ExbB-ExbD, ali postoje dokazi o njenom učešću u kretanju i aktivnosti pilusa [44]. Za aktivnost svih do sada otkrivenih modularnih piocina neophodno je prisustvo TonB1 proteina u ćelijskom zidu. Pokazano je da se piocini vezuju za periplazmatski segment TonB1, i da TonB2 i TonB3 ne mogu da zamene TonB1 u ovoj interakciji [26,27].

Prolazak piocina kroz unutrašnju membranu

Translokacija piocina koji formiraju pore ili inhibiraju sintezu peptidoglikana zaustavlja se u periplazmi. Za njihovu aktivnost je neophodan receptor i translokator u spoljašnjoj membrani, kao i TonB sistem [27]. Međutim, nukleazni piocini se translociraju preko unutrašnje membrane. Nije poznat mehanizam putem kojeg se to događa, ali je ustanovljen domen u piocinu neophodan za ovaj proces, kao i neke komponente unutrašnje membrane [28].

Transport nukleaznih piocina zahteva prisustvo funkcionalne FtsH proteaze u unutrašnjoj membrani, kao i funkcionalnog TonB sistema. Inaktivacija proteazne aktivnosti FtsH, ili dekuplovanje TonB1 od ostalih komponenti sistema, dovode do potpunog gubitka propustljivosti unutrašnje membrane za piocin [28]. FtsH je konzerviran protein Gram-negativnih bakterija, i njegova funkcionalnost je povezana sa aktivnošću nukleaznih bakteriocina kod različitih vrsta bakterija. Funkcija FtsH je u kontroli kvaliteta proteina: prepoznaje pogrešno savijene ili pogrešno inkorporisane membranske proteine i degraduje ih. Takođe može razgraditi citosolne proteine koji imaju specifične signalne sekvence, nazvane degroni. FtsH-zavisna degradacija citoplazmatskih proteina je povezana sa regulacijom ekspresije gena za reakciju na toplotni šok, regulacijom odgovora na superoksidni stres, kontrolom biosinteze LPS-a i fosfolipida, uklanjanjem citoplazmatskih aberantnih proteina i životnim ciklusom faga λ [45]. FtsH ima dva transmembranska heliksa na N-terminusu, nakon kojih sledi periplazmatski domen. C-terminalni citoplazmatski region se sastoji od AAA+ ATPaze i cink-zavisne metaloproteaze. Interakcije subjedinica su preko N-terminalnog regiona, omogućavajući šest FtsH monomera da formiraju prsten u unutrašnjoj membrani. Pogrešno presavijeni proteini se usmeravaju iz unutrašnje membrane u FtsH prsten, i prvo se vezuju za AAA+ ATPazni domen, koja presavija i translocira supstrat u proteolitičku komoru FtsH heksamera [46]. Kod *E. coli*, *ftsH* je esencijalni gen. Neophodan je za regulaciju odnosa LPS-a i fosfolipida u spoljašnjoj membrani. To je zbog FtsH posredovane razgradnje LpxC, ključnog enzima u biosintezi LPS-a. Stoga, kod *E. coli*, delecija FtsH zahteva supresorsku mutaciju koja dovodi do regulacije FabZ enzima potrebnog za biosintezu masnih kiselina. Ova supresorska mutacija dovodi do ravnoteže u odnosu LPS-a i fosfolipida u *ftsH* delecionom mutantu [47]. Ovakvi mutanti bakterije *E. coli* su otporni na nukleazne kolicine, koji su analogni piocinima kod *P. aeruginosa*. Tačkaste mutacije koje utiču samo na proteaznu ili samo na ATPaznu aktivnost FtsH takođe čine ćelije otpornim na kolicine, što znači da funkcije FtsH moraju biti očuvane za unos nukleaza kolicina [48]. Kod *P. aeruginosa* je sinteza LPS-a drugačije regulisana, pa *ftsH* nije esencijalan gen. Čisti delecioni mutanti ove bakterije su rezistentni na sve do sada poznate nukleazne piocine. Sve ovo ukazuje da FtsH ima konzerviranu ulogu u prenosu nukleaznih bakteriocina preko unutrašnje membrane [28].

Nije poznato kako je FtsH uključen u unos piocina. Ako je FtsH direktno uključen u unos, to bi značilo da piocini prolaze kroz poru FtsH heksamera kako bi ušli u citoplazmu. Pre toga, piocini bi mogli da se ubace u unutrašnju membranu, budući da nije ustanovljeno postojanje periplazmatskih supstrata za FtsH. Ubacivanje u membranu i formiranje kanala u planarnim lipidnim dvoslojima su demonstrirani za neke kolicine [49, 50], tako da ubacivanje u membranu može biti korak u transportu piocina koji prethodi ulasku u poru FtsH. Pored FtsH, TonB sistem je takođe neophodan za transport kroz unutrašnju membranu, kao što je demonstrirano na piocinu G i sferoplastima *P. aeruginosa*. Piocin G je nukleaza koja ulazi u citoplazmu. Sferoplasti su hemijski tretirane bakterijske ćelije u kojima je povećanja propustljivost kroz spoljašnju membranu i peptidoglikanski sloj, te piocin slobodno prolazi kroz ove slojeve nezavisno od transportera u spoljašnjoj membrani. Ovakve ćelije su pogodan sistem za izolovanje koraka u transportu piocina koji se dešavaju u unutrašnjoj membrani. U sferoplastima kod kojih je deletiran ili FtsH ili TonB1 se gubi unos piocina [28]. Moguće je da na neki način TonB posreduje u ovom koraku, makar tako što dokira piocin na površini

unutrašnje membrane i usmerava ga u naredni korak u transportu. Još jedno pitanje je da li piocin ulazi u FtsH prsten kako bi ušao u citoplazmu. U tom slučaju bi piocin bio izložen proteaznoj aktivnosti FtsH i koraku razgradnje pre ulaska u citoplazmu. Proteolitička obrada tokom unosa je zaista demonstrirana za neke kolicine [51,52], gde je oslobođeni citotoksični domen detektovan u citoplazmi *E. coli*.

Iako je mnogo detalja vezanih za transport nukleaznih bakteriocina preko unutrašnje membrane još uvek nerazjašnjeno, kod piocina G je otkriven konzervirani domen uključen u ovaj korak unosa. Taj domen je prisutan kod svih bakteriocina sa nukleaznom aktivnošću, dok je odsutan kod onih bakteriocina koji ne ulaze u citoplazmu već toksičnu aktivnost ostvaruju na nivou periplazme. Zbog svoje funkcije, domen je nazvan IMT (IMT, eng. *inner membrane translocation*). Delecija IMT domena ne utiče na prolaz preko spoljašnje, ali inhibira prolaz preko unutrašnje membrane, kao što je pokazano u eksperimentima sa sferoplastima [28]. IMT interaguje sa TonB proteinom, ali nije pokazana interakcija sa FtsH u *in vitro* uslovima. Otkriće IMT domena je značajno za dizajn novih bakteriocina kombinovanjem poznatih domena: integracijom IMT u hibridni piocin moguće je usmeriti taj piocin ka metama u bakterijskoj citoplazmi [24].

Mogućnost terapijske primene piocina

Piocini su pokazali obećavajući terapijski potencijal u različitim *in vivo* modelima zbog svoje snažne i specifične antibakterijske aktivnosti [25]. Ovi proteinski toksini pokazuju jaku aktivnost protiv blisko povezanih bakterijskih sojeva, što ih čini pogodnim za ciljani, usko-specifični pristup u terapiji bakterijskih infekcija. Ovde je navedeno nekoliko piocina i tailocina koji su trenutno u fokusu pred-kliničkih ispitivanja:

1. Piocin G: U studiji koja je uključivala larve velikog voštanog moljca (*Galleria mellonella*), pokazano je da piocin G štiti od infekcije sa letalnom dozom *P. aeruginosa* kada se daje 3 sata nakon infekcije [26]. Slični zaštitni efekti su zabeleženi u modelima infekcije pluća kod miševa, gde su i drugi piocini (AP41, S2, S5 i L1) pokazali značajnu efikasnost u smanjenju broja bakterija u inficiranom tkivu [25].
2. Tailocin R2: Ovaj tailocin je evaluiran u modelu peritonitisa kod miševa, gde je efikasno lečio infekcije *P. aeruginosa*. Studija je istakla važnost puta primene, pri čemu je intraperitonealna injekcija bila efikasnija od intravenozne injekcije. Takođe je utvrđeno da piocin R2 zadržava svoju efikasnost kada se daje do 4 sata nakon infekcije [53].
3. Enterokolicin: R-tip tailocina iz *Yersinia enterocolitica* testiran je na miševima zaraženim oralno sa *Y. enterocolitica*. Tailocin je značajno smanjio broj bakterija kada je primenjen 1 sat nakon infekcije [54].

Ove studije naglašavaju potencijal piocina da služe kao efikasni tretmani protiv *P. aeruginosa* i drugih Gram-negativnih bakterijskih infekcija. No razvoj piocina u nove antibiotike ima nekoliko prednosti i izazova koje treba rešiti da bi se ostvario njihov terapijski potencijal.

Prednosti:

1. Visoka specifičnost: Piocini ciljaju specifične bakterijske sojeve, minimizirajući efekte na druge bakterije i očuvanje mikrobioma domaćina [25]. Ova specifičnost smanjuje rizik od disbioze i sekundarnih infekcija, što su uobičajeni problemi kod antibiotika širokog spektra.
2. Nizak razvoj otpornosti: Jedinstveni način delovanja piocina, koji često uključuje ulazak posredovan receptorima i citotoksičnost, otežava bakterijama razvoj otpornosti. Studije su pokazale minimalan razvoj otpornosti kod bakterija izloženih piocinima [25], u prilog čemu ide i esencijalnost receptora za piocine u preživljavanju *P. aeruginosa* u uslovima infekcije [55].

3. Snažna aktivnost: Piocini su pokazali visoku potentnost *in vivo*, često nadmašujući tradicionalne antibiotike u modelima infekcije. Na primer, piocin S5 je bio značajno efikasniji od tobramicina u modelu infekcije pluća kod miševa [27].

Izazovi:

1. Proizvodnja i prečišćavanje: Proizvodnja i prečišćavanje piocina u velikim razmerama predstavljaju značajne tehničke i ekonomske izazove. Ovi proteini moraju biti proizvedeni u dovoljnim količinama i čistoći za terapeutske svrhe.

2. Stabilnost i dostava: Obezbeđivanje stabilnosti piocina u ljudskom telu i razvoj efikasnih mehanizama dostave su ključni za njihov uspeh kao terapijskih sredstava. Piocini moraju biti sposobni da dođu do mesta infekcije u aktivnom obliku.

3. Imunogenost: Kao terapijska sredstva na bazi proteina, piocini mogu izazvati imunološke odgovore [25]. Upravljanje potencijalnom imunogenošću i osiguranje da ponovljena primena ne dovede do neutralizujućih antitela je esencijalno.

Razumevanje mehanizama unosa piocina je ključno za njihov razvoj u antibiotike. Piocini obično koriste specifične receptore i transportne sisteme na površini bakterijske ćelije da bi ušli u nju i ostvarili svoje toksično dejstvo. Detaljno poznavanje ovih puteva može informisati dizajn novih piocina sa poboljšanom specifičnošću i efikasnošću. Pri tome pomaže i modularnost strukture piocina, gde se novi piocini mogu dizajnirati kombinovanjem poznatih piocinskih domena. Na primer, identifikovanjem i ciljanjem konzervisanih receptora među patogenim sojevima, piocini mogu biti dizajnirani da imaju širu ili precizniju antibakterijsku aktivnost. Za to je neophodno poznavati tačno mesto vezivanja piocina na receptoru. Do sada je to uspešno otkriveno samo za piocin S2 [35]. Takođe, poznavanje mehanizama unosa piocina je prvi korak u poboljšanju efikasnosti translokacije u bakterijske ćelije, čime se može povećati njihova baktericidna aktivnost. Da bi se piocini unapredili kao održive antibiotske terapije, buduća istraživanja bi trebalo da se fokusiraju na nekoliko ključnih oblasti:

1. Optimizacija metoda proizvodnje: Razvijanje ekonomičnih tehnika za proizvodnju piocina će biti ključno. Napredak u tehnologiji rekombinantne DNK i fermentacionim procesima može to da olakša.

2. Formulacija i dostava: Istraživanje različitih strategija formulacije za poboljšanje stabilnosti i biodostupnosti piocina je neophodno. Na primer, enkapsulacija u nanočestice može zaštititi piocine od degradacije i poboljšati ciljanu dostavu.

3. Studije sigurnosti i efikasnosti: Sveobuhvatna preklinička i klinička ispitivanja su potrebna da bi se procenila sigurnost, efikasnost i imunogenost terapija zasnovanih na piocinima kod ljudi. Ove studije će pomoći u uspostavljanju optimalnih režima doziranja i identifikaciji potencijalnih neželjenih efekata.

4. Kombinovanje sa drugim terapijama: Istraživanje sinergističkih efekata piocina sa postojećim antibioticima ili drugim antimikrobnim sredstvima može povećati njihov terapeutski potencijal i pomoći u prevazilaženju otpornosti.

U zaključku, piocini predstavljaju obećavajuću klasu proteinskih antibiotika sa potencijalom da odgovore na kritičnu potrebu za novim tretmanima protiv multirezistentnih sojeva *P. aeruginosa* i drugih Gram-negativnih patogena. Kontinuirani napor u istraživanju i razvoju su neophodni da bi se otključao njihov puni terapeutski potencijal i kako bi se ovi novi agensi doveli do kliničke upotrebe.

Zahvalnica

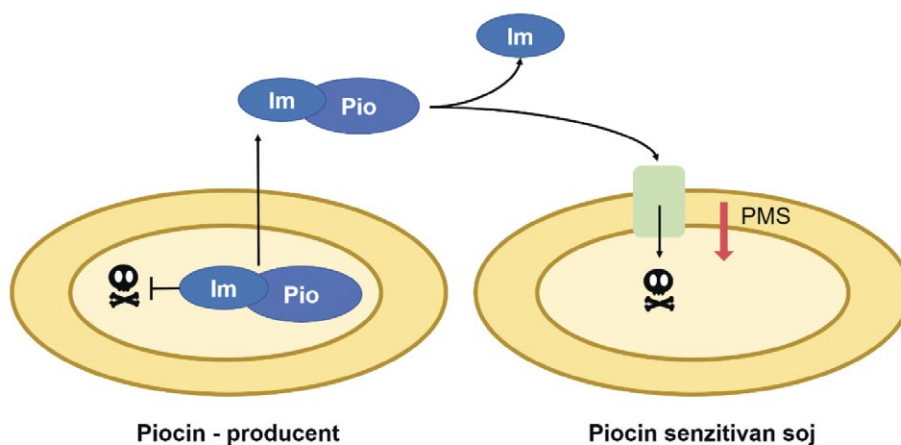
Autorka je zahvalna članovima Kleanthous laboratorije na Univerzitetu u Oksfordu na mentorstvu pri izradi doktorske disertacije čiji su rezultati prikazani u ovom radu. Prof. Dr Colin Kleanthous je bio primarni mentor prikazane disertacije i učestvovao je u osmišljanju istraživanja i eksperimentalnom dizajnu. Dr Nick Housden je bio laboratorijski mentor, koji je pomogao pri dizajnu i sprovođenju prikazanih eksperimenata.

Reference

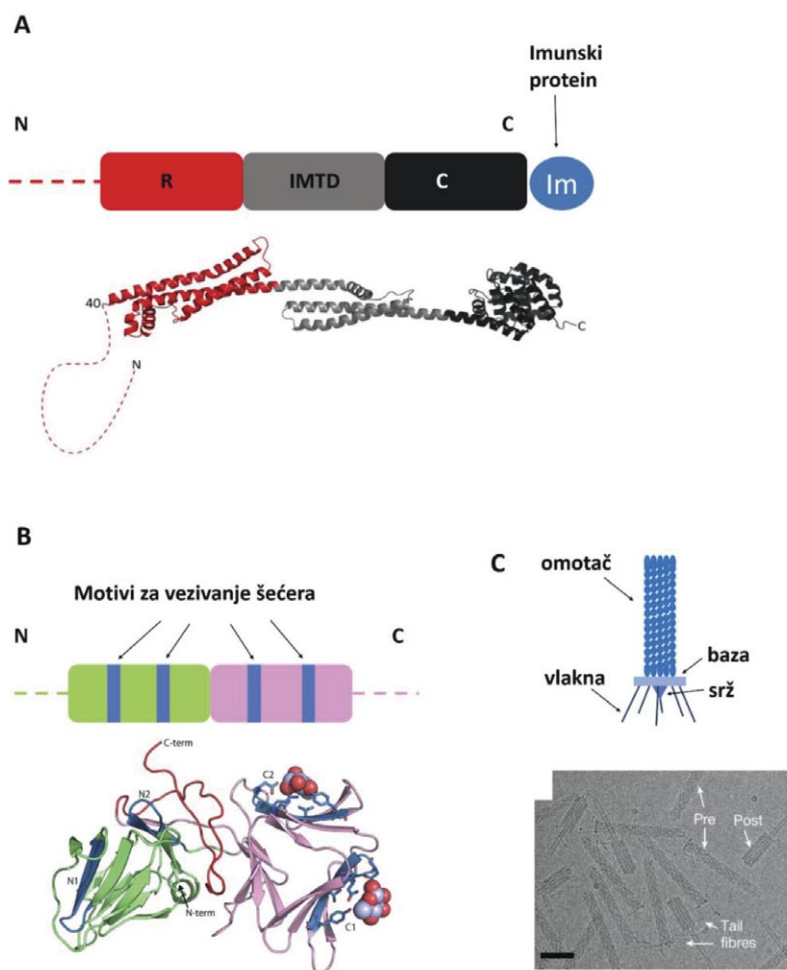
1. WHO. 2017. WHO Publishes List of Bacteria for which New Antibiotics Are Urgently Needed, WHO
2. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Front Microbiol.* 2024; 15:1374466.
3. Yin R, Cheng J, Wang J, Li P, Lin J. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. *Front Microbiol.* 2022;13:955286.
4. Reyne N, McCarron A, Cmielewski P, Parsons D, Donnelley M. To bead or not to bead: A review of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection models for cystic fibrosis. *Front Physiol.* 2023;14:1104856.
5. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:39.
6. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today* 2019; 24:350-359.
7. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:582-610.
8. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 2019; 37:177-192.
9. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev* 2017; 41:698-722.
10. Hill PJ, Scordo JM, Arcos J, Kirkby SE, Wewers MD, Wozniak DJ et al. Modifications of *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope in the cystic fibrosis airway alters interactions with immune cells. *Sci Rep* 2017; 7:4761.
11. Hancock RE, Brinkman FS. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56:17-38.
12. Smith AD, Wilks A. Differential contributions of the outer membrane receptors PhuR and HasR to heme acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2015; 290:7756-66.
13. Lhospice S, Gomez NO, Ouerdane L, Brutesco C, Ghssein G, Hajjar C et al. *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Sci Rep* 2017; 7:17132.
14. Quintana J, Novoa-Aponte L, Argüello JM. Copper homeostasis networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2017; 292:15691-15704.
15. Quesada JM, Otero-Asman JR, Bastiaansen KC, Civantos C, Llamas MA. The Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Regulator σ (Vrel) Is Modulated by the Anti- σ Factor VreR and the Transcription Factor PhoB. *Front Microbiol* 2016; 7:1159.
16. Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, Ma S. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front Microbiol* 2015; 6:377.
17. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2015; 6:660.
18. Shigemura K, Osawa K, Kato A, Tokimatsu I, Arakawa S, Shirakawa T et al. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. *J Antibiot (Tokyo)* 2015; 68:568-72.
19. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300(8):534-43.
20. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7(1):199.
21. Horna G, Ruiz J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res.* 2021; 246:126719.

22. Chen L, Zou Y, She P, Wu Y. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res.* 2015;172:19-25.
23. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Llobès R, Postle K et al. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71:158-229.
24. Atanaskovic I, Kleanthous C. Tools and Approaches for Dissecting Protein Bacteriocin Import in Gram-Negative Bacteria. *Front Microbiol* 2019; 10:646.
25. Behrens H, Six A, Wlker D, Kleanthous C. The Therapeutic Potential of Bacteriocins as Protein Antibiotics. *Emerg Top Life Sci* 2017; 1:65–74.
26. Atanaskovic I, Mosbahi K, Sharp C, Housden NG, Kaminska R, Walker D, Kleanthous C. Targeted Killing of *Pseudomonas aeruginosa* by Pyocin G Occurs via the Hemin Transporter Hur. *J Mol Biol* 2020; 432(13):3869-3880.
27. Behrens HM, Lowe ED, Gault J, Housden NG, Kaminska R, Weber TM et al. Pyocin S5 Import into *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Generic Mode of Bacteriocin Transport. *mBio* 2020; 11: e03230-19.
28. Atanaskovic I, Sharp C, Press C, Kaminska R, Kleanthous C. Bacterial Competition Systems Share a Domain Required for Inner Membrane Transport of the Bacteriocin Pyocin G from *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2022; 13(2):e0339621.
29. Six A, Mosbahi K, Barge M, Kleanthous C, Evans T, Walker D. Pyocin efficacy in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76(9):2317-2324.
30. Ghequire MGK, Swings T, Michiels J, Buchanan SK, De Mot R. Hitting with a BAM: Selective Killing by Lectin-Like Bacteriocins. *mBio.* 2018; 9(2):e02138-17.
31. Duché D, Frenkian A, Prima V, Llobès R. Release of immunity protein requires functional endonuclease colicin import machinery. *J Bacteriol.* 2006; 188:8593-8600.
32. Ge P, Scholl D, Prokhorov NS, Avaylon J, Shneider MM, Browning C et al. Action of a minimal contractile bactericidal nanomachine. *Nature* 2020; 580:658-667.
33. Carim S, Azadeh AL, Kazakov AE, Price MN, Walian PJ, Lui LM et al. Systematic discovery of pseudomonad genetic factors involved in sensitivity to tailocins. *ISME J.* 2021; 15(8):2289-2305.
34. Patz S, Becker Y, Richert-Pöggeler KR, Berger B, Ruppel S, Huson DH et al. Phage tail-like particles are versatile bacterial nanomachines - A mini-review. *J Adv Res.* 2019; 19:75-84.
35. White P, Joshi A, Rassam P, Housden NG, Kaminska R, Goult JD et al. Exploitation of an iron transporter for bacterial protein antibiotic import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114:12051-12056.
36. Shen J, Meldrum A, Poole K. FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2002;184(12):3268-75.
37. Schalk IJ, Perraud Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environ Microbiol.* 2023; 25(4):811-831.
38. Mamou G, Corona F, Cohen-Khait R, Housden NG, Yeung V, Sun D et al. Peptidoglycan maturation controls outer membrane protein assembly. *Nature.* 2022; 606(7916):953-959.
39. Celia H, Botos I, Ni X, Fox T, De Val N, Llobes R, Jiang J, Buchanan SK. Cryo-EM structure of the bacterial Ton motor subcomplex ExbB-ExbD provides information on structure and stoichiometry. *Commun Biol.* 2019; 2:358.
40. Postle K, Kadner RJ. Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol* 2003; 49:869-82.
41. Hickman SJ, Cooper REM, Bellucci L, Paci E, Brockwell DJ. Gating of TonB-dependent transporters by substrate-specific forced remodelling. *Nat Commun* 2017; 8:14804.
42. Shirley M, Lamont IL. Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2009; 191:5634-40.
43. Zhao Q, Poole K. A second tonB gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the exbB and exbD genes. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 184:127-32.
44. Huang B, Ru K, Yuan Z, Whitchurch CB, Mattick JS. TonB3 is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J Bacteriol* 2004; 186:4387-9.
45. Yi L, Liu B, Nixon PJ, Yu J, Chen F. Recent Advances in Understanding the Structural and Functional Evolution of FtsH Proteases. *Front Plant Sci.* 2022; 13:837528.
46. Liu W, Schoonen M, Wang T, McSweeney S, Liu Q. Cryo-EM structure of transmembrane AAA+ protease FtsH in the ADP state. *Commun Biol.* 2022; 5(1):257.

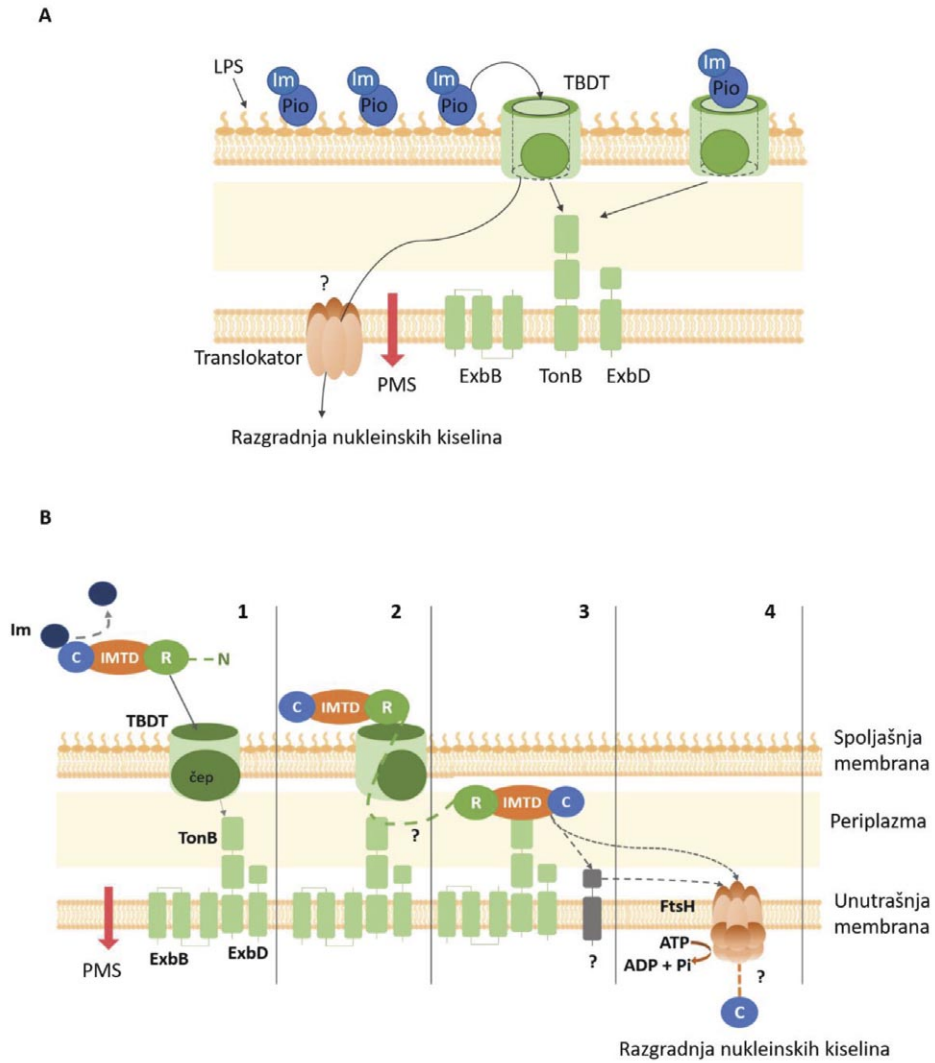
47. Schakermann M, Langklotz S, Narberhaus F. FtsH-mediated coordination of lipopolysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* correlates with the growth rate and the alarmone (p)ppGpp. *J Bacteriol* 2013; 195:1912-9.
48. Walker D, Mosbahi K, Vankemmelbeke M, James R, Kleanthous C. The role of electrostatics in colicin nuclease domain translocation into bacterial cells. *J Biol Chem* 2007; 282:31389-97.
49. Mosbahi K, Lemiatre C, Keeble AH, Mosbaheri H, Morel B, James R et al. The cytotoxic domain of colicin E9 is a channel-forming endonuclease. *Nature Structural Biology* 2002; 9:476-84.
50. Vankemmelbeke M, O Shea P, James R, Penfold CN. Interaction of nuclease colicins with membranes: insertion depth correlates with bilayer perturbation. *PLoS One* 2012; 7:e46656.
51. Chauleau M, Mora L, Serba J, de Zamaroczy M. FtsH-dependent processing of RNase colicins D and E3 means that only the cytotoxic domains are imported into the cytoplasm. *J Biol Chem* 2011; 286:29397-407.
52. Mora L, de Zamaroczy M. In vivo processing of DNase colicins E2 and E7 is required for their import into the cytoplasm of target cells. *PLoS One*. 2014; 9(5):e96549.
53. Scholl D, Martin DW Jr. Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(5):1647-52.
54. Damasko C, Konietzny A, Kaspar H, Appel B, Dersch P, Strauch E. Studies of the efficacy of Enterocolitacin, a phage-tail like bacteriocin, as antimicrobial agent against *Yersinia enterocolitica* serotype O3 in a cell culture system and in mice. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005; 52(4):171-9.
55. Smith DJ, Lamont IL, Anderson GJ, Reid DW. Targeting iron uptake to control *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2013; 42(6):1723-36.
56. McCaughey LC, Grinter R, Josts I, Roszak AW, Waløen KI, Cogdell RJ et al. Lectin-like bacteriocins from *Pseudomonas* spp. utilise D-rhamnose containing lipopolysaccharide as a cellular receptor. *PLoS Pathog*. 2014; 10(2):e1003898.



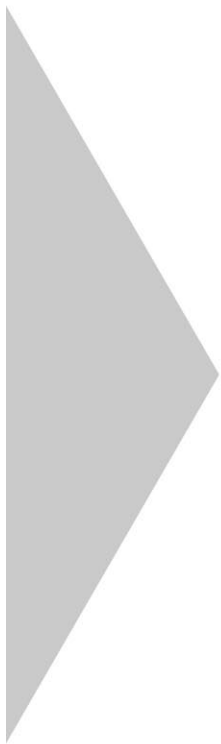
Slika 1. Uloga piocina u intraspecijskoj kompeticiji kod Gram-negativnih bakterija. Piocin (Pio) je u ćelijama produkdujućeg soja vezan za imunski protein (Im) koji inhibira njegovo toksično dejstvo. Kompleks se vezuje za receptor na površini ćelija senzitivnog soja, koji ne produkduje imunski protein. Da bi ubio ćeliju, bakteriocin mora da prođe ćelijski zid na način koji zavisi od protonске motorne sile (PMS). Slika adaptirana iz Atanaskovic et al. 2019 [24].



Slika 2. Strukturna raznovrsnost piocina. Na osnovu njihove strukture, složenosti i organizacije, piocini se dele na modularne piocine (A), lektinima slične piocine (B) i tailocine (C). A – Domeni modularnih piocina, receptor vezujući domen (R), domen za translokaciju kroz unutrašnju ćelijsku membranu (IMTD) i citotoksični domen (C) koji gradi kompleks sa imunskim proteinom (Im). Prikazana je struktura piocina S2 preuzeta iz White et al. 2017 [35]. B – Kristalna struktura lektinima sličnom piocinu, L1 (ostaci 2-256) u kompleksu sa α -D-ramnozom. Prikaz strukture je preuzet iz McCaughey et al. 2014 [56]. C – strukturne komponente tailocina i izgled pod elektronskim mikroskopom. Mikrografija je preuzeta iz Ge et al. 2020 [32].



Slika 3. Sadašnji model unosa piocina u Gram-negativnu bakterijsku ćeliju. A – dve grupe mehanizama unosa se razlikuju po molekularnoj prirodi receptora za piocin. B – molekularni detalji unosa po fazama; 1 – vezivanje za receptor, 2 – prolazak kroz TonB zavisni transporter (TBDT), 3 – pozicioniranje u periplazmi, 4 – prolazak kroz unutrašnju ćelijsku membranu. Slika adaptirana iz Atanaskovic et al. 2022 [28].



Z-MOLEKULARCI

MOLECULAR BIOLOGISTS OF Z GENERATION



Uloga glukozo-6-fosfat translokaze u procesu aktivacije autofagije kod glikogenoze tip Ib

Nikola Jocić, Anita Skakić

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

Kontakt: nikola.jocic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Glukozo-6-fosfat translokaza (G6PT), kodirana genom *SLC37A4*, neophodna je za transport glukozo-6-fosfata iz citoplazme u lumen endoplazmatičnog retikuluma, gde se dalje hidrolizuje uz pomoć glukozo-6-fosfataze. Ovaj proces igra ključnu ulogu u održavanju homeostaze glukoze, posebno u jetri, bubrezima i drugim tkivima. Međutim, osim svojih metaboličkih funkcija, novi dokazi sugerišu da protein G6PT može takođe biti uključen u regulaciju procesa energetske homeostaze ćelija, kao što je autofagija, mehanizam koji ćelije koriste za razgradnju i recikliranje oštećenih organela, pogrešno savijenih proteina i drugih ćelijskih komponenti. U ovom radu predstavljena su dosadašnja saznanja koja govore u prilog postojanju dodatne funkcije G6PT u aktivaciji autofagije nezavisno od njene transportne aktivnosti.

Ključne reči: glikogenoza tip Ib, glukozo-6-fosfat translokaza, autofagija

Role of the glucose-6-phosphate translocase in the activation of autophagy in glycogen storage disease type Ib

Nikola Jovic, Anita Skakic

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

Correspondence: nikola.jovic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

The glucose-6-phosphate translocase (G6PT), encoded by the *SLC37A4* gene, is essential for transporting glucose-6-phosphate from the cytoplasm into the lumen of the endoplasmic reticulum, where it is hydrolyzed by glucose-6-phosphatase. This process plays a key role in maintaining glucose homeostasis, particularly in the liver, kidney, and other tissues. However, beyond its metabolic functions, emerging evidence suggests that G6PT may also be involved in the regulation of cellular homeostasis processes, such as autophagy, a mechanism that cells use to degrade and recycle damaged organelles, misfolded proteins, and other cellular components.

Key words: glycogen storage disease type Ib; glucose-6-phosphate translocase; autophagy

GLIKOGENOZA TIP Ib

Glikogenoza tip I (GSD I) je retka autozomno-recesivna bolest koja se karakteriše metaboličkim poremećajima glukoneogeneze i glikogenolize i obuhvata dva podtipa: GSD Ia (OMIM #232200) i GSD Ib (OMIM #232220) (1). U svetskoj populaciji preko 80% slučajeva GSD I čini podtip Ia (2). Međutim, epidemiološki podaci i zapažanja iz prethodne studije pokazuju jedinstveni obrazac incidencije GSD Ib od 74% u populaciji GSD I bolesnika iz Srbije (3).

GSD Ib nastaje usled prisustva patogenih genetičkih varijanti u genu *SLC37A4* koji kodira za ubikvitarno eksprimiran protein glukozo-6-fosfat translokazu (eng. *Glucose-6-Phosphate Translocase*, G6PT). Ovaj transporter je deo proteinskog kompleksa koji se sastoji od G6PT i glukozo-6-fosfataze- α (eng. *Glucose-6-Phosphatase- α* , G6Paze- α)/glukozo-6-fosfataze- β (eng. *Glucose-6-Phosphatase- β* , G6Paze- β), čiji se šematski prikaz nalazi na Slici 1. Primarna funkcija proteina G6PT je da transportuje glukozo-6-fosfat (eng. *Glucose-6-Phosphate*, G6P) iz citoplazme u lumen endoplazmatičnog retikuluma (ER) (4) gde G6P biva hidrolizovan na glukozu i neorganski fosfat (Pi) od strane G6Paze- α u jetri, bubrezima i intestinalnoj mukozii ili G6Paze- β u ostalim tkivima (5). Funkcionalni kompleks G6PT/G6Paze- α održava homeostazu glukoze u krvi između obroka, dok funkcionalni kompleks G6PT/G6Paze- β održava energetska homeostazu i funkcionalnost neutrofila i makrofaga (2). Usled narušene transportne aktivnosti G6PT kod osoba obolelih od GSD Ib dolazi do nagomilavanja G6P u jetri što dovodi do promene njegovog metaboličkog puta i nagomilavanja glikogena (6). Takođe, kod osoba obolelih od GSD Ib dolazi i do razvoja neutropenije, inflamatorne bolesti creva i anemije (7).

G6PT I ENERGETSKA HOMEOSTAZA ČELIJE

Protein G6PT je ukotvljen u membranu ER pomoću 10 transmembranskih heliksa dok su N- i C-terminalni domeni okrenuti ka citoplazmi (8) (Slika 2). U funkcionalnim studijama dokazano je da prva luminalna petlja proteina G6PT (od 27. do 77. aminokiseline) igra ulogu u transportnoj aktivnosti G6PT (8). Pokazano je da prisustvo patogenih varijanti u prvoj luminalnoj petlji proteina G6PT dovodi do narušavanja transportne aktivnosti ovog proteina, ali i do njegove prekomerne ekspresije i ugrađivanja u membranu ER (9) što je dovelo do postavljanja hipoteze da ovaj protein, pored transportne, može imati i drugu ulogu, potencijalno u procesu aktivacije autofagije.

Autofagija predstavlja visoko konzerviran proces razgradnje proteina nepravilne konformacije, oštećenih organela, patogena i prekomernog citosola (10). Usled smanjene količine hranljivih materija, neesencijalni proteini se razgrađuju u lizozomu, a dobijene aminokiseline se koriste u procesu glukoneogeneze, proizvodnji adenosin trifosfata (ATP) ili za sintezu novih proteina (11). Produkti razgradnje se zatim vraćaju u citosol kako bi poslužili u recikliranju makromolekula i kako bi obezbedili energiju neophodnu za preživljavanje ćelije u nepovoljnim uslovima (12). Prilikom odvijanja inicijacije autofagije citoplazmatski materijal biva enkapsuliran unutar membrane autofagozoma (13). Nakon fuzije autofagozoma i lizozoma u autofagolizozom, enzimi lizozoma degraduju unutrašnji sadržaj koji će nakon transporta u citosol poslužiti za procese izgradnje makromolekula i dobijanja energije (Slika 3).

G6PT igra značajnu ulogu u metabolizmu glukoze posredovanjem u transportu G6P za proizvodnju glukoze, što je ključno za stvaranje ATP-a i održavanje nivoa ćelijske energije (14). Kada je G6PT deficitaran, kao što je to slučaj kod GSD Ib, nedostatak glukoze remeti proizvodnju energije, što može stimulisati autofagiju da nadoknadi energetska deficit (11). Ovo smanjenje energije dovodi do aktivacije protein kinaze AMP (eng. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK), ključnog energetskog senzora koji

inicira autofagiju kada se nivoi ATPa u ćeliji istroše (15). Smanjena mobilizacija glukoze u ćelijama sa nedostatkom G6PT mogla bi da aktivira AMPK, promovišući autofagiju kao sredstvo za generisanje energije iz intracelularnih komponenti.

Takođe, kod GSD Ib usled narušene homeostaze glukoze u organizmu dolazi do promena na ćelijskom nivou koje obuhvataju povišen nivo stresa ER-a i apoptoze (16). S obzirom na ulogu G6PT u održavanju metabolizma glukoze u ER-a, njegov nedostatak bi mogao da pogorša stres ER-A, što, zauzvrat, može dovesti do aktivacije autofagije (17). Kod GSD Ib patogene genetičke varijante u proteinu G6PT povezane su sa hroničnim stresom ER-a, što je pokazano na hepatičnim i bubrežnim ćelijama (16). Hroničan stres ER-a doprinosi povećanom odvijanju autofagije koji umesto protektivne uloge može dovesti do oštećenja i narušene funkcije ćelije (11).

REGULACIJA AUTOFAGIJE: G6PT I mTOR

Neki od najznačajnijih proteina koji imaju ulogu u regulaciji autofagije jesu: mTORC1 (eng. *mammalian target of rapamycin complex 1*), ULK1 (eng. *unc-51-like autophagy activating kinase 1*) i AMPK (eng. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*). Protein ULK1 predstavlja mesto konvergencije signala koji potiču od proteina AMPK i mTORC1, od kojih će zavisići da li će autofagija biti aktivirana ili ne. Fosforilacija proteina ULK1, kao i sama aktivacija autofagije, predmet je dualnog signalnog puta koji odgovara na prisustvo nutrijenata i raspoložive energije u ćeliji (12). Usled narušene aktivnosti G6PT kod GSD Ib dolazi do preusmeravanja G6P u druge metaboličke puteve što dovodi do smanjenog nivoa dostupne glukoze (18). Smanjenje energetske rezerve u ćeliji povećava kinaznu aktivnost proteina AMPK (19) koja stimuliše autofagiju, između ostalog, inhibirajući mTORC1 i fosforilišući i aktivirajući ULK1 (20). Sa druge strane, povećana količina glukoze u ćeliji dovodi do povećane količine acetil-CoA koji inhibira fosforilaciju AMPK, što za posledicu ima izostanak inhibicije mTORC1 i izostanak aktivacije autofagije (21) (Slika 4).

U uslovima povećane količine hranljivih materija aktivnost mTOR je povećana što dovodi do suprimiranja autofagije. Suprotno, u uslovima smanjene količine hranljivih materija aktivnost mTOR je snižena što za posledicu ima aktivaciju autofagije (22). U uslovima smanjene količine dostupne glukoze, usled narušene aktivnosti proteina G6PT, može doći do inhibiranja mTOR i aktivacije autofagije kao kompenzacijskog odgovora (16). Pokazana je povišena ekspresija markera autofagije LC3-II i p62 na ćelijskim modelima GSD Ib, što govori o povišenom odvijanju autofagije kao odgovoru na narušenu homeostazu glukoze (23).

U studiji na G6PT-deficijentnim humanim embrionalnim bubrežnim ćelijama (eng. *Human Embryonic Kidney 293*, HEK293) i humanim tumorskim ćelijama jetre (eng. *Human hepatocyte carcinoma 3B*, Hep3B) prvi put je ukazano da protein G6PT može imati ulogu u aktivaciji autofagije koja je nezavisna od njegove transportne aktivnosti (23). Naime, kreirani su mutanti ćelijskih linija HEK293 i Hep3B koji su eksprimirali protein G6PT ukotvljen u membranu ER-a sa narušenom transportnom aktivnošću i uočena je povišena ekspresija proteina zaduženih za aktivaciju procesa autofagije (23). Demonstriran je i značaj signalizacije između proteina G6PT i proteinskog kompleksa mTORC1 (čiji centralni deo predstavlja protein mTOR) u aktivaciji autofagije, ali se postavlja pitanje na koji način dolazi do interakcije ova dva proteina s obzirom da se G6PT nalazi ukotvljen u membrani ER-a. Smatra se da protein G6PT reguliše aktivnost proteinskog kompleksa mTORC1 preko proteina AMPK koji ima ulogu ćelijskog senzora i koji predstavlja jedan od proteina zaduženih za aktivaciju autofagije i da u slučajevima nedostatka proteina G6PT dolazi do smanjenog nivoa aktiviranog proteina AMPK (23). Takođe, rezultati studije na transgenim miševima kojima

nedostaje funkcionalan protein G6PT (G6pt^{-/-}) pokazuju smanjeni nivo autofagije u jetri okarakterisan smanjenom ekspresijom brojnih proteina uključenih u proces autofagije i smanjeno formiranje autofagozoma (6).

ZAKLJUČAK

Uloga G6PT u metabolizmu glukoze seže izvan regulacije energije, utičući na ćelijske procese kao što je autofagija. Nedostatak G6PT, kao što se vidi u GSD Ib, može dovesti do povećane autofagne aktivnosti kao kompenzacionog odgovora na iscrpljivanje energije i stres ER-a. Dok autofagija u početku pomaže u obnavljanju ćelijske homeostaze, prekomerna ili neregulisana autofagija može doprineti ćelijskoj disfunkciji. Potrebna su buduća istraživanja kako bi se istražili precizni mehanizmi pomoću kojih G6PT modulira autofagiju što potencijalno može imati i terapijski značaj s obzirom da bi podsticanjem razgradnje glikogena kod osoba obolelih od ove bolesti bio nadoknađen smanjen nivo dostupne glukoze.

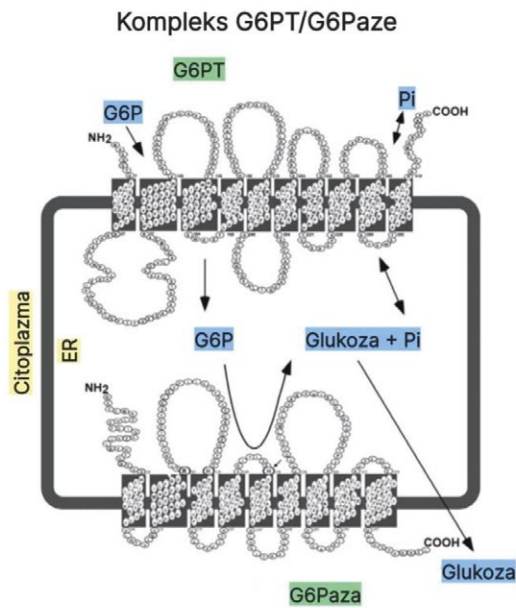
ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije – broj ugovora 451-03-66/2024-03/200042.

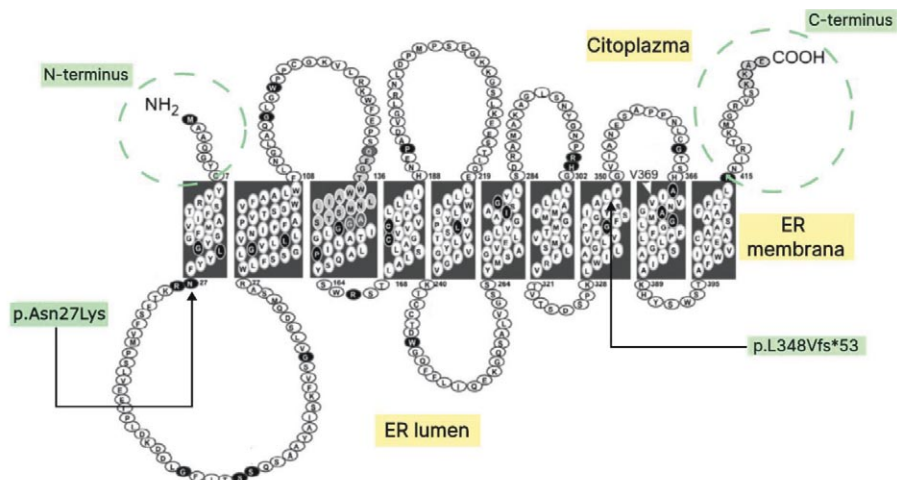
LITERATURA

1. Sim SW, Weinstein DA, Lee YM, Jun HS. Glycogen storage disease type Ib: role of glucose-6-phosphate transporter in cell metabolism and function. *FEBS Lett.* 2020; 594(1):3–18.
2. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase/glucose-6-phosphate transporter complexes. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38(3):511–9.
3. Skacic 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.
4. Chou JY, Mansfield BC. The SLC37 Family of Sugar-Phosphate/Phosphate Exchangers. *Current Topics in Membranes.* Elsevier; 2014. p.357–82.
5. Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Chou JY. Histidine 167 is the phosphate acceptor in glucose-6-phosphatase-beta forming a phosphohistidine enzyme intermediate during catalysis. *J Biol Chem.* 2004; 279(13):12479–83.
6. Gautam S, Zhang L, Lee C, Arnaoutova I, Chen HD, Resaz R, et al. Molecular mechanism underlying impaired hepatic autophagy in glycogen storage disease type Ib. *Hum Mol Genet.* 2023; 32(2):262–75.
7. Özen H. Glycogen storage diseases: New perspectives. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(17):2541.
8. Chen LY. Structure-function analysis of the glucose-6-phosphate transporter deficient in glycogen storage disease type Ib. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(25):3199–207.
9. Chen SY, Pan CJ, Lee S, Peng W, Chou JY. Functional analysis of mutations in the glucose-6-phosphate transporter that cause glycogen storage disease type Ib. *Mol Genet Metab.* 2008; 95(4):220–3.
10. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 2010; 465(7300):942–6.
11. Andjelkovic M, Skacic A, Ugrin M, Spasovski V, Klaassen K, Pavlovic S, et al. Crosstalk between Glycogen-Selective Autophagy, Autophagy and Apoptosis as a Road towards Modifier Gene Discovery and New Therapeutic Strategies for Glycogen Storage Diseases. *Life (Basel).* 2022;12(9):1396.
12. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 2014; 24(1):24–41.
13. Koutsifeli P, Varma U, Daniels LJ, Annandale M, Li X, Neale JPH, et al. Glycogen-autophagy: Molecular machinery and cellular mechanisms of glyco-phagy. *J Biol Chem.* 2022; 298(7):102093.
14. Veiga-da-Cunha M, Chevalier N, Stephenne X, Defour JP, Paczia N, Ferster A, et al. Failure to eliminate a phosphorylated glucose analog leads to neutropenia in patients with G6PT and G6PC3 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(4):1241-1250.

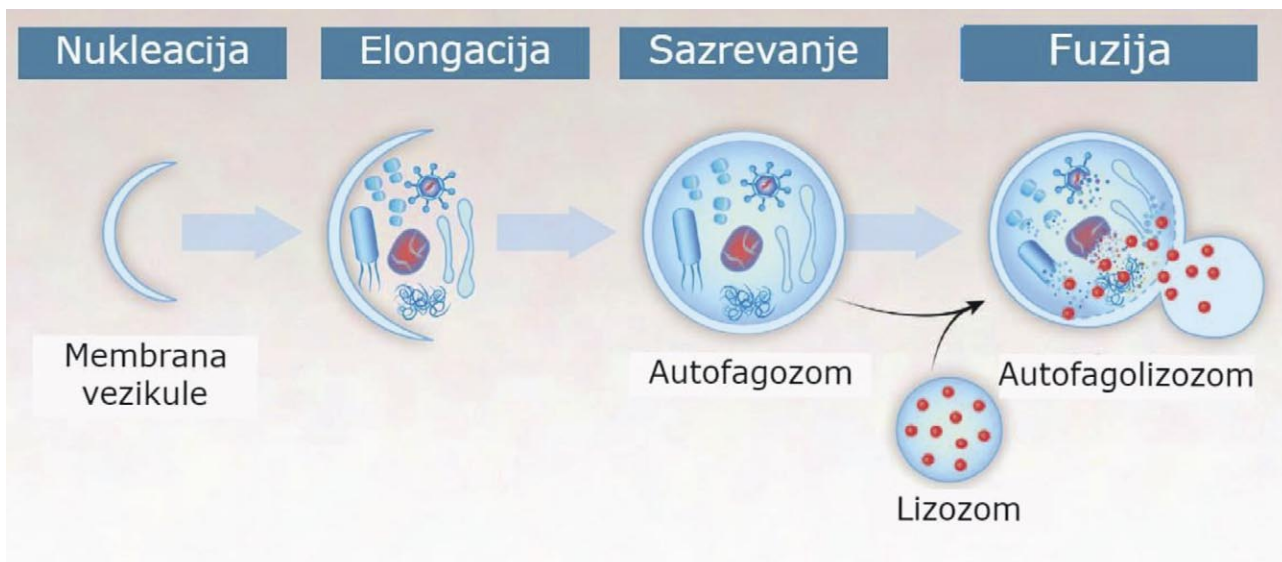
15. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011;13(9):1016-23.
16. Skakic A, Andjelkovic M, Tosic N, Klaassen K, Djordjevic M, Pavlovic S, et al. CRISPR/Cas9 genome editing of SLC37A4 gene elucidates the role of molecular markers of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal involvement in glycogen storage disease type Ib. *Gene.* 2019; 703:17–25.
17. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Glycogen storage disease type I and G6Pase- β deficiency: etiology and therapy. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 6(12):676-88.
18. Chen YT, Kishnani PS, Koeberl D. Glycogen Storage Diseases. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, editors. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease: The McGraw-Hill Companies;* 2006.
19. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(4):251–62.
20. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(2):132–41.
21. Farah BL, Yen PM, Koeberl DD. Links between autophagy and disorders of glycogen metabolism – Perspectives on pathogenesis and possible treatments. *Mol Genet Metab.* 2020; 129(1):3–12.
22. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017;168(6):960-976.
23. Ahn HH, Oh Y, Lee H, Lee W, Chang JW, Pyo HK, et al. Identification of glucose-6-phosphate transporter as a key regulator functioning at the autophagy initiation step. *FEBS Lett.* 2015; 589(16):2100–9.



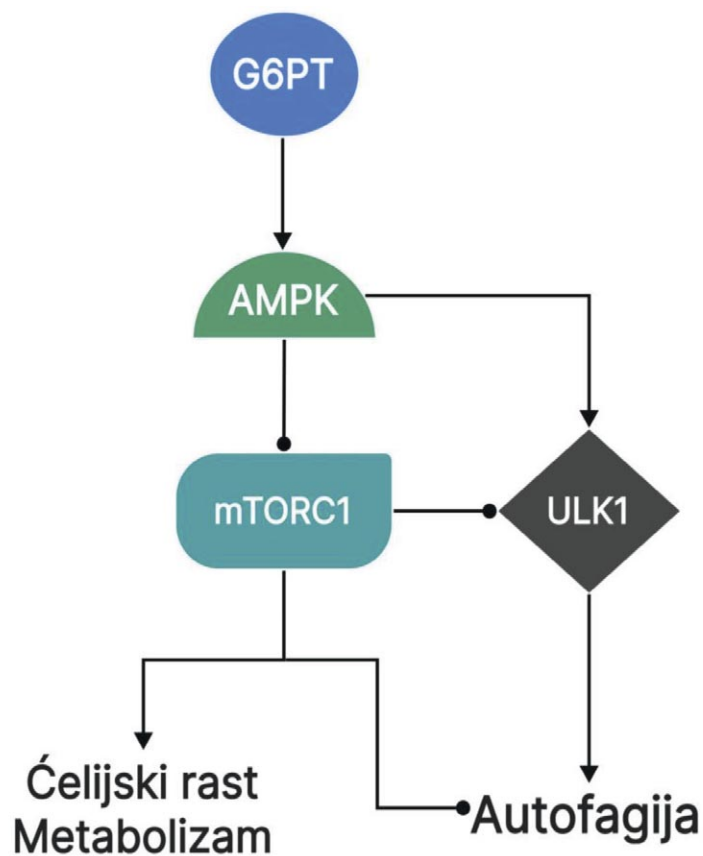
Slika 1. Šematski prikaz kompleksa G6PT/G6Paze. G6P – glukozo-6-fosfat. G6PT – glukozo-6-fosfat translokaza. G6Paze – glukozo-6-fosfataza. ER – endoplazmatični retikulum. Pi – neorganski fosfat (Modifikovano Chou i Mansfield, 2014).



Slika 2. Topologija G6PT. Isprekidanim krugovima obeleženi su N- i C-terminus proteina G6PT. Strelicama su označene varijante proteina G6PT p.As27Lys i p.L348Vfs*53 (Modifikovano Chou i Mansfield, 2014).



Slika 3. Šematski prikaz faza autofagije. (Modifikovano Liu i sar., 2014)



Slika 4. Odnos proteina uključenih u regulaciju autofagije: AMPK, mTORC1 i ULK1. Strelica na kraju duži označava pozitivno dejstvo (aktivacija), dok kružić označava negativno dejstvo (inhibicija).

Karakterizacija ekstracelularnih vezikula porijeklom iz tiroidnih ćelijskih linija i plazme bolesnika sa tiroidnim nodusima

Nevena Bobar, Jelena Janković Miljuš

Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: nevenabobar00@gmail.com

Apstrakt

Tiroidni karcinomi, iako najčešći endokrini maligniteti, predstavljaju dijagnostički izazov kada je u pitanju diferencijacija malignih od benignih tumora. Drugi veliki problem tiroidne onkologije predstavlja detekcija rekurencije kod oko četvrtine oboljelih od diferenciranih tiroidnih karcinoma, kod kojih postoje autoantitijela prema tiroglobulinu, markeru tirocita. Anti-tiroglobulinska antitijela interferiraju u testovima za analizu tiroglobulina, onemogućavajući tačno mjerenje njegovih nivoa u cirkulaciji.

U svrhe poboljšanja dijagnostike veliki broj istraživanja bavi se ispitivanjem potencijala ekstracelularnih vezikula (EV), što iziskuje karakterizaciju njihovih površinskih i unutarvezikularnih konstituenata. U ovoj oblasti najveći broj istraživanja usmjeren je na mikroRNK i lncRNK molekule, dok se manji broj studija bavio proteinskim markerima tiroidnih EV. Dosadašnji rezultati pokazuju značaj miR-146b, miR-222, lncRNK *SNHG9*, kao i drugih RNK molekula, dok su predmet istraživanja proteina EV bili proteini toplotnog šoka, kao i tiroidea-specifični proteini tirotropinski receptor (TSH-R) i tiroglobulin.

Zbog očekivane primjene EV u tiroidnoj onkologiji, postoji opravdana potreba za njihovom karakterizacijom na prisustvo tiroidea-specifičnih površinskih i unutarvezikularnih markera, u cilju njihove efikasnije izolacije i potencijalne dijagnostičke upotrebe.

Ključne riječi: tiroidni nodusi, tiroidni karcinom, ekstracelularne vezikule, tirotropinski receptor, tiroglobulin

Characterisation of extracellular vesicles originating from thyroid cell lines and plasma of patients with thyroid nodules

Nevena Bobar, Jelena Janković Miljuš

Institute for the Application of Nuclear Energy – INEP, University of Belgrade

Correspondence: nevenabobar00@gmail.com

Abstract

Thyroid carcinomas, although the most common endocrine malignancies, present a diagnostic challenge in distinguishing malignant from benign tumors. Another significant issue in thyroid oncology is the detection of recurrence in approximately a quarter of patients with differentiated thyroid carcinomas, who are positive for autoantibodies against thyroglobulin, a marker of thyrocytes. Anti-thyroglobulin antibodies interfere in thyroglobulin assays, rendering its analysis inaccurate.

To improve diagnostics, numerous studies are exploring the potential use of extracellular vesicles (EVs), necessitating the characterization of their surface and intra-vesicular constituents. Most research in this area has focused on microRNA and lncRNA molecules, while fewer studies have investigated protein markers of thyroid EVs.

Current findings highlight the importance of miR-146b, miR-222, lncRNA *SNHG9*, and other RNA molecules, while EVs protein studies have examined HSP and thyroid-specific proteins like thyrotropin receptor (TSH-R) and thyroglobulin.

Given the anticipated application of EVs in thyroid oncology, there is a justified need to characterize them for thyroid-specific surface and intravesicular markers to enhance their isolation and potential diagnostic use.

Key words: thyroid nodules, thyroid cancer, extracellular vesicles, thyrotropin receptor, thyroglobulin

Tiroidni nodusi su česti kod opšte populacije; većina ih je benigne prirode, dok je 7 – 15% dijagnostikovanih tiroidnih nodusa maligne prirode [1, 2]. Karcinom štitaste žlijezde je najčešće dijagnostikovano endokrino malignitet i peti najčešći karcinom kod žena u svijetu [3]. Javlja se u nekoliko podtipova, zavisno od vrste ćelija i histološke arhitekture, od kojih su najučestaliji papilarni (eng. *Papillary Thyroid Carcinoma*, PTC) i folikularni tiroidni karcinomi (*Follicular Thyroid Carcinoma*, FTC), grupisani kao diferencirani tiroidni karcinomi (eng. *Differentiated Thyroid Carcinoma*, DTC), dok su najrjeđe dijagnostikovani anaplastični tiroidni karcinomi (eng. *Anaplastic Thyroid Carcinoma*, ATC) [2, 4, 5].

Evaluacija tiroidnih nodusa, odnosno preoperativno postavljanje dijagnoze tirodnog maligniteta se vrši biopsijom tankom iglom (eng. *Fine Needle Aspiration Biopsy*, FNAB), te citološkom analizom aspiriranog sadržaja koja noduse klasifikuje prema Bethesda klasifikaciji [6]. Osnovni problem uspostavljanja dijagnoze prisutan je u kategorijama nedeterminisanih lezija prema Bethesda klasifikaciji, pri čemu je kod ovih pacijenata, upućenih na dijagnostičku operaciju, u skoro 80% slučajeva ustanovljena benigna priroda lezija [6, 7]. Drugi veliki problem tiroidne onkologije podrazumijeva detekciju rekurencije kod oboljelih od DTC, jer su kod 20 – 25% pacijenata prisutna anti-tiroglobulinska antitijela koja interferiraju sa uobičajeno primijenjenim testovima serumske koncentracije tiroglobulina [1, 2, 8]. Prisustvo tiroglobulina u serumu predstavlja marker prisustva tiroidnih ćelija u organizmu, te se koristi kao marker rekurentne ili perzistentne bolesti kod pacijenata kojima je zbog DTC u potpunosti uklonjena štitasta žlijezda [1]. Ova dva problema, uprkos razvoju različitih molekularnih panela i primjene različitih metoda detekcije serumskog tiroglobulina nisu razriješena na pouzdan i efikasan način [1, 7 – 9].

Ekstracelularne vezikule (eng. *Extracellular vesicles*, EV) su membranom ograničene, nereplikujuće subćelijske strukture sekretovane od strane ćelija, čiji sadržaj rekapitulira sadržaj ćelija od kojih potiču, zbog čega je veliki broj istraživanja usmjeren na njihovu potencijalnu upotrebu u svrhe biomarkera tečne biopsije [10, 11]. Osnovna podjela EV izvršena je na osnovu mehanizma biogeneze i veličine, na mikrovezikule (MV), koje se još nazivaju mikročesticama ili ektozomima, egzozome i apoptotska tijela (Slika 1.) [12, 13].

Zbog preklapanja u podjelama, kao i nemogućnosti dokazivanja porijekla izolovanih EVs preporučena je upotreba termina EV umjesto egzozoma i ektozoma [14]. Kao rezultat različitog porijekla, MV i egzozomi razlikuju se u markerima omotača, tako da su kod egzozoma membrane obogaćene tetraspaninima CD63, CD9 i CD81, zajedno sa drugim endozomalnim proteinima čije je prisustvo posljedica njihove biogeneze (Slika 2.) [15 – 17].

Važna osobina EV jeste tkivna specifičnost njihovih markera, kako površinskih tako i unutarvezikularnih [16]. S obzirom na to da sadržaj EV predstavlja rekapitulaciju sadržaja ćelije od koje potiče, primjećene razlike u sadržaju EV porijeklom iz malignih ćelija su predmet istraživanja u svrhu dijagnostičkih i prognostičkih markera, od kojih je najveći broj istraživanja usmjeren na upotrebu mikroRNK i molekula lncRNK [11 – 13]. Istraživanja tiroidea-specifičnih EV usmjerena su kako na EV porijeklom iz tjelesnih tečnosti pacijenata, tako i one porijeklom iz ćelijske kulture. Među istraženim molekulima mikroRNK, kod ćelijskih linija PTC pokazana je povećana ekspresija miR-146b i miR-222, sekretovanih u EV, u odnosu na ćelijsku liniju Nthy-Ori 3-1, koja predstavlja ćelijsku liniju neizmijenjenog tkiva štitaste žlijezde [11]. Takođe, detektovana je i povećana ekspresija duge nekodirajuće RNK (eng. *long non-coding RNA*, lncRNA) *SNHG9*, što je u pokazano i kod EV porijeklom iz tkiva PTC, a koja je u ćelijama Nthy-Ori 3-1 inhibirala autofagiju i povećavala stopu apoptoze [11]. Nedavno je ustanovljen i značaj mikroRNK *let-7* u TPO(+) EV u diferencijaciji FTC od benignih folikularnih adenoma [18]. Za određene miRNK molekule pokazana je diferencijalna distribucija u u EV, tako je za 6 mikroRNK (miR-16-2-3p, miR-223-5p, miR-34c-5p, miR-182-5p, miR-223-3p, miR-146b-5p) prisutnih u EV porijeklom iz plazme utvrđeno smanjeno prisustvo kod bolesnika sa tiroidnim nodusima u odnosu na zdrave kontrole [10]. S druge strane, za molekule miR-16-2-3p i miR-223-5p pokazano je veće prisustvo kod

pacijenata sa PTC, kod kojih je zabilježena i diferencijalna distribucija miR-146b-5p i miR-21a-5p molekula u EV porijeklom iz plazme u poređenju sa pacijentima sa benignim nodusima [10]. Međutim, iako je veliki broj istraživanja usmjeren na upotrebu egzozomalnih molekula mikroRNK kao dijagnostičkih markera u tiroidnoj onkologiji, dosadašnji rezultati nisu uspostavili panel koji bi se mogao koristiti u svrhe razlikovanja PTC od benignih nodusa [1, 19].

Istraživanja proteina EV kao potencijalnih dijagnostičkih markera tiroidnih karcinoma su malobrojna. Pored proteina povezanih sa malignom transformacijom, istraživanja obuhvataju detekciju i analizu proteina koji podrazumijevaju i tiroidea-specifične markere, u koje se pored tiroglobulina ubrajaju tiroidna-peroksidaza (TPO, engl. *thyroid peroxidase*) i tirotropinski receptor (TSH-R, engl. *thyroid-stimulating hormone receptor*), kao i proteine koji potencijalno učestvuju u malignoj transformaciji.

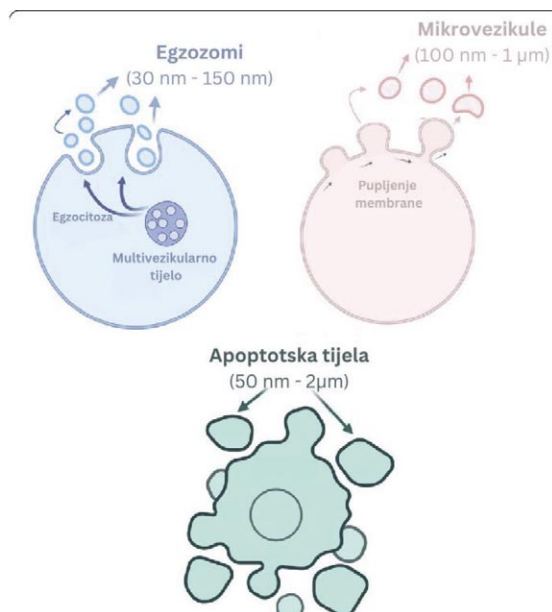
Među proteinima EV čiji su efekti istraženi kod karcinoma štitaste žlijezde, za protein aneksin A1 je pokazana prekomjerna ekspresija sa efektima maligne transformacije, dok je kod oboljelih od PTC sa metastazama na limfne čvorove pokazano da je sadržaj obogaćen proteinima iz familije integrina, neopodnim za adheziju [11]. Povećano prisustvo proteina toplotnog šoka (HSP27, HSP60 i HSP90) je pokazano u EV porijeklom iz plazme PTC pacijenata u odnosu na pacijente sa benignim tiroidnim nodusima. [11, 19]. Nedavno istraživanje je utvrdilo i prisustvo TPO na površini tiroidnih EV u cirkulaciji, što je bilo važno za dalju upotrebu gorepomenute miRNK *let-7* u dijagnostici FTC [10]. Neka od istraživanja ustanovila su prisustvo TSH-R na EV porijeklom iz ćelijskih linija Nthy-Ori 3-1 i ćelijskih linija FTC, kao i plazme bolesnika sa FTC [18, 20 – 22]. Takođe, detektovano je prisustvo unutarvezikularnog Tg u EV porijeklom iz urina bolesnika sa PTC i FTC, kao i Tg porijeklom iz ćelijske linije štitaste žlijezde pacova FRTL5, što ide u prilog hipotezi o načinu sekrecije Tg koji uključuje njegovo otpuštanje pomoću vezikula [19, 23, 24]. U ovoj oblasti samim tim postoji potreba za potvrdom prisustva specifičnih proteina, kao što je unutarvezikularni Tg, ali i za optimizacijom izolacije EV definisanjem prisustva tiroidea-specifičnih markera u svrhe dijagnostike i ispitivanjima prisustva drugih potencijalno upotrebljivih proteina [19].

Rezultati pomenutih istraživanja mogu biti osnova za ispitivanje prisustva tiroidea-specifičnih površinskih markera EV koji bi olakšali proces izolacije ovih tkivno-specifičnih EV. Pored toga, u cilju rješavanja problema dijagnostike rekurentnih DTC trebalo bi potvrditi okarakterisani unutarvezikularni sadržaj tiroidea-specifičnih EV na prisustvo Tg.

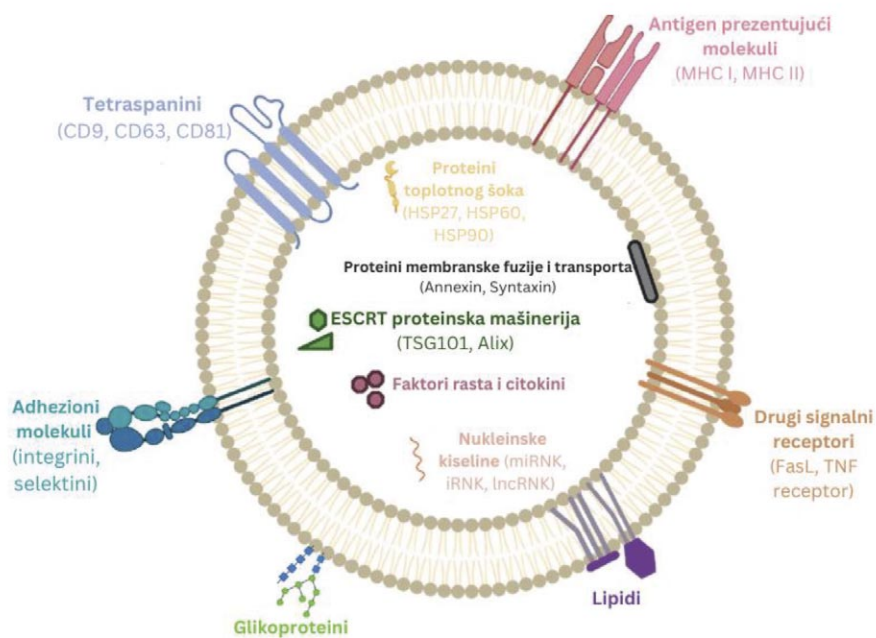
Literatura:

1. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016; 26(1):1-133.
2. Ringel MD, Ladenson PW. Controversies in the follow-up and management of well-differentiated thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11(1):97-116.
3. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Available at: <https://gco.iarc.who.int/today> (gledano 16.4.2024.)
4. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK. Et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol.* 2022; 33(1):27-63.
5. Kitahara CM, Schneider AB. Epidemiology of Thyroid Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2022; 31(7):1284-97.
6. Cibas ES, Ali SZ; NCI Thyroid FNA State of the Science Conference. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 2009; 132(5):658-65.
7. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, DuEvsuri U, Ferris RL. et al. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer* 2014; 120(23):3627-34.

8. Petrovic I, LoPresti J, Fatemi S, Gianoukakis A, Burman K, Gomez-Lima CJ. et al. Influence of Thyroglobulin (Tg) Autoantibodies on Tg levels Measured by Different Methodologies: (IMA, LC-MS/MS and RIA). *J Clin Endocrinol Metab.* 2024; 30:286-311.
9. Ferraz C, Eszlinger M, Paschke R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(7):2016-26.
10. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 2015; 65(8):783-97.
11. Delcorte O, Degosserie J, Pierreux CE. Role of Extracellular Vesicles in Thyroid Physiology and Diseases: Implications for Diagnosis and Treatment. *Biomedicines* 2022; 10(10):2585.
12. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol.* 2014; 5:442.
13. Wang X, Tian L, Lu J, Ng IO. Exosomes and cancer - Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic vehicle. *Oncogenesis* 2022; 11(1):54.
14. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024; 13(2):12404.
15. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B. et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(8):968-77.
16. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30:255-89.
17. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res.* 2009; 315(9):1584-92.
18. Zabegina L, Nazarova I, Knyazeva M, Nikiforova N, Slyusarenko M, Titov S. et al. MiRNA let-7 from TPO(+) Extracellular Vesicles is a Potential Marker for a Differential Diagnosis of Follicular Thyroid Nodules. *Cells* 2020; 9(8):1917.
19. Huang TY, Wang CY, Chen KY, Huang LT. Urinary Exosomal Thyroglobulin in Thyroid Cancer Patients With Post-ablative Therapy: A New Biomarker in Thyroid Cancer. *Front Endocrinol.* 2020; 11:382.
20. Cui X, Huang M, Wang S, Zhao N, Huang T, Wang Z. et al. Circulating Exosomes From Patients With Graves' Disease Induce an Inflammatory Immune Response. *Endocrinology* 2021; 162(3):236.
21. Cui X, Wang S, Zhao N, Wang S, Wang Z, Huang M. et al. Thyrocyte-derived exosome-targeted dendritic cells stimulate strong CD4+ T lymphocyte responses. *Mol Cell Endocrinol.* 2020; 506:110756.
22. Edo N, Kawakami K, Fujita Y, Morita K, Uno K, Tsukamoto K. et al. Exosomes Expressing Thyrotropin Receptor Attenuate Autoantibody-Mediated Stimulation of Cyclic Adenosine Monophosphate Production. *Thyroid* 2019; 29(7):1012-17.
23. Vlasov P, Doi SQ, Sellitti DF. FRTL-5 Rat Thyroid Cells Release Thyroglobulin Sequestered in Exosomes: A Possible Novel Mechanism for Thyroglobulin Processing in the Thyroid. *J Thyroid Res.* 2016; 2016:9276402.
24. de Vijlder JJ, Ris-Stalpers C, Vulsma T. On the origin of circulating thyroglobulin. *Eur J Endocrinol.* 1999;140(1):7-8.
25. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal.* 2021; 19(1):47.



Slika 1. Shematski prikaz različitih tipova ekstracelularnih vezikula. Podjela je napravljena prema mehanizmu biogeneze i veličini vezikula. (Modifikovano Gurung S i saradnici, 2021) (25).



Slika 2. Shematski prikaz proteinskog sastava ekstracelularnih vezikula. (Modifikovano Gurung S i saradnici, 2021) (25).

Novi trendovi u dijagnostici prirode nodusa štitaste žlezde

Vasilije Živaljević, Anastasija Panić, Sonja Zafirović

Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Institut za nuklearne nauke Vinča - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.

Kontakt: vasilije.zivaljevic@vin.bg.ac.rs

Apstrakt

Nodusi štitaste žlezde su lokalizovane morfološke promene koje se mogu klasifikovati kao benigne ili maligne. Koloidni nodusi i folikulski adenomi predstavljaju uobičajene benigne varijante nodusa štitaste žlezde, dok maligni nodusi uključuju papilarne, folikulske i medularne tumore. Istraživanja su pokazala da se učestalost malignih nodusa, posebno papilarnog tiroidnog tumora, značajno povećala u poslednje četiri decenije. Razlikovanje benignih od malignih nodusa štitaste žlezde predstavlja ključnu dijagnostičku dilemu u medicinskoj praksi, usled nedostatka jedinstvenog dijagnostičkog testa ili biomarkera koji bi pouzdano ukazao na prisustvo malignih nodusa. Genetičke modifikacije, kao što su mutacije u genima *BRAF*, *RET* i *TERT*, igraju značajnu ulogu u patogenezi tumora štitaste žlezde, dok azot-monoksid (NO) i mikroRNK (miRNK) predstavljaju obećavajuće biomarkere u dijagnostici malignih nodusa. U zavisnosti od koncentracije u ciljnom tkivu, NO može imati i antitumorski i tumorogeni uticaj, dok su miRNK, kao što su miR-146b, miR-221, miR-222 i miR-375, identifikovane kao indikatori maligniteta i prognostički biomarkeri malignih nodusa. U ovom preglednom radu, sumirana su najnovija saznanja iz literature koja se odnose na genetičke modifikacije, signalne puteve i uloge NO i miRNK u malignim oboljenjima štitaste žlezde, kao i novi trendovi u dijagnostici prirode nodusa štitaste žlezde.

Ključne reči: nodusi štitaste žlezde, papilarni tiroidni tumor, azot-monoksid, miRNK

New trends in the diagnosis of the nature of thyroid nodules

Vasilije Živaljević, Anastasija Panić, Sonja Zafirović

¹Department of Radiobiology and Molecular Genetics, VINČA Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.

Correspondence: vasilije.zivaljevic@vin.bg.ac.rs

Abstract

Thyroid nodules are localized morphological changes that can be classified as either benign or malignant. Colloid nodules and follicular adenomas represent common benign variants of thyroid nodules, while malignant nodules include papillary, follicular, and medullary tumours. Research has shown that the incidence of malignant nodules, particularly papillary thyroid carcinoma (PTC), has significantly increased over the past four decades. Distinguishing between benign and malignant thyroid nodules presents a critical diagnostic challenge in medical practice, due to the lack of a single diagnostic test or biomarker that could reliably indicate the presence of malignancy. Genetic modifications, such as mutations in *BRAF*, *RET*, and *TERT* genes, play a significant role in the pathogenesis of thyroid tumours, while nitric oxide (NO) and microRNAs (miRNAs) are emerging as promising biomarkers for malignant thyroid nodules. NO can exhibit anti-tumour and tumorigenic activities depending on its concentration in the target tissue. In contrast, miRNAs such as miR-146b, miR-221, miR-222, and miR-375 have been identified as indicators of malignancy and prognostic biomarkers for malignant thyroid nodules. In this review, we summarize recent literature findings related to genetic modifications, signaling pathways, and the roles of NO and miRNAs in malignant thyroid disorders, as well as new trends in the diagnosis of the nature of thyroid nodules.

Keywords: thyroid nodules, papillary thyroid cancer, nitric oxide, miRNA

Uvod

Nodusi štitaste žlezde predstavljaju lokalizovane morfološke promene u vidu diskretnih lezija na štitastoj žlezdi i po prirodi se mogu podeliti na benigne i maligne [1, 2]. Histološki, nodusi štitaste žlezde se mogu klasifikovati u nekoliko kategorija različitih morfoloških karakteristika. Koloidni nodusi, koje karakteriše akumulacija koloidnog sadržaja i obično su okruženi folikulskim ćelijama, predstavljaju uobičajenu benignu varijantu nodusa štitaste žlezde [3]. Folikulski adenomi, inkapsulirani, sastavljeni od folikulskih ćelija, takođe uopšteno ispoljavaju benigne karakteristike [4]. Nasuprot tome, maligni nodusi, uključujući papilarni tiroidni tumor (PTC, engl. *papillary thyroid cancer*), folikulski tiroidni tumor (FTC, engl. *follicular thyroid cancer*) i medularni tiroidni tumor (MTC, engl. *medullary thyroid cancer*), pokazuju abnormalni ćelijski rast i mogu infiltrirati okolna tkiva, što zahteva precizne i diferencijalne dijagnostičke pristupe [5].

Nodusi štitaste žlezde se znatno češće javljaju kod žena, a njihova učestalost raste sa godinama života [6, 7]. Studije su pokazale da se učestalost PTC značajno povećala u poslednje četiri decenije [8, 9]. Međutim, to nije uočeno za učestalost pojave folikulskog i medularnog tumora [10]. Faktori rizika, kao što su povećani indeks telesne mase, pušenje, različiti hemijski agensi i drugi, mogu doprineti povećanju učestalosti kako benignih, tako i malignih tumora štitaste žlezde [11, 12].

Biopsija aspiracijom (FNAB, engl. *fine needle aspiraton biopsy*) je danas zlatni standard za procenu prirode nodusa štitaste žlezde [13]. Procedura biopsije uključuje perkutano umetanje tanke igle u nodus čime se omogućava ekstrakcija ćelijskog materijala za citološki pregled [14]. Američka asocijacija za štitastu žlezdu preporučuje FNAB za noduse dimenzija većih od 1 cm sa sumnjivim ultrazvučnim karakteristikama, kao i za one noduse čije su dimenzije veće od 1,5 cm, ali bez sumnjivih ultrazvučnih karakteristika [1]. Bethesda sistem za klasifikaciju na osnovu citopatologije nodusa štitaste žlezde dalje klasifikuje rezultate FNAB u kategorije koje pomažu kliničarima da identifikuju za koje je pacijente neophodna operacija ili njihovo kontinuirano praćenje [13]. FNAB je značajna metoda u savremenom pristupu dijagnostike bolesti štitaste žlezde, koja kombinuje bezbednost, efikasnost i isplativost. Međutim, preciznost primene FNAB u dijagnostici može značajno da varira, usled toga što količina prikupljenog tkiva nekada nije dovoljna da bi se sprovela detaljna patohistološka analiza, i iz tog razloga procedura mora da se obavi više puta [15]. Takođe, neodređeni citološki nalazi se javljaju u 15-30% slučajeva, od čega se manje od trećine maligniteta štitaste žlezde uspešno utvrdi nakon histoloških analiza [16].

Genetičke modifikacije i signalni putevi u patogenezi nodusa štitaste žlezde

Tumori štitaste žlezde često nastaju kao rezultat genetičkih modifikacija koje utiču na proteine odgovorne za regulaciju mitogen-regulisanih protein kinaza/ekstracelularnim signalom regulisanih protein kinaza (MAPK/ERK) i fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinaza B (PI3K/Akt) signalnih puteva, koji igraju ključnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji i sprečavanju apoptoze [17]. Aktivacija signalnog puta MAPK/ERK vodi ka pojačanoj proliferaciji ćelija, dok aktivacija signalnog puta PI3K/Akt sprečava apoptozu inhibicijom proapoptotskih faktora i podstiče ćelijsku proliferaciju aktivacijom signalnog puta ciljnog molekula rapamicina kod sisara (mTOR) [17, 18]. Do razvoja MTC može doći usled mutacija u receptorima za faktore rasta koji se ekspimiraju i specifični su za neuroendokrine C-ćelije [18].

Patogeneza PTC obuhvata tačkaste mutacije gena *BRAF* ili hromozomske rearanžmane gena za receptore faktora rasta (RET) [19]. Ovi geni su ključni za regulaciju signalnog puta MAPK/ERK, a njegova nekontrolisana aktivacija može dovesti do prekomerne proliferacije ćelija [19]. Mutacije u genu *BRAF*, posebno mutacije koje dovode do zamene valina glutaminom na poziciji 600, dovode do trajne aktivacije

MAPK/ERK signalnog puta, povezane su kako sa invazivnijim oblicima PTC, tako i povećanim rizikom od recidiva tumora štitaste žlezde [8, 18].

Rearanžmani RET, koji takođe imaju bitnu ulogu u nastanku PTC, formiraju himerni gen koji se sastoji od konstitutivno eksprimiranog gena u folikulskim ćelijama i gena za kinazni domen RET receptora [19, 20]. Produkt ovog himernog gena aktivira MAPK/ERK put, što dovodi do prekomerne ćelijske proliferacije [20]. Mutacije gena *TERT*, koji kodira katalitičku subjedinicu enzima telomeraze, su generalno veoma retke, ali su značajno učestalije kod FTC [18]. Takođe, mutacije u genu za protein RAS češće su kod FTC u odnosu na ostale tipove tumora štitaste žlezde [21]. Protein RAS prenosi signale između membranskih receptora i signalnih puteva MAPK/ERK i PI3K/Akt [22]. Anaplastični (nediferencirani) tumori, koji predstavljaju najagresivnije tumore štitaste žlezde, takođe pokazuju prisustvo mutacija u genu *TERT* [18].

Uloga azot-monoksida u malignim oboljenjima štitaste žlezde

Azot-monoksid (NO) je molekul koji ima važnu ulogu u različitim ćelijskim procesima. NO reguliše niz fizioloških funkcija poput vazodilatacije, imunskog odgovora, neurotransmisije, apoptoze, ekspresije gena, translacije i posttranslacione modifikacije proteina [23, 24]. Održavanje optimalnog nivoa NO je presudno za homeostazu i može uticati na prevenciju različitih bolesti, uključujući i bolesti štitaste žlezde [25, 26]. Narušena proizvodnja ili aktivnost NO može dovesti do ćelijskog oštećenja, kardiovaskularnih i neuroloških bolesti, kao i nastanka tumora [23].

U zavisnosti od koncentracije u određenom tkivu, NO može ispoljavati i antitumorski i tumorogeni uticaj [16, 27]. Prema nekim istraživanjima, niske koncentracije NO mogu izazvati citotoksičnost, degradaciju makromolekula i apoptozu [16, 27, 28]. Kada je prisutan u visokim koncentracijama, NO reaguje sa superoksidnim anjonima, što dovodi do formiranja visoko reaktivnih peroksinitrita i drugih reaktivnih vrsta azota. Peroksinitrit uzrokuje oštećenja DNK, inhibira mehanizme reparacije DNK, posttranslacione modifikacije enzima i apoptozu [29-31]. U tkivima benignih adenoma štitaste žlezde, kao i u slučajevima PTC, FTC i autoimunog tiroiditisa, zabeležena je povećana ekspresija inducibilne azot-monoksid sintaze (iNOS), endotelijalne NOS (eNOS) i nitrotirozina [32]. U istraživanju koje su sproveli Yasuoka i saradnici [33], primećeno je smanjenje ekspresije iNOS u normalnim folikulskim ćelijama štitaste žlezde, dok je kod tumora štitaste žlezde zabeležena povećana ekspresija iNOS, uz slabu imunoreaktivnost na iNOS u stromi, što sugeriše da većina proizvedenog NO potiče direktno iz tumorskih ćelija. Osim toga, pokazano je da NO povećava ekspresiju receptora C-X-C za hemokine tip 4 (CXCR4) u slučajevima PTC, što doprinosi razvoju limfogenih metastaza [33-35].

Uloga mikroRNK u malignim oboljenjima štitaste žlezde

MikroRNK (miRNK) predstavljaju male, nekodirajuće RNK molekule koji regulišu ekspresiju gena na posttranskripcionom nivou i uključene su u različite biološke procese, kao što su proliferacija ćelija, apoptoza i diferencijacija [36, 37]. Značaj miRNK kao biomarkera se ogleda u njihovoj postojanosti u telesnim tečnostima i uzorcima tkiva, kao i u značajnim razlikama koje se javljaju u profilima ekspresije između zdravih i malignih tkiva [36, 38]. Neke miRNK, kao što su miR-146b, miR-221, miR-222 i miR-375, identifikovane su kao potencijalni indikatori za razlikovanje tipova tumora štitaste žlezde i procenu njihove agresivnosti [39-41].

MiR-146b je visoko eksprimirana u PTC, a visoke koncentracije ove miRNK pozitivno korelišu sa prisustvom maligniteta, što je čini obećavajućim biomarkerom kako za dijagnozu, tako i za prognozu ove patologije [42, 43]. Takođe, miR-146b ima bitnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji i invaziji, a uključena je i u

epitelno-mezenhimalnu tranziciju što je čini važnim faktorom za napredovanje PTC [44]. Povećane koncentracije miR-146b su povezane sa smanjenom stopom preživljavanja kod osoba obolelih od PTC, što dodatno potvrđuje njen dijagnostički potencijal [45]. Sličan značaj imaju i miR-221 i miR-222, koje dele identičnu sekvencu i čija je ekspresija povećana u slučaju tumora štitaste žlezde [46]. Ove miRNK sprečavaju translaciju iRNK tumor-supresorskih gena, čime utiču na regulaciju ćelijskog ciklusa i proliferaciju tumorskih ćelija [36, 46].

U poređenju sa zdravim tkivom, MTC se karakteriše povećanom ekspresijom miR-375, a nivo ekspresije je povezan sa agresivnošću samog tumora i prognozom kod pacijenata [47, 48]. Ovo sugeriše da bi miR-375 mogla poslužiti kao značajan prognostički marker za MTC. Pored toga, različite studije identifikovale su i druge cirkulišuće miRNK, poput miR-579 i miR-25-3p koje su povezane sa različitim vrstama tumora štitaste žlezde, čime se naglašava potencijal profila ekspresije miRNK u razlikovanju malignih tumora od benignih lezija i povećanju preciznosti dijagnoze [40, 41, 49].

Zaključak

Napredak u molekularnoj biologiji je omogućio identifikaciju novih biomarkera za dijagnostiku nodusa štitaste žlezde, sa potencijalom da poboljšaju ili zamene postojeće pristupe. NO i miRNK se posebno ističu kao značajni biomarkeri (Slika 1). NO pokazuje značajnu ulogu u patogenezi malignih oboljenja štitaste žlezde, dok miRNK omogućavaju preciznije razlikovanje benignih od malignih nodusa. Ovi biomarkeri imaju potencijal da unaprede preoperativnu dijagnostiku nodusa štitaste žlezde, ali za njihovu širu primenu u kliničkoj praksi neophodna su dalja istraživanja i validacija kako bi se osigurala njihova efikasnost i doprinelo poboljšanju ishoda kod pacijenata sa malignim nodusima štitaste žlezde.

Zahvalnica

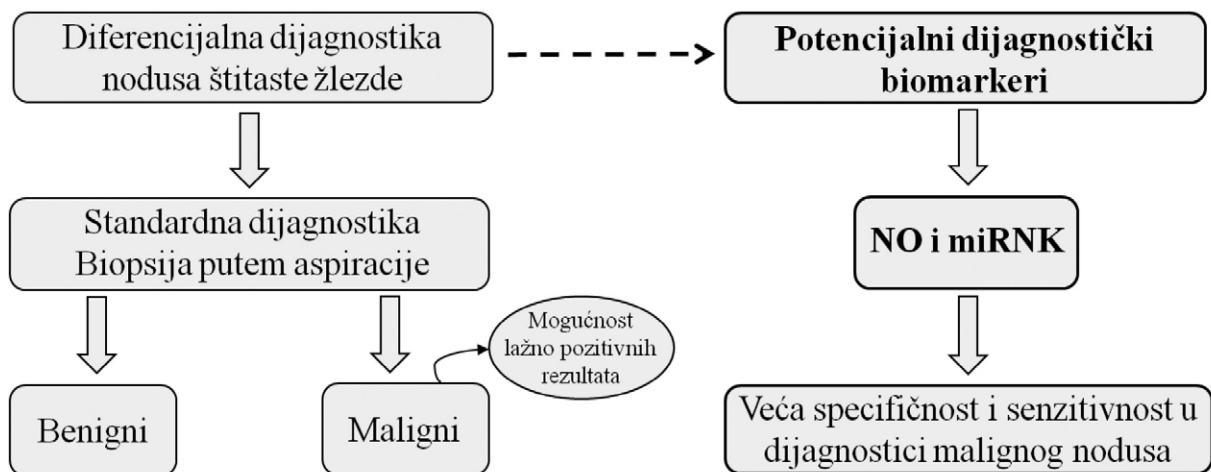
Rad je realizovan u okviru Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, kao deo istraživanja finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Contract No#451-03-66/2024-03/200017).

Literatura

1. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26 (1): 1-133.
2. Kitahara CM, D KRF, Jørgensen JOL, Cronin-Fenton D, Sørensen HT. Benign Thyroid Diseases and Risk of Thyroid Cancer: A Nationwide Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103 (6): 2216-2224.
3. Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med*. 2004;351 (17): 1764-1771.
4. Grimm D. Current Knowledge in Thyroid Cancer-From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*. 2017;18 (7).
5. Haymart MR, Esfandiari NH. Incidence and Epidemiology. In: Roman SA, Sosa JA, Solórzano CC, editors. *Management of Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: A Practical Guide*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 1-10.
6. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;140 (4): 317-322.
7. Lechner MG, Hershman JM. Thyroid Nodules and Cancer in the Elderly. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
8. Jung CK, Little MP, Lubin JH, Brenner AV, Wells SA, Jr., Sigurdson AJ, et al. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99 (2): E276-285.

9. Wei X, Wang X, Xiong J, Li C, Liao Y, Zhu Y, et al. Risk and Prognostic Factors for BRAF(V600E) Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2022;2022: 9959649.
10. Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12 (11): 646-653.
11. Liu Y, Su L, Xiao H. Review of Factors Related to the Thyroid Cancer Epidemic. *Int J Endocrinol.* 2017;2017: 5308635.
12. Demetriou E, Fokou M, Frangos S, Papageorgis P, Economides P, Economides A. Thyroid Nodules and Obesity. *Life (Basel).* 2023;13 (6).
13. Ali SZ, Baloch ZW, Cochand-Priollet B, Schmitt FC, Vielh P, VanderLaan PA. The 2023 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid.* 2023;33 (9): 1039-1044.
14. Feldkamp J, Führer D. Fine Needle Aspiration in the Investigation of Thyroid Nodules. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113 (20): 353-359.
15. Joudeh AA, Shareef SQ, Al-Abbadi MA. Fine-Needle Aspiration Followed by Core-Needle Biopsy in the Same Setting: Modifying Our Approach. *Acta Cytol.* 2016;60 (1): 1-13.
16. Samardzic VS, Macvanin MT, Zafirovic SS, Obradovic MM, Gluvic ZM, Grubin J, et al. Nitric oxide, thyroglobulin, and calcitonin: unraveling the nature of thyroid nodules. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14: 1241223.
17. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Molecular biology of thyroid cancer initiation. *Clin Transl Oncol.* 2007;9 (11): 686-693.
18. Pozdeyev N, Rose MM, Bowles DW, Schweppe RE. Molecular therapeutics for anaplastic thyroid cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020;61: 23-29.
19. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7 (10): 569-580.
20. Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *Jama.* 2018;319 (9): 914-924.
21. Liu LP, Hao JY, Pan H, Wang C, Yue P. [Mutation of RAS gene in follicular-differentiated thyroid tumors and its significance]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2020;49 (3): 256-261.
22. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells.* 2020;9 (1).
23. Andrabi SM, Sharma NS, Karan A, Shahriar SMS, Cordon B, Ma B, et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10 (30): e2303259.
24. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88 (24): 11285-11289.
25. Sudar-Milovanovic E, Obradovic M, Jovanovic A, Zaric B, Zafirovic S, Panic A, et al. Benefits of L-Arginine on Cardiovascular System. *Mini Rev Med Chem.* 2016;16 (2): 94-103.
26. Obradovic M, Gluvic Z, Sudar-Milovanovic E, Panic A, Trebaljevac J, Bajic V, et al. Nitric Oxide as a Marker for Levo-Thyroxine Therapy in Subclinical Hypothyroid Patients. *Curr Vasc Pharmacol.* 2016;14 (3): 266-270.
27. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis.* 2013;34 (3): 503-512.
28. Ridnour LA, Thomas DD, Switzer C, Flores-Santana W, Isenberg JS, Ambis S, et al. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide.* 2008;19 (2): 73-76.
29. Ridnour LA, Thomas DD, Donzelli S, Espey MG, Roberts DD, Wink DA, et al. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8 (7-8): 1329-1337.
30. Mocellin S, Bronte V, Nitti D. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev.* 2007;27 (3): 317-352.
31. Gluvic ZM, Obradovic MM, Sudar-Milovanovic EM, Zafirovic SS, Radak DJ, Essack MM, et al. Regulation of nitric oxide production in hypothyroidism. *Biomed Pharmacother.* 2020;124: 109881.
32. Patel A, Fenton C, Terrell R, Powers PA, Dinauer C, Tuttle RM, et al. Nitrotyrosine, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) are increased in thyroid tumors from children and adolescents. *J Endocrinol Invest.* 2002;25 (8): 675-683.
33. Yasuoka H, Kodama R, Hirokawa M, Takamura Y, Miyauchi A, Sanke T, et al. CXCR4 expression in papillary thyroid carcinoma: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis. *BMC Cancer.* 2008;8: 274.
34. Erdman SE, Rao VP, Poutahidis T, Rogers AB, Taylor CL, Jackson EA, et al. Nitric oxide and TNF-alpha trigger colonic inflammation and carcinogenesis in *Helicobacter hepaticus*-infected, Rag2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106 (4): 1027-1032.
35. Sousa MS, Latini FR, Monteiro HP, Cerutti JM. Arginase 2 and nitric oxide synthase: Pathways associated with the pathogenesis of thyroid tumors. *Free Radic Biol Med.* 2010;49 (6): 997-1007.

36. Macvanin MT, Gluovic ZM, Zanic BL, Essack M, Gao X, Isenovic ER. New biomarkers: prospect for diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14: 1218320.
37. Macvanin M, Obradovic M, Zafirovic S, Stanimirovic J, Isenovic ER. The Role of miRNAs in Metabolic Diseases. *Curr Med Chem*. 2023;30 (17): 1922-1944.
38. Chevillet JR, Lee I, Briggs HA, He Y, Wang K. Issues and prospects of microRNA-based biomarkers in blood and other body fluids. *Molecules*. 2014;19 (5): 6080-6105.
39. 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): 2084-2092.
40. Li M, Song Q, Li H, Lou Y, Wang L. Circulating miR-25-3p and miR-451a May Be Potential Biomarkers for the Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS One*. 2015;10 (7): e0132403.
41. Lee JC, Zhao JT, Clifton-Bligh RJ, Gill A, Gundara JS, Ip JC, et al. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer*. 2013;119 (24): 4358-4365.
42. Chou CK, Liu RT, Kang HY. MicroRNA-146b: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Papillary Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18 (3).
43. Kondrotienė A, Daukša A, Pamedytytė D, Kazokaitė M. Papillary Thyroid Carcinoma Tissue miR-146b, -21, -221, -222, -181b Expression in Relation with Clinicopathological Features. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11 (3).
44. Hardin H, Guo Z, Shan W, Montemayor-Garcia C, Asioli S, Yu XM, et al. The roles of the epithelial-mesenchymal transition marker PRRX1 and miR-146b-5p in papillary thyroid carcinoma progression. *Am J Pathol*. 2014;184 (8): 2342-2354.
45. Guo Z, Hardin H, Montemayor-Garcia C, Asioli S, Righi A, Maletta F, et al. In Situ Hybridization Analysis of miR-146b-5p and miR-21 in Thyroid Nodules: Diagnostic Implications. *Endocr Pathol*. 2015;26 (2): 157-163.
46. Ravegnini G, Cargnin S, Sammarini G, Zanotti F, Bermejo JL, Hrelia P. Prognostic Role of miR-221 and miR-222 Expression in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2019;11 (7).
47. Mian C, Pennelli G, Fassan M, Balistreri M, Barollo S, Cavedon E, et al. MicroRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid*. 2012;22 (9): 890-896.
48. Galuppini F, Bertazza L, Barollo S, Cavedon E, Rugge M, Guzzardo V, et al. MiR-375 and YAP1 expression profiling in medullary thyroid carcinoma and their correlation with clinical-pathological features and outcome. *Virchows Arch*. 2017;471 (5): 651-658.
49. 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): 4190-4198.



Slika 1. Potencijalni dijagnostički biomarkeri u dijagnostici malignih nodusa štitaste žlezde. NO – azot-monoksid; miRNA – mikroRNA.

Uticaj varijanti u genima *DIO1* i *DIO2* na funkciju tiroidne žlezde

Aleksa Timotijević, Vladimir Gašić

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: aatimotijevic@gmail.com

Apstrakt

Tiroidna žlezda je endokrina žlezda čoveka, koja luči hormone tiroksin (T_4) i trijodtironin (T_3). Mada se T_3 luči u značajno manjoj količini, T_3 ima veću biološku aktivnost nego T_4 i većinom se stvara dejodinacijom T_4 pomoću jodotironin dejodinaza tipa 1 ili 2 u perifernim tkivima. Metabolizam tiroidnih hormona, kojim upravljaju enzimi dejonidaze, kodirani genima *DIO1* i *DIO2*, igra ključnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima. Varijacije u ovim genima mogu uticati na nivoe tiroidnih hormona i doprineti patogenezi velikog broja poremećaja.

Ključne reči: Tiroidni hormoni, dejodinaze, jednonukleotidni polimorfizmi

Influence of *DIO1* i *DIO2* gene variants on thyroid gland function

Aleksa Timotijević, Vladimir Gašić

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

Correspondence: aatimotijevic@gmail.com

Abstract

The thyroid gland is human endocrine gland, secreting the hormones thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3). Although T_3 is secreted in significantly less quantity, T_3 has greater biological activity than T_4 and is mostly created by deiodination of T_4 by iodothyronine deiodinases type 1 or 2 in peripheral tissues. The metabolism of thyroid hormones, regulated by deiodinase enzymes, encoded by the *DIO1* and *DIO2* genes, plays a key role in numerous physiological processes. Variations in these genes can affect thyroid hormone levels and contribute to the pathogenesis of a number of disorders.

Keywords: Thyroid hormones, deiodinases, single nucleotide polymorphisms

UVOD

Molekularna biologija se kao naučna disciplina intenzivno razvija, pružajući značajne uvide u strukturu i funkciju gena, proteina, i drugih biomolekula. Jedan od ključnih ciljeva ove oblasti je razumevanje genetičke osnove različitih fizioloških procesa i bolesti, što može doprineti razvoju personalizovane medicine. Personalizovana medicina predstavlja pristup lečenju koji uzima u obzir individualne genetičke karakteristike pacijenata, čime se postiže veća efikasnost i smanjuje rizik od neželjenih efekata. Primena novih biomedicinskih testova visoke propusne moći (eng. *high-throughput*), poput sekvenciranja DNK, proteomike, različitih protokola za snimanje, otkrila je veliku količinu među-individualnih varijacija u pogledu efekata, mehanizama i faktora koji doprinose razvoju bolesti (1). Ovo je pokrenulo mnoga pitanja o stepenu do kojeg bi ove varijacije mogle da utiču na odluke o optimalnom načinu lečenja, praćenju ili prevencije bolesti za pojedinca. Poznavanje genetičkog profila pacijenta može pomoći lekarima da odaberu odgovarajući lek ili terapiju i da ih primenjuju koristeći odgovarajuću dozu ili režim.

Po završetku projekta Genom čoveka (eng. *Human Genome Project*) u populacijama je pronađen veliki broj varijacija (polimorfizama). Najčešći tip ovih promena jeste jednonuklotidni polimorfizam (eng. *single nucleotide polymorphism, SNP*), koji označava genomsku varijantu na jednoj baznoj poziciji u molekulu DNK (2). Zamene mogu biti po principu promene jedne purinske baze u drugu (npr. adenin u guanin), poznatije i kao tranzicije, ili purinske u pirimidinsku (npr. guanin u citozin), što je nazvano transverzijom. Polimorfizam je definisan kao varijanta sekvence koja ima populacionu učestalost od najmanje 1%. Procenjuje se da postoji između 3 i 10 miliona SNP u ljudskom genomu sa učestalošću većom od 1% (2).

Bioinformatika igra ključnu ulogu u interpretaciji podataka dobijenih sekvenciranjem DNK i identifikaciji funkcionalnih implikacija genetičkih varijanti. Alati za analizu sekvenci omogućavaju predikciju mesta vezivanja transkripcionih faktora, što može pružiti važne uvide u regulaciju gena. Na primer, identifikacija specifičnih transkripcionih faktora koji se vezuju za određene varijante može pomoći u razumevanju kako ove varijante utiču na ekspresiju gena i funkcionalne promene na molekularnom nivou. Pored toga, bioinformatički alati omogućavaju upoređivanje genetičkih podataka između različitih populacija, što je ključno za razumevanje populacionih razlika u genetičkoj predispoziciji za određene bolesti. Ovi alati takođe omogućavaju analizu evolucione konzervacije genetičkih sekvenci, identifikaciju potencijalnih patogenih varijanti i razvoj novih terapijskih strategija.

TIROIDNA ŽLEZDA

Tiroidna žlezda je visoko vaskularizovana, acinozna žlezda koja se nalazi na prednjem delu vrata, ispred dušnika. Sastoji se od desnog i levog režnja koji su povezani istmusom (3). Kao jedna od većih endokrinih žlezda čoveka, ima dve primarne funkcije. Prva je da luči tiroidne hormone, koji održavaju optimalni nivo metabolizma u tkivima. Tiroidni hormoni takođe stimulišu potrošnju kiseonika (O_2) kod većine ćelija, pomažu regulaciji metabolizma ugljenih hidrata i lipida i time utiču na održanje telesne težine i mentalnu aktivnost (4). Druga bitna uloga tiroidee jeste sekrecija kalcitonina, hormona koji reguliše cirkulišući nivo kalcijuma (4). Osnovna sekretorna i funkcionalna jedinica tiroidne žlezde jeste folikul, koji se sastoji od sloja epitelnih ćelija koje okružuju centralnu šupljinu ispunjenu koloidom (3).

U folikulima tiroidne žlezde, tiroidni hormoni se sintetišu kroz jodiranje tirozinskih ostataka u glikoproteinu tiroglobulinu, koji se nalazi u koloidu (3,4). Oni su neophodni za rast i razvoj gotovo svih kičmenjaka, uključujući i čoveka. Sinteza i sekrecija tiroidnih hormona fino je modulirana od strane

hipotalamo-hipofizno-tiroidne ose, koja počinje u paraventricularnom jedru hipotalamusa i nastavlja do hipofize pre samog uključivanja tiroidee (slika 1) (5).

Primarni hormon koji tiroidna žlezda luči je tiroksin (T_4), zajedno sa trijodtironinom (T_3) u značajno manjoj količini (u odnosu približno jednakom 14:1) (6). Ipak, T_3 ima veću biološku aktivnost nego T_4 i većinom se stvara dejodinacijom T_4 pomoću neke od jodotironin dejodinaza tipa 1 ili 2, u perifernim tkivima u kojima i vrši svoju funkciju (4,7,8). Dejodinacijom T_4 nastaju i male količine reverznog trijodtironina (3,3',5'-*triiodothyronine*, RT_3). Pored toga, i druga jedinjenja se mogu pronaći u venskoj krvi tiroidee. Da li je RT_3 biološki aktivan ostaje i dalje nejasno (4). Kada su sekretovani u plazmi, tiroidni hormoni se u velikoj meri vezuju za proteine plazme kao što su albumin, transtiretin i tiroksin-vezujući globulin, dok mala količina ostaje u nevezanoj, slobodnoj (eng. *free*) formi (fT_4 i fT_3) (4,7). Slobodna forma tiroidnih hormona predstavlja i biološki aktivnu formu (9). Funkcija tiroidne žlezde je primarno regulisana varijacijama u nivou cirkulišućeg tireostimulirajućeg hormona (TSH). Njegova sekrecija se povećava delovanjem hipotalamusnog tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH) i inhibirana je procesom negativne povratne sprege preko cirkulišućih slobodnih T_3 i T_4 . Efekat T_4 se povećava produkcijom T_3 u citoplazmi tiroidnih ćelija pomoću dejodinaza koje one sadrže (4). Na sekreciju TSH i senzitivnost na stimulaciju TRH utiče i otkazivanje bubrega, izgladnjivanje, nedostatak sna, depresija, kortizol, hormon rasta i drugi hormoni (10).

Tiroidni hormoni ulaze u ćeliju i T_3 se, u većoj meri od T_4 , vezuje za receptore tiroidnih hormona (eng. *thyroid hormone receptors*, TR), koji pripadaju superfamiliji hormon-senzitivnih jedarnih transkripcionih faktora (5). Kompleks hormon-receptor potom migrira u nukleus i vezuje se za DNK preko cinkovih prstiju i povećava ili smanjuje ekspresiju različitih gena koji učestvuju u regulaciji rada ćelije (5,11). Postoje dva gena za TR: $TR\alpha$ na hromozomu 17 i $TR\beta$ na hromozomu 3, sa različitim nivoom ekspresije u tkivima tokom razvića i u adultnoj dobi (12). Tiroidni receptori se vezuju za DNK kao monomeri, homodimeri ili heterodimeri sa drugim jedarnim receptorima, prvenstveno retinoidnim receptorom X (eng. *retinoid X receptor*, RXR), sa kojim je i značajno poboljšano vezivanje za DNK. Takođe postoje i različiti koaktivatori i korepresori koji modulišu efekat TR što kao posledicu i ima sposobnost tiroidnih hormona da imaju mnogo različitih efekata na organizam (4).

AKTIVACIJA I INAKTIVACIJA TIROIDNIH HORMONA DEJODINAZAMA

Ulogu hipotalamo-hipofizno-tiroidne ose u regulisanju dostupnog nivoa T_3 upotpunjuju enzimi dejodinaze, koji mogu da se aktiviraju ili deaktiviraju na vremenski i prostorno specifičan način (13). Identifikovana su tri tipa dejodinaza koje se međusobno razlikuju po distribuciji među tkivima, katalitičkim profilima, specifičnostima za supstrat, fiziološkim funkcijama i regulaciji. Sve dejodinaze dele i neke zajedničke odlike. To su selenoproteini i poseduju *in-frame* UGA kodon za inkorporaciju selenocisteina u njihov aktivni centar (14). Dejodinaze takođe dele bitne strukturne karakteristike. Sve su homodimeri koji formiraju integralne membranske proteine, težine 29 – 33 kDa, sa regionima visoke homologije koji okružuju aktivni centar (15–17).

DIO1 gen za dejodinazu tipa 1 ($D1$) se kod čoveka nalazi na hromozomu 1 p32-p33 (18). Sastoji se od 4 egzona gde je UGA kodon za selenocistein lociran u egzonu 2, a stop kodon UGA i SECIS element u egzonu 4 (18). Ekspresija gena *DIO1* je izrazito stimulisana T_3 usled postojanja dobro okarakterisanih TRE elemenata u promoterskom regionu (19). Distalnije od dva, TRE-2 vezujuće mesto daje odgovor na retinoičnu kiselinu, time čineći *DIO1* gen osetljivim na istu (20,21). $D1$ ima sposobnost dejodinacije i unutrašnjeg i spoljašnjeg prstena, time konvertujući T_4 u T_3 ili RT_3 . $D1$ je integralni membranski protein sa aktivnim mestom unutar

citosola (22). D1 se predominantno nalazi u jetri i bubrezima kod kičmenjaka. Kod sisara, takođe je eksprimirana i u hipofizi, tiroidnoj žlezdi, crevima i placenti (14,23).

Dejodinaza tipa 2 (D2) je kodirana *DIO2* genom koji se kod čoveka nalazi na 14. hromozomu na poziciji 14q24.3 (24). Kodirajući region je podeljen na dva egzona razdvojena sa oko 7,4 kb dugačkim intronom (24). 5'-netranslatirajući region (eng. *untranslated region*, UTR) je veoma kompleksan sa tri mesta početka transkripcije (eng. *transcriptional start sites*, TSS) koji su 708, 31 i 24 nukleotida uzvodno od ATG kodona, a sadrži i region koji reaguje na ciklični adenozin monofosfat (eng. *cAMP responsive element*, CRE) (25).

D2 otpočinje prvi korak u konvertovanju T_4 u T_3 . Homodimer D2 je i veoma aktivna oksido-reduktaza koja se nalazi pod kompleksnom transkripcionom i post-transkripcionom kontrolom. D2 ima krucijalnu ulogu u regulisanju intracelularnog nivoa T_3 , a takođe je odgovorna za nivo T_3 u plazmi kod eutiroidnih individua (26). Topološki je locirana u membrani endoplazmatičnog retikuluma (ER) sa N-terminusom u lumenu ER i globularnim katalitičkim domenom u citosolu (26). D2 je široko rasprostranjena. Kod čoveka je to jedina dejodinaza zastupljena u centralnom nervnom sistemu (CNS), a takođe se eksprimira i u srcu i skeletnim mišićima (27).

VARIJANTE U GENIMA *DIO1* I *DIO2*

Varijanta rs11206244 predstavlja čestu varijaciju u 3'UTR gena *DIO1* koja je povezana sa relativnim nivoima slobodnog tiroksina i trijodtironina i podrazumeva supstituciju C>T gde je frekvencija manje učestalog alela T 0,37 u evropskoj populaciji, prema bazi *Ensembl*. Kod pacijenata, *minor* alel rs11206244 je povezan sa smanjenjem odnosa $fT_3:fT_4$ sa 0,193 na 0,175 kod homozigota (28). Sam polimorfizam ne utiče na nivo TSH i nalazi se u neravnotežnoj vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*, LD) sa varijantom rs2235544 ($r^2 = 0,41$) gde druga varijanta predvodi asocijaciju (28). U drugoj studiji iz 2012. godine je potvrđena asocijacija ove varijante sa izmenjenim nivoima fT_4 kod belaca i afroamerikanaca. Ovaj genotip je takođe povezan sa doživotnom depresijom (eng. *Major Depression*, MD) kod belkinja, posebno onih iz visokorizičnih kohorti, ali ne i kod ostalih populacija, te je označena kao faktor rizika za MD (29). Nosioci alela T pokazuju povišene nivo RT_3/T_4 i manje nivo T_3/RT_3 u serumu što sugerise na negativan efekat ove varijante na ekspresiju i aktivnost D1 (30).

Varijanta rs2235544 takođe predstavlja čestu varijantu u intronu gena *DIO1* koja se povezuje sa relativnim nivoima slobodnog T_3 i T_4 i podrazumeva supstituciju C>A ili C>T, gde je frekvencija manje učestalog alela A 0,46 u evropskoj populaciji, *Ensembl*. Više zastupljeni alel je kod pacijenata povezan sa smanjim odnosom $fT_3:fT_4$ sa 0,196 kod čestih homozigota na 0,177 kod ređe zastupljenih homozigota (28). Kao što je već rečeno, SNP ove varijante se nalazi u neravnotežnoj vezi sa SNP varijante rs11206244, gde rs2235544 predvodi asocijaciju (2). U meta-analizi iz 2013. godine je otkriveno da su čak i male promene u funkcionisanju tiroidne žlezde povezane sa gubitkom težine, atrijskom fibrilacijom, osteoporozom i psihijatrijskim poremećajima (31). Analizom podataka 26 420 zdravih, eutiroidnih individua pokazano je da je alel A (51% učestalost) povezan sa povećanjem nivoa fT_4 , sa nešto većim efektom kod muškaraca nego kod žena. C alel se povezuje sa povećanom funkcijom D1 i povećanim odnosom $fT_3:T_4$ (30).

Kao što je već rečeno, varijanta rs11206244, nukleotidna zamena (C>T), je veoma česta varijacija u 3'UTR-u gena *DIO1* i utiče na nivo slobodnog T_3 i T_4 (33), povećava nivo RT_3-T_4 i smanjuje odnos T_3/rT_3 u serumu čime se sugerise negativan efekat ovog polimorfizma na ekspresiju i aktivnost D1 (30). Ova varijanta se nalazi u neravnotežnoj vezi sa takođe ispitivanom varijantom rs2235544 kod koje se alel A povezuje sa povećanjem nivoa fT_4 , a alel C sa povećanom funkcijom D1 i odnosom $fT_3:T_3$ (32). Ove male promene u

funkcionisanju tiroidne žlezde mogu se može povezati sa gubitkom težine, osteoporozom, poremećajima rada srca i psihijatrijskim poremećajima (31).

Preostale varijante u genu *DIO2*, rs225015 i rs225014, se povezuju sa hipotireodizmom, dijabetesom tipa 2, neurodegenerativnim bolestima, bipolarnim poremećajem, mentalnom retardacijom, osteoartritisom i drugim poremećajima (33–39).

Varijanta rs225015 predstavlja promenu u 3'UTR *DIO2* gena i podrazumeva supstituciju G>A, gde je učestalost ređeg alela A 31% u evropskoj populaciji, prema bazi *Ensembl*. Zabeleženo je da genotip GG utiče na povišene nivoe TSH u poređenju sa AA genotipom ($p < 0,05$) (40). Kako je hipotireodizam često endokrinološko oboljenje, koje podrazumeva smanjene koncentracije fT_4 i fT_3 u serumu, primarni izbor za lečenje ovog oboljenja jeste oralno uzimanje leka levotiroksina (eng. *levothyroxine*, L-T4), sintetičkog T_4 hormona, u dozama 100-125 $\mu\text{g}/\text{dan}$. U slučaju genotipa GG neophodno je uzimati manje doze kako bi se obezbedio pravilan tretman sa većom efektivnošću i manjom toksičnošću (40). U drugoj studiji, varijanta je u određenoj meri povezana sa početkom dijabetesa tipa 2 kod Pima indijaca (33). Varijanta se ne povezuje sa Grejvsovom bolešću (hipertireodizmom) (41).

Varijanta rs225014, poznata i kao Thr92Ala predstavlja *missense* varijantu T>C u *DIO2* genu na hromozomu 14, gde je učestalost ređeg alela 34% u evropskoj populaciji, prema bazi *Ensembl*. Zastupljeniji alel T kodira treonin (Thr), a ređe zastupljeniji alel C kodira alanin (Ala). U studiji iz 2009. hipotiroidni pacijenti na levotiroksinskoj terapiji koji poseduju C alel ove varijante i ne pokazuju poboljšanje, mogu imati benefite kombinovanjem levotiroksinske i jodotironinske terapije (42). Takođe je u sličnoj studiji pokazano da pacijenti koji boluju od hipotiroidizma sa ovom varijantom imaju poboljšan odgovor na terapiju ukoliko je ona kombinovana i uključuje i T_4 i T_3 , međutim ovo može biti faktor rizika za neurodegenerativne bolesti (34). Ova varijanta je povezana sa brojnim stanjima i oboljenjima uključujući i hipertenziju (43), insulinsku rezistenciju (35), dijabetes tipa 2 (36), bipolarni poremećaj (37), mentalnu retardaciju (38), osteoartritis (39) i druge.

Izučavanje varijanti u genima *DIO1* i *DIO2* može rasvetliti njihov potencijal kao dijagnostičkih i prognostičkih markera, kao i meta za ciljanu terapiju, zbog njihovog dokumentovanog uticaja na funkciju tiroidne žlezde, a posredno i na metabolizam celog organizma.

ZAHVALNICA

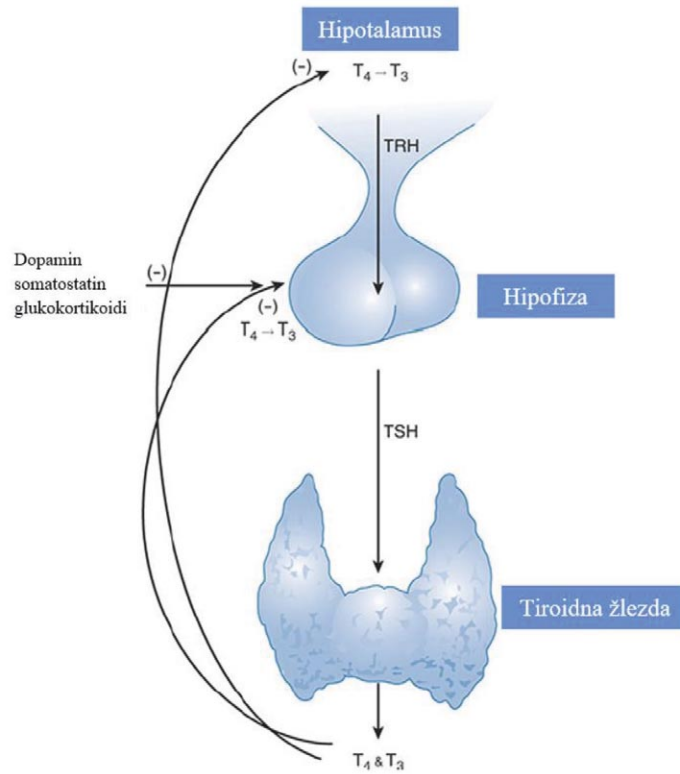
Ovaj rad je izrađen u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod rukovodstvom dr Vladimira Gašića, naučnog saradnika i dr Branke Zukić, naučnog savetnika. Stoga bih želeo da iskažem veliku zahvalnost dr Sonji Pavlović, rukovodiocu laboratorije i dr Branki Zukić koje su me primile u njihovu laboratoriju i omogućile izradu ovog rada, kao i mentoru dr Vladimiru Gašiću, na sugestijama i podršci tokom čitavog procesa istraživanja i pisanja istog.

Literatura

1. Pavlovic S, Zukic B, Petrović M. Molecular genetic markers as a basis for personalized medicine. *J Med Biochem*. 2014 Jan 1;33.
2. Kim S, Misra A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9(1):289–320.
3. Molina P. *Endocrine Physiology, Fifth Edition*. 5th edition. New York Chicago San Francisco: McGraw Hill / Medical; 2018. 320 p.
4. Barrett K, Barman S, Yuan J, Brooks H. *Ganong's Review of Medical Physiology, Twenty Sixth Edition*. 26th edition. McGraw Hill / Medical; 2019. 752 p.

5. Mendoza A, Hollenberg AN. New Insights into Thyroid Hormone Action. *Pharmacol Ther.* 2017 May;173:135–45.
6. Dayan C, Panicker V. Management of hypothyroidism with combination thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) hormone replacement in clinical practice: a review of suggested guidance. *Thyroid Res.* 2018 Jan 17;11:1.
7. Babić Leko M, Gunjača I, Pleić N, Zemunik T. Environmental Factors Affecting Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid Hormone Levels. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 17;22(12):6521.
8. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2006 Oct 2;116(10):2571–9.
9. Hoermann R, Midgley JEM, Larisch R, Dietrich JW. Relational Stability in the Expression of Normality, Variation, and Control of Thyroid Function. *Front Endocrinol.* 2016 Nov 7;7:142.
10. Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol Rev.* 2014 Apr;94(2):355–82.
11. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2012 Sep 4;122(9):3035–43.
12. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocr Rev.* 2010 Apr;31(2):139–70.
13. Gereben B, Zeöld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Feb;65(4):570–90.
14. St Germain DL, Galton VA. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* 1997 Aug;7(4):655–68.
15. Curcio-Morelli C, Gereben B, Zavacki AM, Kim BW, Huang S, Harney JW, et al. In vivo dimerization of types 1, 2, and 3 iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrinology.* 2003 Mar;144(3):937–46.
16. Sagar GDV, Gereben B, Callebaut I, Mornon JP, Zeöld A, da Silva WS, et al. Ubiquitination-Induced Conformational Change within the Deiodinase Dimer Is a Switch Regulating Enzyme Activity. *Mol Cell Biol.* 2007 Jul;27(13):4774–83.
17. Leonard JL, Visser TJ, Leonard DM. Characterization of the subunit structure of the catalytically active type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2600–7.
18. Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser F, Schmid M, Köhrle J. Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics.* 1997 Jun 1;42(2):361–3.
19. Jakobs TC, Schmutzler C, Meissner J, Köhrle J. The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene—mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element. *Eur J Biochem.* 1997 Jul 1;247(1):288–97.
20. Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J. Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Sep;79(3):791–8.
21. Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1156–63.
22. Toyoda N, Berry MJ, Harney JW, Larsen PR. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem.* 1995 May 19;270(20):12310–8.
23. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002 Feb 1;23(1):38–89.
24. Celi FS, Canettieri G, Yarnall DP, Burns DK, Andreoli M, Shuldiner AR, et al. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5'-deiodinase gene. *Mol Cell Endocrinol.* 1998 Jun 25;141(1–2):49–52.
25. Bartha T, Kim SW, Salvatore D, Gereben B, Tu HM, Harney JW, et al. Characterization of the 5'-Flanking and 5'-Untranslated Regions of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Responsive Human Type 2 Iodothyronine Deiodinase Gene1. *Endocrinology.* 2000 Jan 1;141(1):229–37.
26. Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology.* 2000 Nov;141(11):4309–12.
27. Campos-Barros A, Hoell T, Musa A, Sampaolo S, Stoltenburg G, Pinna G, et al. Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Jun;81(6):2179–85.
28. Panicker V, Cluett C, Shields B, Murray A, Parnell KS, Perry JRB, et al. A Common Variation in Deiodinase 1 Gene DIO1 Is Associated with the Relative Levels of Free Thyroxine and Triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Aug;93(8):3075–81.
29. Philibert RA, Beach SRH, Gunter TD, Todorov AA, Brody GH, Vijayendran M, et al. The relationship of deiodinase 1 genotype and thyroid function to lifetime history of major depression in three independent populations. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet.* 2011 Jul;156B(5):593–9.

30. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, et al. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocr Rev.* 2008 Dec;29(7):898–938.
31. E P, M M, G P, Cb V, Sg W, Ar C, et al. A meta-analysis of thyroid-related traits reveals novel loci and gender-specific differences in the regulation of thyroid function. *PLoS Genet* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jun 7];9(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23408906/?dopt=Abstract>
32. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology.* 2009 Mar;150(3):1091–6.
33. Biondi B, Kahaly GJ, Robertson RP. Thyroid Dysfunction and Diabetes Mellitus: Two Closely Associated Disorders. *Endocr Rev.* 2019 Jun 1;40(3):789–824.
34. The Thr92AlaD2 Polymorphism May Play a Novel Role in Hypothyroidism. *US Endocrinol* [Internet]. 2015 Oct 29 [cited 2023 Jun 8]; Available from: <https://www.touchendocrinology.com/thyroid/journal-articles/the-thr92alad2-polymorphism-may-play-a-novel-role-in-hypothyroidism/>
35. Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, Tanner K, Bacci V, Pollin TI, Poehlman ET, et al. Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor. *Diabetes.* 2002 Mar;51(3):880–3.
36. Dora JM, Machado WE, Rheinheimer J, Crispim D, Maia AL. Association of the type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism with type 2 diabetes: case-control study and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2010 Sep;163(3):427–34.
37. He B, Li J, Wang G, Ju W, Lu Y, Shi Y, et al. Association of genetic polymorphisms in the type II deiodinase gene with bipolar disorder in a subset of Chinese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009 Aug 31;33(6):986–90.
38. Guo TW, Zhang FC, Yang MS, Gao XC, Bian L, Duan SW, et al. Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. *J Med Genet.* 2004 Aug;41(8):585–90.
39. Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk HJ, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2008 Jun 15;17(12):1867–75.
40. Arici M, Oztas E, Yanar F, Aksakal N, Ozcinar B, Ozhan G. Association between genetic polymorphism and levothyroxine bioavailability in hypothyroid patients. *Endocr J.* 2018 Mar 1;65(3):317–23.
41. Shahida B, Planck T, Åsman P, Lantz M. Study of Deiodinase Type 2 Polymorphisms in Graves' Disease and Ophthalmopathy in a Swedish Population. *Eur Thyroid J.* 2018;7(6):289–93.
42. Panicker V, Saravanan P, Vaidya B, Evans J, Hattersley AT, Frayling TM, et al. Common variation in the DIO2 gene predicts baseline psychological well-being and response to combination thyroxine plus triiodothyronine therapy in hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May;94(5):1623–9.
43. Gumieniak O, Perlstein TS, Williams JS, Hopkins PN, Brown NJ, Raby BA, et al. Ala92 type 2 deiodinase allele increases risk for the development of hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2007 Mar;49(3):461–6.



Slika 1 **Hipotalamo-hipofizno-tiroidna osa**. TRH se sintetiše u parvicelularnim neuronima paraventricularnog jedra hipotalamusa i oslobađa se sa krajeva nerava u eminenciju medijanu odakle se transportuje kapilarnim pleksusom do prednjeg dela hipofize. Vezivanje TRH za receptore dovodi do povećane intraćelijske koncentracije Ca^{2+} što rezultira stimulacijom egzocitoze i oslobađanja TSH u cirkulaciju. TSH stimuliše tiroidnu žlezdu da poveća sintezu i sekreciju tetrajodtironina (T_4) i trijodtironina (T_3) u cirkulaciju. T_4 i T_3 inhibiraju sekreciju tiotropina direktno i indirektno inhibiranjem sekrecije TRH. Dodatni inhibitorni faktori oslobađanja TSH su somatostatin, glukokortikoidi i dopamin. (preuzeto iz Molina, 2018.)

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

tmb



IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2024.

Izdavač

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

Urednik

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Uređivački odbor

Dr **Ivana Strahinić**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“

Urednik za Z-molekularce

Dr **Aleksandra Nikolić**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

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

Štampa

Margo Art, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

Autori

Aleksa Timotijević.....	178
Anastasija Panić.....	170
Anita Skakić.....	156
Bojan Ristivojević.....	102
Branka Zukić.....	55, 102
Dragana Malčić Zanić.....	44
Đurđica Ignjatović.....	86
Gordana Timotijević.....	122
Iva Atanasković.....	139
Ivana Lukić.....	8
Ivana Nikolić.....	122
Jelena Janković Miljuš.....	164
Jelena Roganović.....	22
Jelena Samardžić.....	122
Jelica Predojević Samardžić.....	44
Katarina Bojović.....	86
Katarina Petković.....	8
Katarina Radojević.....	8
Ljubica Harhaji Trajković.....	67
Luka Dragačević.....	8
Marija Vuković.....	55
Marina Stamenković.....	8
Marko Panić.....	8
Milan Kojić.....	8
Milica Kosić.....	67
Mira Milisavljević.....	122
Mirjana Kocova.....	31
Nevena Bobar.....	164
Nikola Jocić.....	156
Nina Marić.....	44
Rajna Minić.....	8
Sonja Pavlović.....	55
Sonja Zafirović.....	170
Vasilije Živaljević.....	170
Veljko Blagojević.....	8
Verica Paunović.....	67
Violeta Anastasovska.....	31
Vladimir Gašić.....	178



CIP - Каталогизacija y publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

577.2

TRENDVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929